



BIOGEMA

Garbiarska 2, 04001 KOŠICE



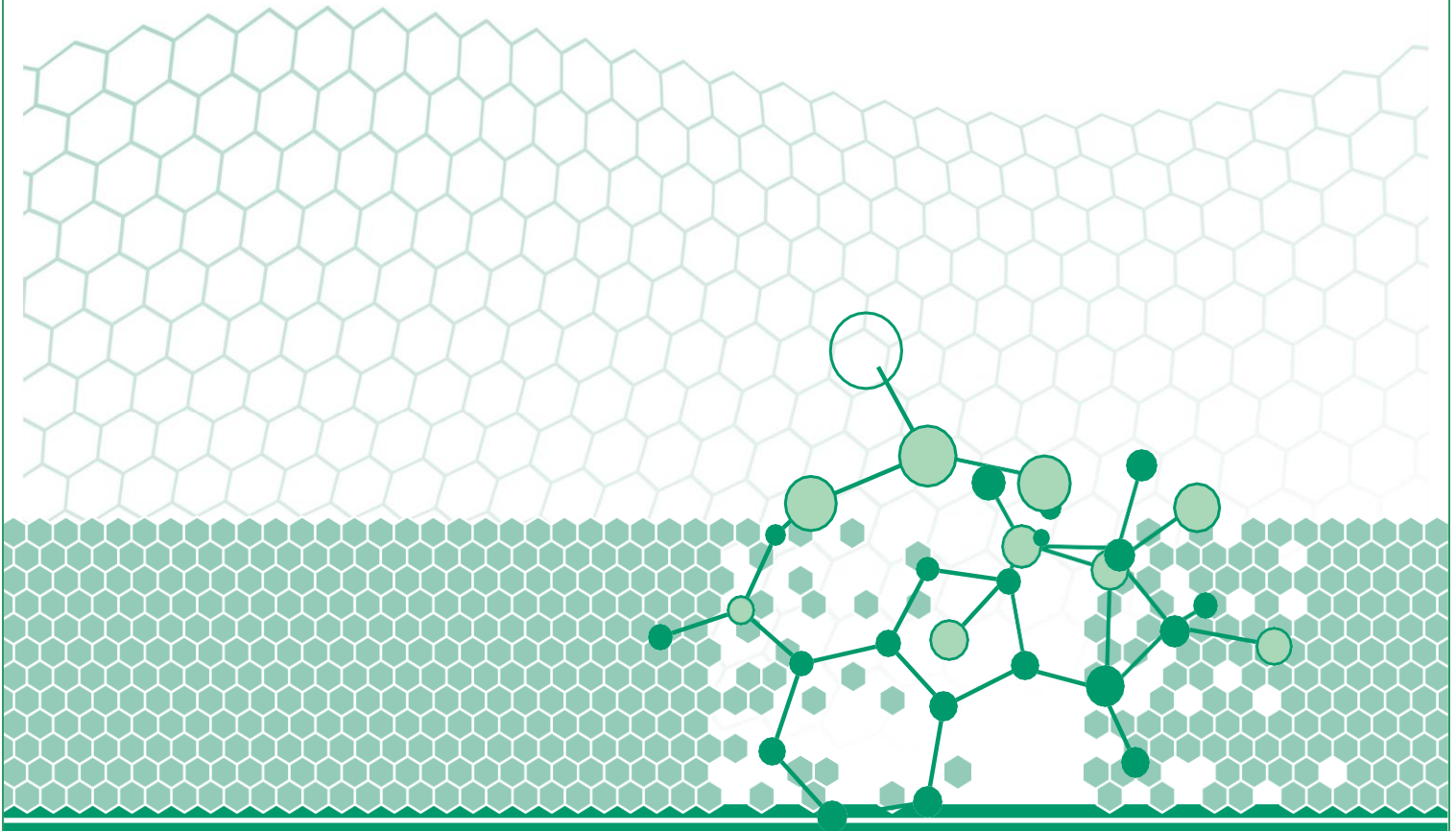
Návod na použitie

ELISA-anti-GLIADÍN deamidovaný-II-A,G

REF E-230



IVD



ELISA-anti-GLIADÍN deamidovaný-II-A,G

REF E-230



Návod na použitie

48 jamiek pre IgA

48 jamiek pre IgG

Súprava ELISA-anti-GLIADÍN deamidovaný-II-A,G je určená na kvantitatívne stanovenie špecifických protilátok proti gliadínu triedy IgA a IgG v ľudskom sére. Umožňuje stanovenie 16 neznámych vzoriek v duplikátoch pre triedu IgG a IgA. Ako antigén je v súprave použitý rekombinantný deamidovaný syntetický peptid gliadínu.

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. V európskej populácii sa udáva prevalencia celiakie 1:100 až 1:300. Príčinou choroby je intolerancia bielkovín pšenice, jačmeňa, raže a ovsá. Intolerancia je na bielkoviny endospermu obilných zŕn, tzv. glutén (lepok), z ktorého sa dá etanolom extrahovať gliadín, frakcia obsahujúca asi 50 proteínových zložiek. Použitie rekombinantného deamidovaného peptidu gliadínu zlepšuje špecifickosť 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, infertility, 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.

PRINCÍP

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

ZLOŽENIE

Nezamieňať substancie z iných súprav!

1. Mikrotitračná doštička

12 ks 8-jamkových lámateľných stripov aktivovaných antigénom.

2. Štandardy

12 fľaštičiek, 6 fľaštičiek (6 x 1 ml) s roztokmi špecifickej protilátky proti gliadínu triedy IgA a 6 fľaštičiek (6 x 1 ml) s roztokmi špecifickej protilátky proti gliadínu triedy IgG. Koncentrácia štandardov 0 – 5 – 10 – 20 – 40 – 80 U.ml⁻¹. Štandardy sú vyriedené v zriedovacom roztoku, pripravené na použitie.

3. Kontrolné vzorky

4 fľaštičky, 2 fľaštičky (2 x 1 ml) s kontrolnou vzorkou negatívnou a pozitívnou pre triedu IgA a 2 fľaštičky (2 x 1 ml) s kontrolnou vzorkou negatívnou a pozitívnou pre triedu IgG, sú vyriedené v zriedovacom roztoku, pripravené na použitie. Koncentrácie kontrolných vzoriek sú uvedené v Osvedčení o súprave.

4. Substrát TMB

1 fľaštička (12 ml) s TMB (3,3',5,5'- tetrametylbenzidín). Je pripravený na použitie.

5. Zriedovacie roztok

1 fľaštička (100 ml) s TRIS-HCl tlmivým roztokom s obsahom bovinného sérového albumínu, 0,2% azidu sodného, 0,02% timerosalu a modrého farbiva, pH 7,0 ± 0,2. Je pripravený na použitie.

6. Vymývacie roztok

1 fľaštička (50 ml). Obsah fľaštičky s vymývacím roztokom doplňte do 1000 ml destilovanou vodou.

7. Konjugáty

2 fľaštičky (2 x 8 ml) s konjugátmi HRP-anti-IgA a HRP-anti-IgG. Sú pripravené na použitie.

8. Kyselina sírová

1 fľaštička (8 ml) s roztokom 0,5 mol.l⁻¹ kyseliny sírovej. Je pripravený na použitie.

PRÍPRAVA VZORIEK

Súprava je určená na stanovenie vzoriek krvného séra. Čerstvé vzorky sa v priebehu stanovenia uskladňujú do 72 hodín pri 2-8 °C. Vzorky séra sa dlhodobo uskladňujú pri -20°C. Tieto po rozmrazení viackrát nezamrazujte. Na stanovenie nepoužívajte lipemické, hemolyzované alebo kontaminované krvné séra. Pacientske séra sa riedia 1:101, t.j. 10 µl séra sa zriedi prídavkom 1 ml zriedovacieho roztoku.

DOPORUČENIE PRE PRÁCU SO SÚPRAVOU

- Všetky reagenty musia byť pred začiatkom stanovenia vytemperované na laboratórnu teplotu.
- Všetky inkubácie sa robia pri laboratórnej teplote 18 - 25°C.
- Odporúčame, aby sa štandardy, negatívna, pozitívna vzorka a pacientske séra spracovali v duplikátoch.
- Pracujte s presnými pipetami.
- Zabráňte mechanickému poškodeniu stripov.
- Nepoužitý stripy uchovávajte v obale spolu s vysušovadlom.
- Po ukončení premývania je dôležité dôkladne odstrániť vymývacie roztok zo stripov.

PRACOVNÝ POSTUP

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

Poznámka: Pokiaľ nie je k dispozícii špeciálna premývačka pre mikrotitračné doštičky, premývanie spočíva v napipetovaní cca 250 µl vymývacieho roztoku do všetkých použitých jamiek. Po 30 sekundách sa vymývací roztok zo stripov prudko vyleje. Postup sa opakuje ešte 3x.

4. Po ukončení premývania mikrotitračnú doštičku otočte hore dnom a okraje osušte filtračným papierom.
5. Do jamiek napipetujte po 100 µl konjugátu HRP-anti-IgA resp. HRP-anti-IgG a inkubujte pri laboratórnej teplote 30 minút.
6. Stripy znova 4x premyte vymývacím roztokom a osušte podľa bodu 4.
7. Do jamiek napipetujte bez prerušenia po 100 µl substrátu TMB. Pipetovanie musí byť ukončené do 2 minút!
8. Vyfarbuje sa 15 min v tme.
9. Reakcia sa zastaví pridaním 50 µl kyseliny sírovej do každej jamky.
10. 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 – 690 nm. Meranie ukončíte najneskôr do 1 hod po skončení vyvíjania. Doštičku medzitým uschovajte v tme.

INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

- Keď nie je k dispozícii program na zostrojenie kalibračnej závislosti, použite nasledovný postup.
- Vypočítajte priemerné absorbancie pre každý štandard, kontrolné a patientske vzorky.
- Nakreslite štandardnú krivku na semilogaritmický papier vynesím logaritmu koncentrácií štandardov (U.ml⁻¹) na horizontálnu (x) os proti priemerným absorbanciam štandardov na vertikálnu (y) os.
- 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. Avšak, aj u asymptomatických, zjavne zdravých osôb môžu byť zvýšené hladiny protilátok proti gliadínu.

Odporúčame nasledovné hodnotenie:

Negatívne hodnoty < 13 U.ml⁻¹

Hraničná hodnota 13 – 15 U.ml⁻¹

Pozitívne hodnoty > 15 U.ml⁻¹

Hodnoty boli získané spracovaním 200 sér zdravých jedincov.

Tieto hodnoty by mali byť považované len za orientačné. Každé laboratórium by si malo stanoviť vlastné rozpätie normálnych hodnôt na základe klinicky charakterizovaných vzoriek.

KONTROLA KVALITY STANOVENIA

- Absorbancia nulového štandardu by mala byť menej ako 0,2.
- Absorbancia najvyššieho štandardu by mala byť viac ako 0,8.
- Hodnoty koncentrácií negatívnej a pozitívnej kontrolnej vzorky sa musia pohybovať v intervale koncentrácií uvedenom v Osvedčení o súprave.

CHARAKTERISTIKA STANOVENIA

Štandardizácia

Štandardy v súprave ELISA-anti-GLIADÍN deamidovaný-II-A,G sú kalibrované proti internému referenčnému štandardu.

Merací rozsah

5 - 80 U.ml⁻¹.

Citlivosť

Detekčný limit súpravy je 4 U.ml⁻¹.

Špecificita

Súpravou stanovujeme protilátky triedy IgA a IgG proti antigénu deamidovanému peptidu gliadínu.

Opakovateľnosť

INTRA-ASSAY	A		B		C	
	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG
Počet stanovení	16	16	16	16	16	16
Priemer U.ml ⁻¹	17,24	6,66	45,09	24,85	89,81	38,09
SD U.ml ⁻¹	0,41	0,50	2,65	1,11	3,71	1,98
C.V. %	2,38	7,51	5,88	4,47	4,13	5,20

Reprodukovateľnosť

INTER-ASSAY	A		B		C	
	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG
Počet stanovení	10	10	10	10	10	10
Priemer U.ml ⁻¹	17,34	7,21	43,07	25,16	84,64	58,29
SD U.ml ⁻¹	1,47	1,12	2,27	3,04	5,58	10,50
C.V. %	8,48	15,53	5,27	12,08	6,59	18,01

Recovery

Metódou štandardného prídavku sa získajú hodnoty 80 - 120%.

UPOZORNENIE

- Súprava je určená pre profesionálne in vitro použitie v laboratóriu.
- V prípade výskytu nežiaducich príhod, tieto hláste na č. tel. +421 55 6228 131, biogema4@biogema.sk
- 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, v koncentrácii 0,5 mol.l⁻¹, môže pri priamom kontakte s očami alebo pokožkou spôsobiť podráždenie. V prípade zasiahnutia očí alebo kože postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.
- Azid sodný, timerosal a kyselina sírová v koncentráciách, ktoré sú použité v súprave, sú zdraviu škodlivé. Vzhľadom k nízkemu obsahu škodlivých látok v substanciách súpravy životné prostredie nie je ohrozené.
- Kontrolné vzorky a štandardy obsahujú ľudské sérum. Ľudské sérum použité na prípravu kontrolných vzoriek a štandardov vykazovalo negatívnu reakciu na prítomnosť antigénu HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV. Žiadna metóda stanovenia však nie je schopná dať stopercentnú istotu, preto so substanciami obsahujúcimi ľudské sérum pracujte ako s infekčným materiálom, pri práci používajte rukavice.
- Výrobca ručí za výsledky dosiahnuté súpravou ELISA-anti-GLIADÍN deamidovaný-II-A,G len v prípade dodržiavania návodu a skladovacích podmienok. Reagencie nepoužívajte po uplynutí expiračnej doby.

LIKVIDÁCIA ODPADU

Nepoužité zvyšky patientskych vzoriek a substancie obsahujúce ľudské sérum likvidujte ako infekčný materiál, ostatný materiál a nepoužité zvyšky súpravy obsahujúce nebezpečné chemické látky odporúčame tiež zabezpečiť v súlade s ustanoveniami zákona NR SR č. 223/2001 Z.z. a vyhlášky MŽP SR č. 284/2001 Z.z.

SKLADOVANIE A STABILITA

Súpravu skladujte pri 2 – 8 °C. Doba expirácie súpravy je 12 mesiacov odo dňa výroby, ak sú substancie v pôvodnom stave. Neodporúčame kombinovať substancie viacerých šarží.

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., Zaviacič,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 ambulancnej 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

 EN ISO 9001 v platnom znení	Certifikovaný systém manažérstva kvality	 Pozri návod na používanie	 Podniková norma
 EN ISO 13485 v platnom znení	Certifikovaný systém manažérstva kvality pre zdravotnícke pomôcky	 Nepoužívať opakovane	 Použiteľné do
 CE	Značka zhody so Smernicou Európskeho parlamentu a Rady 98/79/ES a NV SR č. 569/2001 Z.z.	 Diagnostická zdravotnícka pomôcka <i>in vitro</i>	 Jednorazový obal po použití vyhodit' do príslušnej zbernej nádoby
 -20°C $+25^{\circ}\text{C}$	Obmedzenie teploty	 Výrobca	 Zelený bod
 Dátum výroby	Dátum výroby	 Kód dávky	 Recyklovateľný obal
 Chrániť pred slnkom	Chrániť pred slnkom	 Katalógové číslo	 Varovanie
 CONTROL+	Pozitívna kontrola	 Obsah postačuje na n skúšok	 Štandardy
 CONJUGATE	Konjugát HRP	 Negatívna kontrola	 Kyselina sírová
 WASHBUF	Vymývaví roztok	 Substrát TMB	 Mikrotitračná dosička potiahnutá antigénom
		 Zriedovaví roztok	

Odporúčania na spracovanie súprav na ELISA automatoch.

Nastavenie teploty v automatizovanom systéme musí byť zabezpečené tak, aby bolo v súlade s odporúčanou teplotou uvedenou v návodoch pre spracovanie súprav.

Odporúčame zabezpečiť aby substrát v automate nebol vystavený svetlu a aby sa tým eliminovala možnosť jeho znehodnotenia (zmodranie na svetle). Odporúčame mať počas spracovania súpravy zatvorený hlavný kryt automatizovaného systému.

Pre každé spracovanie súpravy použiť a nariediť iba potrebné množstvo čerstvých substancií. Ak už vzniknú prebytky z predchádzajúcich meraní (napr. vymývacieho roztoku, štandardov ...) neodporúčame na ďalšie použitie aj keď boli uskladnené v chlade.

Pred samotným spracovaním v automatizovanom systéme je dôležité dodržať odporúčania ohľadne vytemperovania substancií (vplyv na presnosť merania) a mikrotitračnej platničky (eliminovať možnosť kondenzátu po vybratí z uskladnenia v chlade).

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

Odsledovať časový priebeh jednotlivých krokov v rámci spracovania súpravy v automatizovanom systéme či korešponduje s odporúčaným postupom uvedeným v návode (hlavne po fáze premývania by mala byť hneď pridaná príslušná substancia - konjugát, substrát). V prípade nesúladu konzultovať správne programové nastavenia so servisným technikom.

Skontrolovať správny priebeh každého kroku spracovania súpravy v automatizovanom systéme – napr. nevšimnutie si, že sú zlepené prírodné hadičky spôsobí zlé premytie platne.



BIOGEMA, výrobné družstvo, Košice

Garbiarska 2, 040 01 Košice, SR

Tel.: +421 55 - 633 6753, 622 5719, 622 8131

e-mail: biogema3@biogema.sk www.biogema.sk



01/2022

BIOGEMA CZ, s.r.o.

Šromova 803/1b, 643 00 Brno

Tel.: +420 545 578 255, mobil +420 603 973 047

e-mail: biogema@biogema.cz www.biogema.cz

Distribúcia v ČR