



Návod na použitie


ELISA anti-GLIADÍN-deamidovaný-II-A,G

Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro určená na profesionálne použitie

REF E-230

UDI-DI 08588002310140



 **Biogema, výrobné družstvo, Košice**
Garbiarska 2, 040 01 Košice, Slovenská republika

Tel.: +421 556 225 719

+421 904 228 131

E-mail: biogema3@biogema.sk

www.biogema.sk



OBSAH

1 Záznamy o dokumente	3
2 Účel určenia	3
3 Popis	3
4 Princíp testu	3
5 Zloženie súpravy	4
6 Materiál potrebný, ale nedodávaný	5
7 Skladovanie a doba expirácie	5
8 Upozornenie	5
9 Príprava vzoriek	7
10 Príprava pracovných roztokov	7
11 Pracovný postup	7
12 Pipetovacia schéma	8
13 Kontrola kvality a validácia testu	9
14 Zjednodušená pracovná schéma spracovania súpravy	9
15 Interpretácia výsledkov	10
16 Parametre analytického výkonu	11
17 Odporúčania pri práci so súpravou	11
18 Zoznam použitých symbolov	13
19 Literatúra	14

1 Záznamy o dokumente

Revízia č.: 1/2024

Dátum účinnosti: 1.1.2024

Popis zmien: Úpravy a doplnenie podľa aktuálnych požiadaviek

2 Účel určenia

Súprava je určená na kvantitatívne stanovenie protilátok typu IgA a IgG proti rekombinantnému antigénu deamidovaného peptidu gliadínu vo vzorkách ľudského séra v bežnej populácii. Stanovenie protilátok je založené na imunoenzymatickej metóde a slúži k diagnostike celiakie. Súprava je určená len na profesionálne diagnostické použitie in vitro v laboratóriu.

3 Popis

Stanovenie anti-gliadínových protilátok v ľudskom sére sa využíva na zlepšenie diagnostických možností a na monitorovanie liečby celiakie. Celiakia je geneticky podmienené autoimunitné ochorenie detí a dospelých. Použitie rekombinantného deamidovaného peptidu gliadínu zlepšuje špecificitu testu. V dôsledku ochorenia vzniká v sliznici tenkého čreva celý rad zmien od zvýšeného množstva interepiteliálnych lymfocytov až po hyperpláziu krýpt a oploštenie klkov. Klinické príznaky celiakie sú veľmi variabilné a rozdielne u detí a dospelých. K typickým príznakom patria hnačky, chudnutie, bolesti brucha, únava. K atypickým formám býva zaradená dermatitis herpetiformis Duhring. Ochorenie sa môže prejaviť bolesťami kostí, stagnáciou rastu, oneskorenou pubertou, infertilitou, opakovanými potratmi, anémiou, osteoporózou, atď. Obávanými komplikáciami celiakie sú gastrointestinálne karcinómy a lymfómy. Liečba spočíva v dodržiavaní diéty s prísnyim vylúčením gluténu zo stravy pacienta.

4 Princíp testu

Stanovenie je založené na princípe nepriamej ELISA metódy na detekciu špecifických protilátok. Antigen je imobilizovaný na povrchu jamiek mikrotitračnej doštičky. Testované vzorky nariedeného ľudského séra sa inkubujú v jamkách mikrotitračnej doštičky. V tejto fáze dochádza k naviazaniu špecifických protilátok z ľudského séra na imobilizovaný antigen. Po inkubácii sa premytím odstráni nezreagované komponenty ľudského séra a pridá sa konjugát chrenovej peroxidázy s protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu IgA/IgG. Po inkubácii a odstránení prebytočného konjugátu sa pridá substrát TMB a enzýmová reakcia sa zastaví pridaním kyseliny sírovej. Absorbancia testovaných vzoriek sa porovnáva s absorbanciou štandardov. Intenzita sfarbenia je úmerná množstvu špecifických protilátok prítomných v sére.

5 Zloženie súpravy

PLATE Mikrotitračná doštička potiahnutá antigénom **1 ks**

12x8 jamkové stripy umiestnené v rámičku, zabalené v ochrannom obale s vysúšadlom.

CONJUGATE Konjugáty HRP anti-IgA a HRP anti-IgG **2 x 12 ml**

Roztok obsahujúci zvieraciu protilátku proti ľudskému IgA/IgG značenú peroxidázou.

Roztok je pripravený na použitie.

SUBSTRATE Substrát TMB **1 x 12 ml**

Roztok obsahujúci substrát TMB (3,3',5,5' - tetrametylbenzidín).

Roztok je pripravený na použitie.

STOP Kyselina sírová **1 x 8 ml**

Roztok obsahujúci zastavovacie činidlo (zriedenú kyselinu sírovú).

Roztok je pripravený na použitie.

CAL 1 **CAL 6** Štandardy 1 až 6 **12 x 1 ml**

Roztoky obsahujúce špecifické ľudské protilátky IgA/IgG proti deamidovanému gliadínu s koncentráciou 0 - 5 - 10 - 20 - 40 - 80 U.ml⁻¹.

Štandardy sú pripravené na použitie.

CONTROL - Kontrolná vzorka negatívna **2 x 1 ml**

Roztok neobsahujúci špecifické ľudské protilátky IgA/IgG proti deamidovanému gliadínu slúžiaci ako negatívna kontrola. Koncentrácia je stanovená v osvedčení o súprave.

Kontrolná vzorka negatívna je pripravená na použitie.

CONTROL + Kontrolná vzorka pozitívna **2 x 1 ml**

Roztok obsahujúci špecifické ľudské protilátky IgA/IgG proti deamidovanému gliadínu slúžiaci ako pozitívna kontrola. Koncentrácia je stanovená v osvedčení o súprave.

Kontrolná vzorka pozitívna je pripravená na použitie.

SAMPLEBUF Zried'ovací roztok **1 x 100 ml**

Roztok obsahujúci TRIS-HCl tlmivý roztok, bovinný sérový albumín, 0,2% azid sodný, 0,02% timerosal a modré farbivo, pH roztoku 7,0 ± 0,2.

Roztok je pripravený na použitie.

WASHBUF Vymývací roztok **1 x 50 ml**

TRIS-HCl tlmivý roztok s obsahom Tween 20 a 0,01% timerosalu, pH roztoku 7,0.

Koncentrovaný roztok pred použitím zriedte podľa popisu v bode 10 tohto návodu.

Osvedčenie o súprave **1 ks**

6 Materiál potrebný, ale nedodávaný

Pre ručné spracovanie súpravy:

Jedno a viacnásobné pipety

Špičky pre jednorazové použitie

Premývacie zariadenie

Časovač alebo stopky

Spektrofotometer pre mikrotitračné doštičky

Pre automatizované spracovanie súpravy:

Automatizovaný systém na spracovanie súprav ELISA

Jednorazový materiál podľa požiadaviek automatizovaného systému

7 Skladovanie a doba expirácie

Pri dodržaní skladovacích podmienok je súprava stabilná do dátumu uvedenom na obale. Súpravu skladujte pri teplote od +2°C do +8°C na suchom mieste. Súpravu nezmrazujte. Po otvorení ochranného obalu mikrotitračnej doštičky odporúčame stripy spotrebovať do 1 mesiaca.

8 Upozornenie

Súprava je určená len na profesionálne diagnostické použitie in vitro v laboratóriu.

Pozorne si prečítajte návod na použitie.

Pre správne spracovanie súpravy je potrebné vykonať všetky kroky presne podľa návodu na použitie.

Nepoužívajte mikrotitračnú doštičku, ak je ochranný obal poškodený.

Pred spracovaním súpravu vytemperujte na laboratórnu teplotu, t.j. na 18°C až 25°C.

Priložené vysušadlo v ochrannom obale mikrotitračnej platničky nepoužívať.

Súprava je určená len na jedno použitie.

Pomoc a vigilancia

Pre žiadosť o technickú pomoc, alebo prípadný výskytu závažnej nehody kontaktujte výrobcu na emailovej adrese biogema4@biogema.sk, prípadne telefonicky na +42155 6228 131. Pri výskyte závažnej nehody je používateľ tejto súpravy povinný takúto udalosť nahlásiť aj na tel. čísle +421250 7012 15, e-mailom na pomocky@sukl.sk dozornému orgánu ŠÚKL, Kvetná 11, 825 08 Bratislava a vždy postupovať podľa regulačných požiadaviek v platnom znení.

Bezpečnosť pri práci

Jednotlivé substancie súpravy obsahujú konzervačné činidlá azid sodný a timerosal. Azid sodný reaguje s olovom a meďou za vzniku výbušných azidov. Azid sodný a timerosal môžu pri priamom kontakte s pokožkou spôsobiť podráždenie. V prípade kontaktu s pokožkou postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody. Kyselina sírová obsiahnutá v stop činidle **STOP** v koncentrácii $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ môže pri priamom kontakte s očami, alebo kožou spôsobiť podráždenie. V prípade zasiahnutia očí, alebo kože postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.

Azid sodný, timerosal a kyselina sírová, v koncentráciách použitých v súprave, sú zdraviu škodlivé. Vzhľadom k nízkemu obsahu škodlivých látok v substanciach súpravy životné prostredie nie je ohrozené. Podrobnejšie informácie je možné získať z kariet bezpečnostných údajov jednotlivých substancií.

Infekčné a mikrobiálne riziká

Kontrolné vzorky a štandardy obsahujú ľudské sérum. Ľudské sérum použité na prípravu týchto substancií vykazovalo negatívny výsledok testu na prítomnosť antigénu HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV. Napriek negatívnemu testovaniu použitých sér je potrebné s týmito substanciami pracovať ako s potenciálne infekčnými - pri práci používajte jednorazové ochranné rukavice.

Likvidácia odpadu

Nepoužité zvyšky patientskych vzoriek a substancie obsahujúce ľudské sérum likvidujte ako infekčný materiál.

Nepoužité zvyšky súpravy obsahujúce nebezpečné chemické látky odporúčame zlikvidovať v súlade s miestnymi požiadavkami a v súlade s ustanoveniami zákona NR SR č.223/2001 Z.z. a vyhlášky MŽP SR č. 365/2015 Z.z. v platnom znení.

Nekontaminovaný kartónový obal súpravy vhodte do príslušnej recyklačnej nádoby.

9 Príprava vzoriek

Súprava je určená na stanovenie vzoriek ľudského krvného séra. Čerstvé vzorky sa v priebehu stanovenia uskladňujú do 72 hodín pri teplote od +2°C do +8°C. Vzorky séra sa dlhodobo uskladňujú pri - 20°C. Vzorky séra po rozmrazení nie je možné opakovane zamraziť. Na stanovenie nepoužívajte lipemické, hemolyzované, ikterické, alebo inak kontaminované krvné séra.

Pacientské séra sa riedia v pomere 1:101, t.j. 10 µl pacientského séra sa zriedi pridaním 1ml zriedovacieho roztoku. Takto zriedené pacientské séra sú pripravené na použitie.

10 Príprava pracovných roztokov

Vymývací roztok pred použitím zriedte v pomere 1:20 (1 diel roztoku a 19 dielov destilovanej vody). Obsah fľaštičky vymývacieho roztoku (50 ml) doplňte do 1000 ml destilovanou vodou. Roztok je po zriedení stabilný 1 týždeň pri skladovaní v teplotnom rozmedzí +2°C do +8°C.

Štandardy a kontrolné vzorky sú nariedené v pracovnom pomere, ďalej neriediť !

Konjugát HRP je nariedený v pracovnom pomere, ďalej neriediť !

TMB substrát je nariedený v pracovnom pomere, ďalej neriediť !

Kyselina sírová je nariedená v pracovnom pomere, ďalej neriediť !

11 Pracovný postup

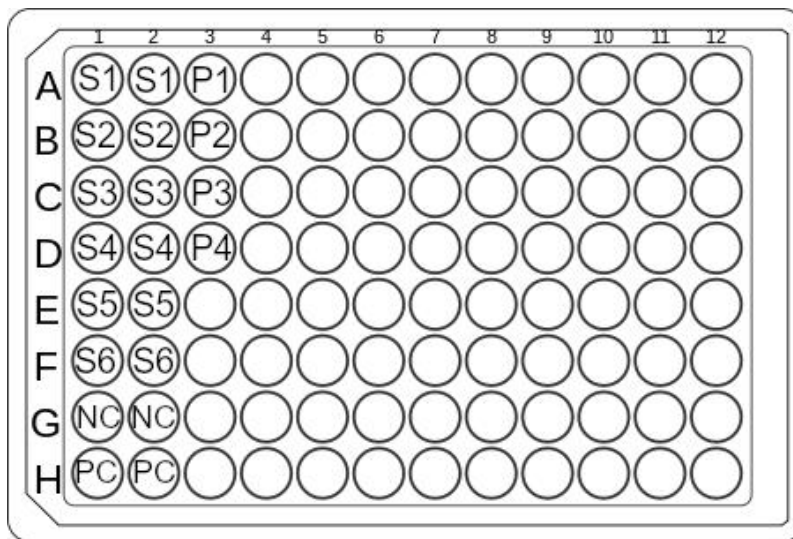
Všetky reagenty musia byť pred začiatkom stanovenia vytemperované na laboratórnu teplotu +18°C až +25°C. Nepoužitú stripy uchovávajú v uzatvorenom obale s vysušadlom v teplotnom rozmedzí od +2°C do +8°C.

1. Pipetujte do jamiek stripov:
 - po 100 µl štandardov
 - po 100 µl negatívnej kontrolnej vzorky
 - po 100 µl pozitívnej kontrolnej vzorky
 - po 100 µl zriedených pacientských vzoriek
2. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote
3. Po ukončení inkubácie stripy 4 x dobre premyte zriedeným vymývacím roztokom.

Poznámka: Pokiaľ nie je k dispozícii premývacie zariadenie pre mikrotitračné doštičky, premývanie spočíva v napipetovaní 250 µl zriedeného vymývacieho roztoku do všetkých jamiek. Po 30 sekundách sa vymývací roztok zo stripov prudko vyleje a okraje doštičky sa usušia filtračným papierom.

4. Do jamiek napipetujte po 100 µl konjugátu HRP anti-IgA/IgG a inkubujte pri laboratórnej teplote 30 minút.
5. Stripy znova 4 x dobre premyte zriedeným vymývacím roztokom
6. Do jamiek napipetujte bez prerušenia po 100 µl substrátu TMB. Pipetovanie musí byť ukončené do 2 minút !
7. Vyfarbuje sa 15 minút v tme.
8. Po uplynutí doby vyfarbenia sa reakcia zastaví pridaním 50 µl kyseliny sírovej do každej jamky.
9. Intenzitu sfarbenia merajte na fotometrickom čítači mikrotitračných doštičiek pri vlnovej dĺžke 450 nm.
Ako referenčný filter môže byť použitý filter s vlnovou dĺžkou od 600 do 690 nm. Meranie ukončíte najneskôr do 1 hodiny po skončení vyvíjania, doštičku medzitým uchovávajte v tme.

12 Pipetovacia schéma



Označenie	Objem	Popis
S1 - S6	100 µl	Štandardy S1 - S6
NC	100 µl	Kontrolná vzorka negatívna
PC	100 µl	Kontrolná vzorka pozitívna
P1 - P _x	100 µl	Zriedené patientské vzorky

13 Kontrola kvality a validácia testu












Vykonané meranie je validné ak:

Absorbancia nulového štandardu S1 **CAL 1** je menej ako 0,2.

Absorbancia najvyššieho štandardu S6 **CAL 6** je viac ako 0,8.

Hodnoty koncentrácií negatívnej a pozitívnej kontrolnej vzorky musia spĺňať intervaly uvedené v osvedčení o súprave.

14 Zjednodušená pracovná schéma spracovania súpravy

-
- | | | | |
|--------------------------------|--|--------|---|
| 01. Pipetujte po 100 µl | /kontrolné vzorky, štandardy, patientské vzorky/ | 100 µl |  |
| | CONTROL- CONTROL+ CAL | | |
-
- | | | | |
|---|--|-----------|---|
| 2. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote | | 30 min. |  |
| | | 18 - 25°C | |
-
- | | | | |
|--|----------------------------|-----|---|
| 3. 4x dobre premyte vymývacím roztokom | /250 µl, reakčný čas 30 s/ | 4 x |  |
| | WASHBUF | | |
-
- | | | | |
|-------------------------------|------------------|--------|---|
| 4. Pipetujte po 100 µl | /konjugát HRP / | 100 µl |  |
| | CONJUGATE | | |
-
- | | | | |
|---|--|-----------|---|
| 5. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote | | 30 min. |  |
| | | 18 - 25°C | |
-
- | | | | |
|--|----------------------------|-----|---|
| 6. 4x dobre premyte vymývacím roztokom | /250 µl, reakčný čas 30 s/ | 4 x |  |
| | WASHBUF | | |
-
- | | | | |
|-------------------------------|------------------|--------|---|
| 7. Pipetujte po 100 µl | /substrát TMB/ | 100 µl |  |
| | SUBSTRATE | | |
-
- | | | | |
|--|--|-----------|---|
| 8. Inkubujte 15 minút pri laboratórnej teplote v tme | | 15 min. |   |
| | | 18 - 25°C | |
-
- | | | | |
|------------------------------|-------------------|-------|---|
| 9. Pipetujte po 50 µl | /Kyselina sírová/ | 50 µl |  |
| | STOP | | |
-
- | | | | |
|---------------------------|--|--------|---|
| 10. Vyhodnotenie výsledku | /fotometrický čítač s vlnovou dĺžkou 450 nm/ | 450 nm |  |
|---------------------------|--|--------|---|
-

15 Interpretácia výsledkov

Ak nie je k dispozícii program na zostrojenie kalibračnej závislosti, použije sa nasledovný postup:

- Vypočítajte priemerné absorbancie pre každý štandard a kontrolné vzorky.
- Nakreslite štandardnú krivku na semilogaritmický papier vynesení logaritmu koncentrácií štandardov (U.ml^{-1}) na horizontálnu os (x) proti priemerným absorbanciám štandardov na vertikálnu os (y). Z krivky odčítajte hodnotu koncentrácií kontrolných a patientskych vzoriek. Táto hodnota sa už nenásobí riediacim faktorom.

Očakávané hodnoty:

Očakávané hodnoty u zdravej populácie sú negatívne.

Odporúčame nasledovné hodnotenie výsledkov:

Pre stanovenie protilátok triedy IgA aj IgG:

Negatívne hodnoty < 13 U.ml^{-1}

Hraničná hodnota 13-15 U.ml^{-1}

Pozitívne hodnoty > 15 U.ml^{-1}

16 Parametre analytického výkonu

Pre stanovenie protilátok typu IgA:

Analytická citlivosť:	0,331 U.ml ⁻¹
Opakovateľnosť (Intra-assay)	4,35 %
Reprodukovateľnosť (Inter-assay)	9,40 %
Presnosť	10,49 %
Hranice rozsahu detekcie	5 U.ml ⁻¹ - 80 U.ml ⁻¹

Pre stanovenie protilátok typu IgG:

Analytická citlivosť:	0,068 U.ml ⁻¹
Opakovateľnosť (Intra-assay)	6,12 %
Reprodukovateľnosť (Inter-assay)	7,74 %
Presnosť	9,97 %
Hranice rozsahu detekcie	5 U.ml ⁻¹ - 80 U.ml ⁻¹

Súprava je špecifická pre ľudský imunoglobulín triedy IgA a IgG

17 Odporúčania pri práci so súpravou

Pri spracovaní súpravy odporúčame dbať na dôsledné vykonanie jednotlivých krokov definovaných v pracovnom postupe, ako je správne pipetovaný objem substancií, presné dodržanie inkubačných časov a dôsledné premytie a odsatie vymývacieho roztoku z jamiek v procese premývania. Nesprávne premytie mikrotitračných jamiek, prípadne vynechaný cyklus, či krok premývania, má priamy vplyv na stanovené hodnoty absorbancií.

Pred spracovaním súpravy odporúčame dbať na dobré vytemperovanie substancií a mikrotitračnej doštičky. Zlé vytemperovanie substancií má priamy vplyv na presnosť merania.

Pre prípravu vymývacieho roztoku používajte vysoko kvalitnú destilovanú vodu vhodnú na laboratórne použitie.

Pri spracovaní súpravy dbajte na dodržiavanie správnej laboratórnej praxe. Odporúčame používať jednorazové pipetovacie špičky. Pre pipetovanie každej substancie použite novú špičku pre elimináciu kontaminácie vzoriek a substancií.

Súpravu je možné spracovať postupne. Nepoužité stripy uchovávať v hliníkovom ochrannom obale spolu s vysúšadlom podľa podmienok skladovania uvedených v tomto návode na použitie. Pre každé spracovanie súpravy odporúčame použiť a nariediť iba potrebné množstvo čerstvých substancií.

Neodporúčame používať už nariadené, alebo inak pripravené substancie, ktoré boli pripravené pre predchádzajúce spracovania (ani v prípade, ak boli uchovávané v chladničke).

Striktne odporúčame používať substancie iba v rámci príslušnej šarže a príslušnej súpravy (nesmú sa miešať substancie medzi rôznymi šaržami).

Odporúčame zabezpečiť, aby substrát TMB nebol vystavený slnečnému žiareniu (prípadne umelému osvetleniu). Vaničku pre pipetovanie TMB roztoku nepoužívajte na iné substancie.

Odporúčania pri práci so súpravou v ELISA automatizovaných systémoch

Pri automatizovanom spracovaní súpravy odporúčame odsledovať časový priebeh jednotlivých krokov spracovania a prípadne nastaviť správne časové intervaly jednotlivých krokov (hlavne po fáze premývania by mala byť hneď pridaná príslušná substancie - konjugát HRP, substrát TMB).

Odporúčame skontrolovať správny priebeh každého kroku spracovania - správne premytie, správne pipetovanie objemov, správy čas inkubácie a pod..





















Nastavenie teploty v automatizovanom systéme musí byť zabezpečené tak, aby bolo v súlade s odporúčanou teplotou uvedenou v tomto návode na použitie. Znížená a zvýšená teplota pri spracovaní súpravy má priamy vplyv na stanovené hodnoty absorbaníí.

Odporúčame mať počas spracovania súpravy uzatvorený kryt automatu. Vystavenie substrátu TMB svetlu môže mať za následok znehodnotenie substancie s priamym negatívnym dopadom na výsledok spracovania.

Súprava je vhodná pre spracovanie na všetkých typoch automatických ELISA analyzátoroch.

Pri nedodržaní pracovného postupu výrobca nezodpovedá za správnu funkciu súpravy.

18 Zoznam použitých symbolov

-  IVD Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro
-  REF Katalógové číslo
-  LOT Šarža / LOT
-  Výrobca
-  Σ_n Vhodné pre „n,, testov
-  CE Označenie zhody s regulačnými požiadavkami „CE,,
-  Obsahuje ľudské tkanivo
-  BIO Obsahuje zvieracie tkanivo
-  Chráňte pred slnkom
-  Dátum expirácie
-  $+2^{\circ}\text{C}$ / $+8^{\circ}\text{C}$ Obmedzenie teploty / Teplotný rozsah
-  Prečítajte si návod na použitie / elektronický návod na použitie
-  Nepoužívať opakovane
-  Varovanie
-  Nepoužívať, ak je obal poškodený
-  Distribútor
-
-  Vhodíte do príslušnej zbernej nádoby
-  02 HDPE Materiálové zloženie HDPE
-  05 PP Materiálové zloženie PP
-  20 PAP Materiálové zloženie papier a lepenka

19 Literatúra

Bejdová,T., Stecová,A.: Celiakia–morfológia, patogenéza a diagnostika. Laboratórna diagnostika, 2003, (2-3), 22-25

Carlsson,A.K., Axelsson,I.E.M., Borulf,S.K., Bredberg,A.C.A., Ivarsson,S.A.: Serological screening for celiac disease in healthy 2,5-year-old children in Sweden. Pediatrics, 2001, 197 (1), 42-45

Hvatum,M., Scott,H., Brandtzaeg,P.: Serum IgG subclass antibodies to a variety of food antigens in patients with coeliac disease. Gut, 1992, 33, (5), 632–638

Krajčírová,M., Čierna,I., Zaviačič,M., Tibenská,E.: Celiakálna choroba detí–10 ročné sledovanie. Čes. a Slov. Gastroent., 1999, 53, (3), 75-79

Maki,M., Collin,P.: Coeliac disease. Lancet, 1997, 349, 1755-1759

Páv,I.: Celiakia v ambulantnej praxi. Via pract., 2006, 3(1), 22-24

Vančíková,Z., Chlumecký,V., Sokol,D., Horáková,D., Hamšíková, E., Fučíková,T., Janatková,I., Ulčová–Gallová,Z., Štěpán,J., Límanová,Z., Dvořák,M., Kocna,P., Sánchez,D., Tučková,L., Tlaskalová–Hogenová,H.: The serologic screening for celiac disease in the general population (blood donors) and in some high – risk groups of adults (patients with autoimmune diseases, osteoporosis and infertility) in Czech Republic. Folia Microbiologica 2002, 47 (6), 753 - 758