



ImmuLisa™ Anti-human Tissue Transglutaminase Antibody (hu tTG) IgG ELISA

IVD

CLIA Complexity: High
CDC Analyte Identification Code: 0546
CDC Test System Identification Code: 28569

PRODUCT INSERT

REF *Code:* 1144G **IgG-tTG** 96 Determinations

INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and semi-quantitation of anti-human Tissue Transglutaminase IgG antibodies in human serum to aid in the diagnosis of celiac disease (CD) in patients with IgA deficiency.

SUMMARY AND EXPLANATION

Celiac Disease (CD) is an autoimmune gastrointestinal disorder that may occur in genetically susceptible individuals triggered by the ingestion of gluten-containing grains such as wheat, barley and rye. CD is characterized by malabsorption resulting from inflammatory injury to the small intestinal mucosa and, when prolonged, can cause malnutrition. The classical symptoms of CD include diarrhea, weight loss and malnutrition. Only a small percentage of patients with CD, however, presents with classical symptoms. Studies have found the prevalence of CD to be highly variable from population to population¹. The true prevalence has been difficult to ascertain. If only the clinical criteria are used in determining prevalence, the incidence of CD is much lower as compared with incidence established by serological methods^{1,2}. Using serological methods the incidence of CD in the general population is approximately one in 200. Failure to diagnose CD early may predispose an individual to long-term complications such as splenic atrophy and intestinal lymphoma. A gluten-free diet (GFD) normalizes the mucosa and helps reduce the malignant potential^{3,4}. Histological examination of the small intestinal biopsy remains the gold standard for diagnosing CD, but it has limitations. Of these include some patients with latent or even active CD that may have normal histopathology⁵.

The revised European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) criteria include only a single biopsy with clear-cut remission of clinical symptoms on GFD⁶. Positive serology at the time of diagnosis with disappearance on GFD contributes to the diagnosis. The various serological tests employed in the work-up of patients suspected to have CD include anti-gliadin antibody (AGA), anti-endomysial antibody (EMA), anti-reticulin antibody (ARA) and anti-tissue transglutaminase (tTG) antibody tests.

Since identification of tTG as the endomysial antigen, ELISA methods have been described for detecting antibodies in the sera of patients with CD. The advantage of the anti-tTG antibody assay is that it is automatable and less subjective than EMA. For this reason, many laboratories have opted to use the tTG antibody method as the screening assay. In various studies on the efficacy of the tTG antibody method for screening for CD, the specificity and sensitivity of this method has been found to range from 90 to 95%⁷. Human tTG has been described to improve the sensitivity of the tTG antibody assay for CD.

The limitations of the current serological methods, however, are that these methods, with the exception of IgG anti-gliadin antibodies, detect the IgA isotype of the antibodies; hence, IgA deficient CD patients may yield false negative serology⁸. This may compromise the utility of the serum antibody methods in detecting all CD cases^{9,10}. IgA deficiency is one of the most

common immunodeficiencies, found in one in 500-700 healthy blood donors¹¹⁻¹³. The incidence of IgA deficiency in CD patients is somewhere between 2-3%, representing a 10-15 fold increase over the general population. To prevent false negative results in such cases, it is necessary to have simple, reliable serological methods of detecting IgG antibodies.

PRINCIPLES OF PROCEDURES

The anti-hu tTG antibody test is performed as a solid phase immunoassay (ELISA). Microwells are coated with recombinant hu tTG antigen followed by blocking the unreacted sites to reduce nonspecific binding. Controls, calibrators and patient serum samples are incubated in the antigen coated wells which allows anti-tTG antibodies present in the serum to bind. Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Antibodies bound to the microwells are detected by adding enzyme labeled anti-human IgG conjugate to the wells. These enzyme conjugated antibodies bind specifically to the human immunoglobulin of the appropriate class. Unbound enzyme conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies to hu tTG is detected by a color change produced by the conversion of the pNPP substrate. The reaction is stopped and the intensity of color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in ELISA units per milliliter (EU/ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell strips are for one time use only.

Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials⁹. **WARNING** - Sodium azide (Na₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from IMMCO DIAGNOSTICS.

Use good laboratory techniques to minimize microbial and chemical contamination.

Do not use after expiration date.

Materials Provided

ImmuLisa™ IgG-tTG ELISA **REF** 1144G

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

- | | | |
|-------------------|--------------------------------|---|
| 12 x 8 | MICROPLATE tTG | Micropate with individual breakaway microwells coated with hu tTG antigen. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR A IgG-tTG *† | Ready to use Calibrator A (<i>green cap</i>). Human serum containing antibodies to tTG. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR B IgG-tTG *† | Ready to use Calibrator B (<i>violet cap</i>). Human serum containing antibodies to tTG. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR C IgG-tTG *† | Ready to use Calibrator C (<i>blue cap</i>). Human serum containing antibodies to tTG. |

1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D IgG-tTG **	Ready to use Calibrator D (<i>yellow cap</i>). Human serum containing antibodies to tTG.
1 x 1.5 ml	CONTROL + IgG-tTG **	Ready to use Positive Control (<i>red cap</i>). Contains human serum positive for tTG.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use Negative Control (<i>white cap</i>). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS **	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL *	Ready to use Serum Diluent . Color coded blue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light .
1 x 12 ml	STOP	Ready to use Stop Solution .
2	BUF WASH	Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.

* Contains < 0.1% NaN₃

Materials Required But Not Provided

- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Deionized or distilled water
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Timer
- Absorbent paper
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

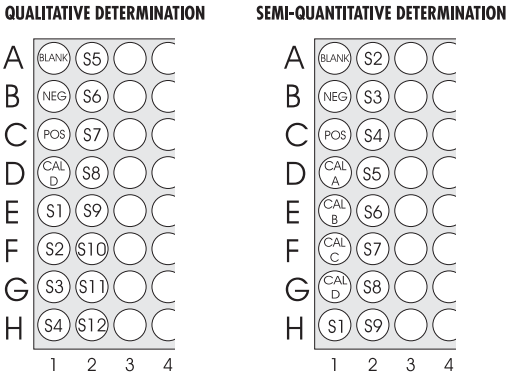
Procedural Notes

- Before starting the assay read these instructions carefully.
- Bring all reagents and samples to room temperature (20-26°C) for 30 minutes. Return materials to refrigerator immediately after use.
- Prepare all dilutions of the patient specimens before starting the test.
- **Immediately return unused strips to the pouch containing desiccants and seal securely to minimize exposure to water vapor.**
- Wash step: Good technique is critical. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- Careful timing is important. Incubation periods begin after dispensing reagents.

Assay procedure

1. **ALL REAGENTS MUST BE BROUGHT TO ROOM TEMPERATURE (20-26°C) PRIOR TO BEGINNING THE ASSAY.**
2. Label protocol record to indicate specimen placement in the microplate. It is good laboratory practice to test specimens in duplicate.

3. **Qualitative determination:** use only Calibrator D.
Semi-quantitative determination: use Calibrators A - D as shown in the example below.



- Prepare a **1:51** dilution of the patient specimen by mixing **10 µl** of the patient specimen with **0.5 ml** of Serum Diluent.
 - Add **100 µl** of Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient specimens to the appropriate microwells indicated on the protocol record.
- Note:** Include one well with **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank. The absorbance of this well should not be greater than 0.3.
- Incubate **30 minutes** (\pm 5 minutes) at room temperature on a level surface.
 - Wash step: Thoroughly aspirate the contents of each well. Add 200-300µL of the **reconstituted** wash buffer to all wells then aspirate. Repeat this sequence thrice more for a total of four washes. Invert the plate and tap it on absorbent material to remove any residual fluid after the last wash. Do not dry wells completely.
 - Add 100µL of the Conjugate to each well.
 - Incubate the wells for 30 minutes.
 - Wash step: Repeat step 7.
 - Add 100µL of Enzyme Substrate to each well.
 - Incubate for 30 minutes at room temperature.
 - Add 100µL of Stop Solution to each well. Maintain the same sequence and timing of Stop Solution addition as was used for the Enzyme Substrate. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm within one hour of stopping the reaction.
 - Read the absorbance (OD) of each well at 405nm using a single or dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. Calibrator A should have an absorbance reading \geq 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <20 EU/ml. If the test is run in duplicate, take the mean of the two readings to determine the concentration of anti-hu tTG antibodies. While performing qualitative determinations, the optical density of Calibrator D must be greater than that of the negative control and less than the positive control. For semi-quantitative determinations, the positive control must give values in the range stated on the vial. We recommend borderline samples be tested with a fresh sample taken at a later date to ensure accuracy.

RESULTS

Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{EU/ml of Calibrator D} = \text{EU/ml Test Sample}$$

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value. See Figure 1 at the end of this document for a sample standard curve.

Calibrator

The calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each test. Patient specimens containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such specimens should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

Interpretation

The following information serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values.

Anti-tTG Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/ Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/ Indeterminado/Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The Immulisa™ anti-hu tTG assay should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. The method should be used for testing human serum samples only. Results obtained serve only as an aid in the diagnosis and should not be interpreted as diagnostic in themselves. In CD patients who are not IgA deficient the anti-hu tTG IgG ELISA may be negative and in such cases tests for IgA anti hu tTG antibodies be made.

EXPECTED VALUES

The expected values in a normal population are negative (<20 EU/ml for adults and children). However, it has been determined that some apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive for IgA anti-tTG antibodies.

The incidence of anti-tTG antibodies has been studied by various investigators and the findings are summarized in Table 1 at the end of this document.

The incidence and the levels of anti-tTG antibodies is dependent upon the diet status. The levels of these antibodies decrease and eventually will become negative in patients with CD who are on a gluten-free diet. Similarly, the levels of these antibodies will increase and may become positive when patients with CD who were on a gluten-free diet ingest a gluten-containing diet^{15,18,19}.

The approach in Figure 1 at the end of this document may be used as an algorithm for serological diagnosis of CD.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the Immulisa IgG anti-hu tTG Antibody ELISA was determined by comparing the results with:

- a) Clinical findings.
- b) Another commercially available IgG anti-hu tTG ELISA method.

Normal Range: The normal range was established by testing 66 serum samples from apparently healthy donors obtained from the Red Cross. The mean plus three standard deviations of the mean of this normal population was used to determine the cut-off between normal and borderline positive individuals.

Comparative Specificity and Sensitivity

A. Clinical Correlation: A total of 250 serum specimens obtained on patients with CD with and without IgA-deficiency, various disease controls and normal subjects were tested for IgG anti-hu tTG antibodies. The disease controls included sera from patients with clinical diagnosis of the blistering diseases pemphigus, pemphigoid, and another dermatological disorder, psoriasis. IgG anti-hu tTG antibodies were detected in patients with CD. Of these, all CD patients with IgA-deficiency results were positive, in addition a significant number of patients with CD who are not IgA-deficient were also positive for IgG anti-hu tTG antibodies. Three normals who were found positive were weakly positive. See table 2 at the end of this document.

B. Immulisa IgG anti-hu tTG ELISA vs. other commercial IgG anti-hu tTG ELISA method: A total of 68 samples were tested on the Immulisa IgG anti-hu tTG ELISA and another commercially available kit. Seven of the eight samples positive on IMMCO and negative on the other ELISA were sera from patients with IgA-deficient CD and DH. See table 3 at the end of this document.

C. Cross Reactivity: A total of 30 samples, 10 each positive for antinuclear, anti-BMZ and anti-IC antibodies were tested for anti-hu-tTG antibodies. None were found positive.

Precision:

Based on 10 replicates, the intra-assay and inter-assay Coefficient of Variation (CV) of the Immulisa IgG anti-hu tTG ELISA test were calculated. See table 4 at the end of this document.

Linearity:

To determine acceptable linearity, plates were assayed with calibrators of known values. The r^2 values of the standard curve were determined. An r^2 value greater than 0.95 is deemed to be acceptable. The average r^2 value for this assay 0.9816. No value was lower than 0.9595.

Recovery:

Samples with known IgG anti-hu tTG antibody concentrations were mixed with appropriate dilutions of another positive sample with known amounts of IgG anti-hu tTG antibody. Antibody levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery calculated. See table 5 at the end of this document.



IMMCO
DIAGNOSTICS

REF 1144G

ImmuLisa™ Anti-Transglutaminasi Tissutale (tTG) Anticorpi IgG ELISA

IVD

IgG-tTG 96 Determinations

ImmuLisa™ tTG IgG ELISA è un test immunoenzimatico per la ricerca semi-quantitativa di anticorpi anti-tTG nel siero umano. La rilevazione di questi anticorpi rappresenta un aiuto nella diagnosi di malattia celiaca (CD) in pazienti con la IgA-mancanza.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

CD è un disordine gastrointestinale autoimmune che può accadere in individui geneticamente suscettibili innescati dall'ingestione dei grani contenenti glutine quali frumento, orzo e segale. Il CD è caratterizzato dal malassorbimento derivando dalla ferita infiammatoria al piccolo mucosa intestinale e, una volta prolungato, può causare la malnutrizione. I sintomi classici del CD includono la diarrea, la perdita del peso e la malnutrizione. Soltanto una piccola percentuale dei pazienti con il CD si presenta con i sintomi classici.

Gli studi hanno trovato la prevalenza del CD per essere altamente variabili da popolazione a popolazione.¹ La prevalenza allineare è stato difficile da accertare. Se i test di verifica clinici da solo sono usati nella determinazione della prevalenza, l'incidenza del CD è molto più bassa rispetto all'incidenza stabilita con i metodi sierologici.^{1,2} metodo sierologico usando, l'incidenza del CD nella popolazione in genere è circa uno in 200. L'omissione di diagnosticare il CD nella fase iniziale può predisporre un individuo alle complicazioni di lunga durata quali linfoma intestinale. Una dieta glutine-libera (GFD) normalizza il mucosa e gli aiuti riduce il potenziale maligno. L'esame istologico di piccola biopsia intestinale rimane la parità aurea per la diagnostica del CD, ma presenta le relative proprie limitazioni. Questi includono alcuni pazienti con il CD latente o persino attivo che può avere istopatologia normale.⁵

ESPGHAN modificato dei test di verifica include soltanto una singola biopsia con la remissione definita dei sintomi clinici su GFD⁶. La sierologia positiva ai tempi della diagnosi con la scomparsa su GFD contribuisce alla diagnosi. Le varie prove sierologiche per il CD includono l'anticorpo anti-gliadina (AGA), l'anticorpo anti-endomysial (EMA), l'anticorpo anti-reticulina (ARA) e prove dell'anticorpo anti-tTG.

Da identificazione di tTG come l'antigene endomisio, i metodi del ELISA sono stati descritti per la rilevazione degli anticorpi nei sieri dei pazienti con il CD. Il vantaggio dell'analisi dell'anticorpo anti-tTG è che è automatizzato e meno soggettivo che EMA. Per questo motivo, molti laboratori hanno scelto usare il metodo dell'anticorpo tTG come il metodo di vagliatura. In vari studi sull'efficacia del metodo dell'anticorpo tTG per selezionare per il CD, la specificità e la sensibilità di questo metodo è stata trovata per variare da 90 a 95 %.

I metodi sono limitati, con l'eccezione di AGA IgG. Rilevano soltanto gli anticorpi di IgA. I pazienti con CD carenti del IgA di possono ricevere i risultati negativi falsi. Ciò può compromettere il programma di utilità dei metodi del Se nella rilevazione di tutti i pazienti del CD^{9,10}. La mancanza di IgA è comune. È trovato in uno in 500-700 donatori di anima in buona salute¹¹⁻¹³. L'incidenza nei pazienti del CD è fra 2-3%. Quello è 10x l'incidenza nella popolazione in genere. Per impedire i risultati negativi falsi è necessario da avere metodi sierologici semplici e certi per la rilevazione degli anticorpi di IgG.

PRINCIPIO DELLA METODICA

L'antigene tTG ricombinante è adsorbito sulla parete dei pozzetti di una piastra microtiter di

polistirene. La piastra è ostruita per ridurre le reazioni di non-specifico. I controlli, I calibratori, i sieri diluiti dei pazienti vengono distribuiti nei pozzetti corrispondenti, consentendo agli anticorpi anti- tTG eventualmente presenti di legarsi all'antigene adsorbito. L'eccesso di campione non legato viene allontanato mediante il lavaggio e successivamente si aggiunge a ciascun pozzetto un anticorpo anti-IgG umane marcato con un enzima. Questo l'enzima ha coniugato gli anticorpi si lega specificamente all'immunoglobulina umana del categoria IgG. Dopo ulteriore lavaggio per allontanare l'eccesso di anticorpi umane marcati con l'enzima, il substrato enzimatico specifico (pNPP) allora è aggiunto ai pozzetti. Dopo aver interrotto la produzione enzimatica del prodotto colorato si determina la presenza o l'assenza di anticorpi anti-tTG confrontando la densità ottica del campione con quella di una curva di calibrazione standard a 4 punti. I risultati sono riportati in modo semi-quantitativo in unità ELISA (EU/ml).

REAGENTI

Condizioni di conservazione

Conservare tutti i reagenti del kit a 2-8°C. Non congelare. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.

Non usare se il reagente non è chiaro.

Tampone di lavaggio: Aggiungere l'acqua distillata o deionizzata per il volume del 1L.

Microstrips: Usare una volta soltanto.

Precauzioni

Tutte le fonti umane di materiali usati nella preparazione dei controlli per questo prodotto sono state testate e sono risultate negative per la presenza di anticorpi anti-HIV, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV mediante metodi approvati dall'FDA. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali⁹ potenzialmente infettivi.

La sodio azide è usata come conservante. La sodio azide è un veleno e può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Lasciar scorrere grandi quantità di acqua, se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, per prevenire la formazione di azidi.

La sostituzione di componenti diversi da quelli forniti nel kit può causare risultati non attendibili. Usare le buone tecniche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e chimica.

Non usare dopo la data di scadenza.

Materiali forniti

ImmuLisa™ IgG-tTG ELISA **REF** 1144G

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	MICROPLATE IgG-tTG	microstrips da 96 pozzetti individuali con antigene tTG
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A IgG-tTG * †	calibratore A (protezione verde), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B IgG-tTG * †	calibratore B (protezione viola), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C IgG-tTG * †	calibratore C (protezione blu), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D IgG-tTG * †	calibratore D (protezione gialla), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CONTROL + IgG-tTG * †	controllo positivo (protezione rossa), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	controllo negativo (protezione bianca), pronto al uso, contiene siero umano.

1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS * †	coniugato fos. alc. Colore rosa codificato colore.
1 x 60 ml	DIL *	diluyente per campioni. Colorare l'azzurro codificato.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	substrato enzimatico. Contiene il pNPP. Proteggere da luce.
1 x 12 ml	STOP	soluzione bloccante
2	BUF WASH	tampone di lavaggio per 1 litro/fiala
*	Contiene < 0.1% NaN ₃	

Materiali richiesti ma non forniti

- Micropipette in grado di erogare volume di 5 – 1000 µL
- Puntali monouso per micropipette
- Provette per la diluizione dei sieri, volume 4mL
- Acqua distillata o deionizzata
- Lettore per piastre ELISA in grado di leggere a 405nm
- Bottiglia per tampone di lavaggio
- Temporizzatore
- Carta assorbente

Raccolta dei campioni

Questa tecnica deve essere usata con un campione di siero. Campioni con segni di contaminazione microbica, trattati con calore o contenenti particelle visibili non dovrebbero essere usati. Si dovrebbe evitare anche l'uso di sieri fortemente emolizzati o lipemici. Conservare i campioni a temperatura ambiente per non più di 8 ore. Se il test non può essere eseguito entro 8 ore, conservare i campioni in frigorifero a 2-8°C. Se il test non può essere eseguito entro 48 ore, oppure per la spedizione dei campioni, congelare a -20°C. Evitare il congelamento ripetuto e lo scioglimento.

METODICA

Prima di incominciare

- Prima di cominciare l'analisi ha letto con attenzione queste istruzioni.
- Portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (20-26°C) per 30 minuti. Materiali di ritorno al frigorifero subito dopo di uso.
- Preparare tutte le diluizioni degli esemplari pazienti prima di iniziare la prova.
- **Rimettere immediatamente la strisce inutilizzate nella busta contenente il materiale essicante e sigillarla bene per minimizzare l'esposizione all'umidità ambientale.**
- Lavaggio: La buona tecnica è critica. Una rondella automatizzata del piastra microtiter ELISA è suggerita.
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di trasporto delle 8 posizioni simultaneamente. Ciò accelera il processo e provvede ad un più tempo di incubazione dell'uniforme.
- La sincronizzazione attenta è importante. I periodi di incubazione cominciano dopo l'erogazione del reagentes.

Esecuzione del test

1. **TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) PRIMA DI INIZIARE IL TEST.**
2. Usare l'annotazione di protocollo per notare la posizione degli esemplari nel piastra microtiter. È buona pratica del laboratorio verificare gli esemplari due volte.
3. **Determinazione qualitativa:** usare soltanto Calibratore D.
Determinazione semi-quantitativa: usare Calibratori A - D come indicato nell'esempio qui sotto.

Determinazione qualitativa

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

Determinazione semi-quantitativa

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

4. Preparare una diluzione di **1:51** dei campioni mescolando **10 µl** dei campioni con **0.5 ml** di diluente per campioni.
 5. Distribuire **100 µl** di ciascuno dei calibratori, dei campioni diluiti, del Controllo Negativo e del Controllo Positivo nei pozzetti corrispondenti.
- Nota:** Includere una posizione con **100 µl** del diluente per campioni come spazio in bianco del reagente. Il valore zero del lettore del piastra microtiter dovrebbe essere regolato usando questa posizione. La capacità di assorbimento di questo pozzetto non dovrebbe essere più grande di 0.3.
6. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente su una superficie piana.
 7. Lavaggio: Aspirare completamente il contenuto di ciascun pozzetto. Distribuire 200-300µl di soluzione di lavaggio in tutti i pozzetti e quindi aspirarla. Ripetere questa operazione per altre tre volte, per un totale di quattro lavaggi. Dopo l'ultimo lavaggio capovolgere la piastra e scuoterla fermamente su tovaglioli di carta assorbente per rimuovere eventuali residui di liquido. Non asciugarsi pozzetti completamente.
 8. Distribuire 100µl di Coniugato in ciascun pozzetto.
 9. Incubare i pozzetti per 30 minuti.
 10. Lavaggio: Ripetere la procedura descritta al punto 7.
 11. Distribuire 100µl di substrato enzimatico in ciascun pozzetto
 12. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
 13. Distribuire 100µl di soluzione bloccante in ogni pozzetto. Per l'aggiunta della soluzione bloccante mantenere la stessa sequenza e gli stessi tempi utilizzati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza (OD) entro 1 ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.
 14. Leggere l'assorbanza (OD) di ciascun pozzetto a 405nm usando un singolo o lettore doppio del piastra microtiter di lunghezza d'onda contro l'insieme in bianco del reagente alla capacità di assorbimento zero.

RISULTATI

Calcolo dei risultati

Le concentrazioni dei campioni pazienti possono essere determinate da uno di due metodi:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

OD di Esemplare

_____ X EU/ml de Calibratore D = EU/ml di Esemplare
OD di Calibratore D

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Capacità di assorbimento del diagramma di calibratores da A a D contro la loro concentrazione rispettiva su una carta da grafico lineare-lineare. Tracciare la concentrazione EU / ml sull'X-asse contro la capacità di assorbimento sull'Y-asse e disegnare la curva adatta migliore. Determinare le concentrazioni dei campioni pazienti dalla curva contro il relativo valore corrispondente di capacità di assorbanza. Vedere Figure 1 all'estremità di questo documento per una curva di campione.

Calibratore

I calibratori sono inclusi per fornire semi - la quantificazione e devono essere usati con ogni prova. Gli esemplari pazienti che contengono i livelli elevati dell'anticorpo possono dare i valori di capacità di assorbanza più grandi di quello del calibratore A. Per che determina i valori semiquantitativi esatti tali esemplari dovrebbe più ulteriormente essere diluito in modo da fanno parte della gamma della curva del calibratore una volta riprovati. Per determinazione EU / ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

Interpretazione

Le seguenti informazioni servono soltanto da guida nell'interpretazione dei risultati del laboratorio. Ogni laboratorio deve determinare i relativi propri valori normali.

Anti-tTG	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

Limitazioni del test

Questa tecnica deve essere usata con un campione di siero. Campioni con segni di contaminazione microbica, trattati con calore o contenenti particelle visibili non dovrebbero essere usati. Si dovrebbe evitare anche l'uso di sieri fortemente emolizzati o lipemici. Non è possibile giungere alla diagnosi solo sulla base dei risultati del test tTG. I pazienti del CD che non sono IgA-carente possono essere negativi sul anti-hu tTG IgG ELISA. Esaminare a IgA anti-hu tTG antibodies in questi casi.

VALORI

I valori previsti in una popolazione normale sono negativi (< 20 EU/ml per gli adulti ed i bambini). Tuttavia, è stato determinato che alcuni individui apparentemente in buona salute e asintomatici potessero verificare il positivo ad anticorpi anti-tTG IgG.

L'incidenza degli anticorpi anti-tTG è stata studiata dai vari ricercatori ed i risultati sono ricapitolati in Table 1 all'estremità di questo documento.

L'incidenza ed i livelli degli anticorpi anti-tTG dipende dalla condizione di dieta. I livelli di questi anticorpi diminuiscono e finalmente diventeranno negativi in pazienti con il CD che sono su una dieta glutine-libera. Similmente, i livelli di questi anticorpi aumenteranno o gli anticorpi anti-tTG diventano positivi quando i pazienti con il CD che erano su una dieta glutine-libera ingerisce una dieta contenente glutine ^{15,18,19}.

Poichè ci sono parecchi anticorpi connessi con il CD, la procedura nella Figure 2 all'estremità di questo documento può servire da guida nell'interpretazione di vari risultati della prova per il CD.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONI

Il programma di utilità del ImmuLISA anti-tTG IgG Anticorpo ELISA è stato determinato paragonando i risultati a:

- a) Risultati clinici
- b) un altro metodo disponibile in commercio del anti-tTG IgG Anticorpo ELISA

Gamma Normale: La gamma normale è stata stabilita esaminando 66 campioni del siero dai donatori apparentemente in buona salute ottenuti dal Red Cross. Il taglio è uguale il valore medio + 3 STD di questi campioni.

Comparativo Specificità e Sensibilità

A. Correlazione Clinica: Un totale di 250 esemplari del siero ottenuti sui pazienti con il CD con e senza la IgA-mancanza, i vari comandi di malattia e gli oggetti normali sono stati esaminati ad anticorpi del IgG anti-hu tTG. La malattia controlla i sieri inclusi dai pazienti con la diagnosi clinica del pemfigo, del pemphigoid e di un altro disordine dermatologico, psoriasi. Gli anticorpi IgG anti-hu tTG sono stati rilevati in pazienti con il CD. Di questi, tutti i pazienti del CD con i risultati di IgA-mancanza erano positivi, in più un numero significativo di pazienti con CD che non sono IgA- carente era inoltre positivo per gli anticorpi IgG anti-hu tTG. Tre normali che erano positivo trovato erano debolmente positivo. Vedere la tabella 2 all'estremità di questo documento.

B. Immulisa IgG anti-hu tTG ELISA contro l'altro methodo commerciale di IgG anti-hu tTG ELISA: Un totale di 68 campioni è stato esaminato sul Immulisa IgG anti-hu tTG ELISA e su un altro corredo disponibile in commercio. Sette degli otto campioni positivi su IMMCO e sulla negazione sull'altro ELISA erano sieri dai pazienti con il CD ed il DH IgA-carenti. Vedere la tabella 3 all'estremità di questo documento.

C. Reattività: Un totale di 30 campioni, ciascuno positivo 10 per antinucleare, anti-BMZ ed anticorpi di anti-IC sono stati esaminati ad anticorpi del anti-hu-tTG. Nessun sono stati trovati positivi.

Precisione:

Sulla base di 10 repliche, l'intra-analisi ed il coefficiente di variazione di inter-analisi (cv) della prova Immulisa IgG anti-hu tTG ELISA sono stati calcolati. Vedere la tabella 4 all'estremità di questo documento.

Linearità:

Per determinare le linearità accettabili, le piastre si sono analizzate con i calibratori dei conosciuti. I valori r^2 della curva standard sono stati determinati. r^2 valore più notevolmente di 0.95 è ritenuto per essere accettabile. Il valore medio r^2 per questa analisi 0.9816. Non c'era nessun valore più basso di 0.9595.

Recupero:

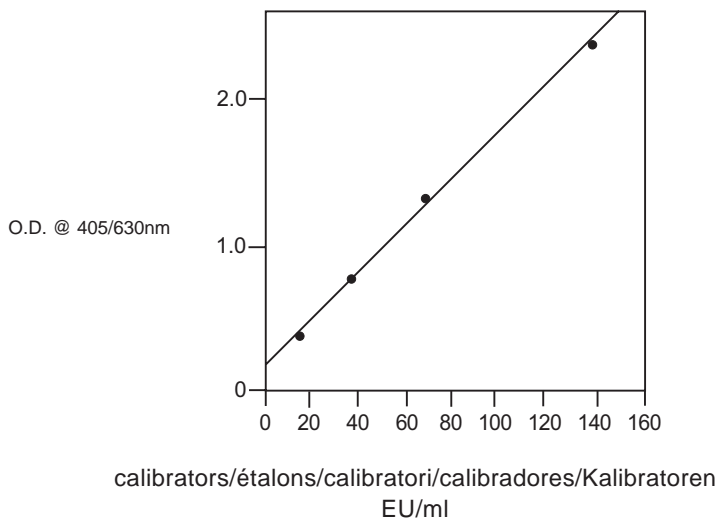
I campioni con le concentrazioni conosciute nell'anticorpo IgG anti-hu tTG sono stati mescolati con le diluzioni adatte di un altro campione positivo con gli importi conosciuti dell'anticorpo IgG anti-hu tTG. I livelli anticorpi dei campioni misto sono stati determinati e dai valori ha ottenuto il recupero di percento calcolato. Vedere la tabella 5 all'estremità di questo documento.

REFERENCES•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI

1. Guandalini S, Gupta P. Celiac disease- A diagnostic challenge. *Clin Appl Immun Rev* 2002;2:293-305.
2. Fasano A, et al. Prevalence of celiac disease in at risk and not-at-risk groups in the United States 2003; 163:286-292.
3. Wolber R, et al. Lymphocytic gastritis in patients with celiac sprue or spruelike intestinal disease. *Gastroenterology* 1990;98:310-315.
4. Catassi, et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma in celiac disease. *JAMA* 2002;287:1413-1419.
5. Arranz E, Ferguson A. Intestinal antibody pattern of celiac disease: Occurrence in patients with normal jejunal biopsy histology. *Gastroenterology* 1993;104:1263-72.
6. Hill ID, et al. Celiac disease: Working group report of the first world congress of pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35:S78-S88
7. Vitoria JC, et al. Antibodies to gliadin, endomysium, and tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:571-4.
8. Rittmeyer C, Rhoads JM. IgA deficiency causes false-negative endomysial antibody results in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1996 23:504-6.
9. Kumar V, Jarzabek-Chorzelska M, Sulej J, Rajadhyaksha M, Jablonska S. Tissue transglutaminase and endomysial antibodies-diagnostic markers of gluten-sensitive enteropathy in dermatitis herpetiformis. *Clin Immunol.* 2001;98:378-82.
10. Lagerqvist, C. Ivarsson, A., Juto, P. Persson, L. A. Hernell, O. Screening for adult coeliac disease - which serological marker(s) to use? *J Intern Med* 250:241-248, 2001.
11. Lilic D, Sewell WA. IgA deficiency: what we should-or should not-be doing. *J Clin Pathol* 2001 54:337-8.
12. Seidman EG, Hollander GA. Autoimmunity with immunodeficiency: a logical paradox. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999 ;28:377-9.
13. Sleasman JW. The association between immunodeficiency and the development of autoimmune disease. *Adv Dent Res* 1996;10:57-61.
14. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health; 1993 (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
15. Korponay-Szabo IR, Dahlbom I, Laurila K, et al. Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. *Gut.* 2003;52:1567-1571.
16. Kumar V et al. Celiac disease and immunoglobulin a deficiency: how effective are the serological methods of diagnosis? *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9:1295-300.
17. Cataldo F, Lio D, Marino V, Picarelli A, Ventura A, Corazza GR. IgG antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency. Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue. *Gut.* 2000 47:366-9.
18. Sulkanen S, Haltunen T, Laurila K, et al. Tissue Transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology;* 1998, 115:1322-1328.
19. Dietrich W, Laag E, Schopper H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease; *Gastroenterology* 1998, 115:1317-1321.

Figure 1. Sample Standard Curve

Standard Curve/Courbe d'étalonnage/Curva standard/
Curva estándar/Standardkurve/Curva padrão
Anti-hu tTG Immulisa™



**Table 1. Immunological Antibody Profile in Patients with IgA deficiency
(Literature Review)**

Study Group	Subjects	Endomysial		Gliadin		tTG	
		IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG
CD Patients							
Korponay-Szabo ¹⁵	78	ND	77	ND	ND	ND	77
Kumar et al ¹⁶	14	0	14	0	14	0	13
Cataldo et al ¹⁷	20	0	20	0	20	0	20
CD Patients on GFD							
Korponay-Szabo ¹⁵	35	ND	26	ND	ND	ND	28
Kumar et al ¹⁶	1	0	0	0	0	0	0
Cataldo et al ¹⁷	34	0	0	0	0	0	4
Non-CD Patients							
Korponay-Szabo ¹⁵	78	ND	0	ND	ND	ND	0
Kumar et al ¹⁶	10	0	0	0	0	0	0
Cataldo et al ¹⁷	10	0	0	0	0	0	2

ND=not done, CD=celiac disease, GFD=gluten free diet

Figure 3: Laboratory Testing Algorithm



Table 2. Clinical Correlation

Diagnosis	No Tested	No. Positive
IgA deficient		
Celiac	15	15
Non-Celiac	12	0
Celiac Disease	91	25
Dermatitis Herpetiformis	22	4
Disease Controls	44	0
Normal	66	3

Table 3. ImmuLISA IgG anti-hu tTG ELISA vs. Another Commercial IgG anti-hu tTG ELISA Method

		Other ELISA		
		Positive	Negative	Total
ImmuLISA anti-hu tTG IgG	Positive	13	8	21
	Negative	0	47	47
Total		13	55	68

relative specificity/specificitate relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa: 88%

relative sensitivity/sensibilitate relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivität/sensibilità relativa/sensibilidade relativa: 100%

relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo: 85%

Table 4. Precision

	Inter-assay	intra-assay
	CV	CV
High	8%	7%
Medium	12%	9%
Low	10%	8%
Cut-off (20 EU/ml)	9%	10%

Table 5. Recovery

	EU/ml added/supplémentaire/ aggiunto/agregado/ hinzugefügt/adicionado	EU/ml obtained/obtenuto/ verificato/obtenido/ erreicht/obtido	% Recovery/Rétablissement/ Recupero/Recuperación/ Wiederaufnahme/Recuperação
Sample 1	76.8	86.6	112.7
Sample 2	105.6	124.2	117.6
Sample 3	116.4	126.8	109

For technical assistance please contact:



IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

IMMCO
DIAGNOSTICS

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante

Autorrizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

www.emergogroup.com