

tTransglutaminase IgG ELISA

Bestelcode: AD COG96

1. BEOOGD GEBRUIK

De tTransglutaminase IgG ELISA kit maakt de semi-kwantitatieve opsporing van IgG-antilichamen tegen tissue transglutaminase in humaan serum mogelijk.

Deze kit is bedoeld ter bevestiging van de resultaten van specifieke patronen die zijn verkregen met immunofluorescentie, de screenings- en referentiemethode bij auto-immuniteit; de kit dient ook als hulpmiddel bij de diagnose van coeliakie (zie voor meer details 11.5 Diagnostische waarden van het auto-antilichaam).

De test is bedoeld voor een grote, routinematige populatie. Deze kit is strikt voorbehouden voor professioneel gebruik in klinische analyselaboratoria. Het kan alleen handmatig worden gebruikt of in een open geautomatiseerd ELISA-verwerkingsysteem, geprogrammeerd volgens het in punt 9.2 beschreven pipetteerschema.

2. PRINCIPE VAN DE TEST

Deze kit en alle onderdelen ervan zijn bedoeld voor handmatig gebruik, maar het kan ook uitgevoerd worden in een open instrument dat specifiek is bedoeld voor ELISA-plaatverwerking.

Deze ELISA kit is een EIA (enzyme immunoassay) met 96 gecoate, individueel afbreekbare microwelletjes en een peroxidase-TMB detectiesysteem. De microwelletjes zijn gecoat met hoog-specifiek antigeen.

Tijdens de testprocedure worden serummonsters in een verhouding van 1/51 verdunt en geïncubeerd in de microwelletjes. Eventueel aanwezige menselijke antilichamen binden zich aan het specifieke antigeen. Ongebonden of overtollige antilichamen worden verwijderd door wassen, en HRP-geconjugeerde konijnenantilichamen tegen humaan IgG worden vervolgens aan de microwelletjes toegevoegd. Het enzymconjugaat bindt zich aan de antigeen-antilichaamcomplexen. Na een tweede wasstap om overtollig conjugaat te verwijderen, wordt de TMB/substraatoplossing toegevoegd. De enzymactiviteit, indien aanwezig, genereert een colorimetrische (blauwe) reactie. De stopoplossing wordt toegevoegd om de reactie te stoppen. De kleur verandert dan van blauw in geel en kan worden gemeten bij 450 nm/620 nm met een conventionele microtiterplaatlezer. De absorptie (optische dichtheid) is recht evenredig met de concentratie van IgG-antilichamen die aan het antigeen op het oppervlak van de microwells zijn gebonden. De kit bestaat uit 96 tests voor eenmalig gebruik.

3. KIT MATERIAAL

Alvorens de kit te gebruiken, dient u te controleren of alle genoemde onderdelen aanwezig zijn en of de kenmerken van het product overeenstemmen met die welke hierna worden beschreven.

Indien één van de onderdelen ontbreekt, beschadigd of niet conform is, gebruik de kit dan niet en neem contact op met uw distributeur.

3.1 Onderdelen







Te verdunnen: 20x Was Buffer	1 flesje, 50 ml - 20 x geconcentreerd (blauw) bevat: H ₂ O, TBS, NaCl, Tween, conserveringsmiddel, kleurstof
Gebruiksklaar: Verdunningsbuffer	1 flesje, 50 ml (geel) bevat: H ₂ O, NaCl, TBS, Tween, BSA, conserveringsmiddel, kleurstof
Substraat	1 flesje, 20 ml (kleurloos) bevat: H ₂ O, TBS, natriumacetaat, natriumperboraat, stabilisator, EDTA, conserveringsmiddel
Negatieve controle	1 flesje, 1 ml (groen) bevat: humaan serum (verdund), conserveringsmiddel, kleurstof
Kalibratoren	6 flesjes, 1 ml elk, 0, 25, 50, 100, 200, 400 U/ml. (kleur neemt met de concentratie toe) bevat: humaan serum (verdund), conserveringsmiddel, kleurstof
Positieve controle	1 flesje, 1 ml (blauw) bevat: humaan serum (verdund), conserveringsmiddel, kleurstof
Conjugaat	1 flesje, 20 ml (rood) bevat: H ₂ O, NaCl, TBS, KCl, konijn-antilichamen tegen humaan IgG/peroxidase, conserveringsmiddel, kleurstof
Stop oplossing	1 flesje, 20 ml (kleurloos) bevat: zwavelzuur 2.5 %
Microwell Plaat strips	plastic frame met 12 x 8 breekbare microwelletjes gecoat met gezuiverd tissue transglutaminase (recombinant, humaan)

Afkortingen:

BSA = Runderserumalbumine; EDTA = Ethyleendiaminetetraazijnzuur, HRP = Paarderadijsoxidase, KCl = Kaliumchloride; NaCl = Natriumchloride; TBS = Tris Buffer Zoutoplossing; TMB =Tetramethylbenzidine.

Voor meer informatie over de samenstelling en concentratie van de gebruikte actieve bestanddelen wordt verwezen naar het MSDS dat op verzoek verkrijgbaar is of te vinden is op www.alphadia.be.

Symbolen op kit-etiquetten

	Attention : consult instructions for use Attenzione : consulti le istruzioni per uso Achtung : Gebrauchsanwendung beachten Attention : consulter le mode d'emploi Atención : consultar las instrucciones Atenção : consultar instruções para uso Προσοχή : Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης		For ... uses Per ... dosaggi Für ... Anwendungen Pour ... utilisations Para ... usos Para ... utilização για ... χρήσεις
IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositivo medico diagnostico in vitro Zur medizinischen diagnostischen Anwendung in vitro Dispositif médical de diagnostic in vitro Dispositivo médico para uso diagnostico in vitro Dispositivo médico para uso diagnostico in vitro Ιατρικό υλικό για διάγνωση In Vitro	REF	Code Codice Artikelnummer Référence Código Código Κωδικός
	To be stored from 2°C to 8°C Conservazione da 2 – 8°C bei 2°C bis 8°C lagern A conserver de 2°C à 8°C Almacenar a 2 - 8°C Armazenar a 2 – 8°C Αποθηκεύστε στους 2 έως 8°C		Manufactured by Fabbricato da Hergestellt von Fabriqué par Fabricado por Fabricado por Κατασκευάζεται από την
LOT	Batch Number Lotto numero Chargennummer Désignation du lot Denominacion de lote Número do lote Κωδικός		Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Verwendbar bis (letzter Tag des Monats) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Estable hasta (usar antes de ultimo día del mes) Data limite para utilização (ultimo dia do mês) Χρήση έως (τελευταία ημέρα του μήνα)
CE	CE Mark Marcatura CE CE-Kennzeichnung Marquage CE Marca CE Marcação CE μονογράφιση CE		To be protected from direct sunlight Proteggere dalla luce Vor Licht schützen Protéger de la lumière Proteja de la luz Proteger da exposição à luz Προστατεύετε τον αντιδραστήριο
WELL	Microwell Pozzetti Kavität Barrette Tira para micropocillo Tira com microcavidades Μικροκοιλιοτήτων	CAL ...	Calibrator (... value) Calibratore (... valor) Kalibrator (... Wert) Calibrateurs (... valeur) Calibrador (... valor) Calibrador (... valor) βαθμονομητής (...τιμή)
CONTROL +	Positive control Controllo positivo Positivkontrolle Contrôle positif Controlo positivo Controlo positivo Θετικός μάρτυρας	CONTROL ±	Cut off value Controllo separazione Grenzwertkontrolle Contrôle seuil controlo de corte controlo de redução οριακής τιμής
CONTROL -	Negative control Controllo negativo Negativkontrolle Contrôle négatif Controlo negativo Controlo negativo Αρνητικός μάρτυρας	DIL	Diluent Diluyente campione Verdünnungspuffer Diluant Tampón diluyente Tampão de diluição Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης
WASH ...X	(... x concentrated) wash buffer Tampone di lavaggio (concentrato... x) (... x konzentrierte) Spülpufferlösung tampon de lavage (... x concentré) (... x concentrado) tampones de lavado (... x concentrado) tampão de lavagem (... x συγκέντρωση) Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης	CONJ ...	Conjugate ... Coniugato ... Konjugat ... Conjugué ... Conjugado ... Conjugado ... Συζυγές ...
SUB	Substrate Substrato Substrat Substrat Sustrato Substrato Υπόστρωμα	STOP	STOP solution Soluzione di stop Stopplösung Solution d'arrêt Solución de parada Solução de paragem Διάλυμα διακοπής της αντίδρασης

3.2 Gebruikt antigeen

Tissue transglutaminase Calciumafhankelijk enzym van de familie der proteïne-glutamine γ-glutamyltransferasen

4. VEREIST, MAAR NIET VOORZIEN MATERIAAL

- Microtiter-plaatlezer (450 nm leesfilter + optioneel 650 nm referentiefilter)
- Glaswerk, reageerbuisjes voor de verdunningen
- Precisie pipetten
- Facultatief: Apparaat voor het wassen van microtiterplaten (multikanaalspipet of geautomatiseerd systeem)
- Absorberend papier

5. OPSLAG

- Bewaar alle reagentia en microwelletjes bij 2-8°C gedurende de gehele geldigheidsduur (zie vervaldatum op de kit). Niet invriezen.
- Na de eerste opening van de kit moeten ongebruikte reagentia worden bewaard bij 2-8°C, beschermd tegen (zon)licht, bij voorkeur in de originele kitdoos. Gebruikte microwellstrips moeten worden teruggeplaatst in de bijgeleverde zakjes met het absorberende pakketje, worden afgesloten en worden bewaard bij 2-8°C, bij voorkeur in de originele kitdoos. Indien op de juiste wijze bewaard, zijn alle bestanddelen van de testkit stabiel tot de aangegeven vervaldatum.
- Eenmaal bereid (zie 9.2), is de wasoplossing 1 maand houdbaar bij 4°C.

6. VOORZORGSMAATREGELEN

1. Alle reagentia zijn uitsluitend bestemd voor in vitro diagnostiek en professioneel gebruik. De kit mag alleen door technisch opgeleid personeel worden verwerkt.
2. Het menselijke materiaal dat voor sommige reagentia van deze kit (controles, kalibratoren) wordt gebruikt, is volgens goedgekeurde methoden getest en negatief bevonden voor HbsAg, voor Hepatitis C en voor HIV 1- en HIV 2-antilichamen. Geen enkele test kan echter de afwezigheid van virale agentia in dergelijk materiaal volledig garanderen. Behandel daarom kitcontroles, kalibratoren en patiëntenmonsters alsof ze infectieziekten kunnen overdragen.
3. De reagentia in de kit worden als niet gevaarlijk beschouwd, aangezien de concentraties van potentieel gevaarlijke chemische stoffen onder de door de Europese regelgeving voorgeschreven drempelwaarden liggen (zie MSDS of op de website www.alphadia.be).
4. Desondanks bevat het product conserveringsmiddelen die (in hun gegeven concentratie) licht vervuilende eigenschappen kunnen hebben of overgevoeligheidsreacties van de huid kunnen veroorzaken. Daarom moet contact met de huid, ogen of slijmvliezen worden vermeden. Zoals bij elke chemische stof die specifieke gevaren bevat, mag het product/de componenten van het product alleen door gekwalificeerd personeel en met de nodige voorzorgsmaatregelen worden gehanteerd.
5. De monsters van patiënten moeten worden behandeld alsof ze besmettelijke ziekten kunnen overdragen; ze hebben dus een geschikte bescherming nodig (handschoenen, laboratoriumjas, veiligheidsbril). In ieder geval moeten de GLP-regels worden toegepast met alle geldende algemene of individuele veiligheidsregels.
6. Afvalverwijdering: Patiëntmonsters, kalibratoren, geïncubeerde welletjes en reagentia moeten als besmettelijk afval worden behandeld. De dozen hoeven niet afzonderlijk te worden ingezameld, tenzij anders vermeld in de officiële voorschriften.

7. AANBEVELINGEN

1. Alphadia en zijn erkende distributeurs kunnen niet aansprakelijk worden gesteld voor schade die indirect of als gevolg van een verandering of wijziging in de aangegeven procedure, een oneigenlijk gebruik van de kit en/of het gebruik van een onvolledige of beschadigde kit ontstaat. Het gebruik van deze kit is voorbehouden aan gekwalificeerd technisch personeel.
2. De aansprakelijkheid van Alphadia blijft in alle gevallen beperkt tot het vervangen van de kit.
3. In het geval van een ernstig incident (letsel, verslechtering van de gezondheid of overlijden) met deze IVD-kit, dient u dit onmiddellijk te melden aan de fabrikant (zie adres hieronder) en aan de bevoegde instantie in uw land.

8. AFNAME, HANTERING EN OPSLAG VAN MONSTERS

Bij voorkeur alleen vers verzamelde monsters (*serum!*) gebruiken. Onzuivere sera moeten op lage snelheid gecentrifugeerd worden. Monsters worden verzameld in droge buizen of in buizen met EDTA of heparine. Vermijd het gebruik van een pool van verschillende sera, aangezien dit kan leiden tot inconsistente (verschillende) resultaten (zie punt 10.4). Na separatie moeten de serummonsters direct gebruikt worden, of in kleinere hoeveelheden verdeeld en gedurende enkele dagen bewaard bij een temperatuur van 2-8°C. Voor langere perioden moeten de serummonsters ingevroren worden bij -20°C. Vermijd het herhaaldelijk invriezen en ontdooien van de monsters.

9. TESTPROCEDURE

Beschrijving van de CONTROLES en KALIBRATOREN

Voor de anti-tissue transglutaminase-antilichamen is er geen referentiemateriaal of internationale standaarden beschikbaar.

De **kalibratoren**, alsmede de **negatieve** en **positieve controles**, bestaan uit een hoog-positief, in seriële verdunning bereide anti-tissue transglutaminase-monster. De kalibratiecurve weerspiegelt de bindingskinetiek van de antilichamen op het geïmmobiliseerde antigeen.

De **cut-off controle** is gekalibreerd als drempelwaarde voor de uiteindelijke interpretatie van de resultaten (zie 10).

9.1 Monsters

- Verdun de monsters **1:51** met de verdunningsbuffer (gebruiksklaar).
→ **b.v. 500 µl** verdunningsbuffer + **10 µl** serum. **Meng.**

9.2 Wasbuffer

- Verdun de geconcentreerde wasbuffer 1:20 met gedistilleerd water.
 - ❖ **Handmatig wassen:** Bereid **10 ml** eindvolume per **8 welletjes** of **120 ml** voor **96 welletjes**.
→ **b.v. 9,5 ml** water + **0,5 ml** buffer. **Meng.**
 - ❖ **Geautomatiseerd wassen:** afhankelijk van de gebruikte apparatuur zijn grotere volumes nodig (rekening houdend met het dode volume van het toestel)

9.3 Microwellsplaat

- Bereken het aantal welletjes voor de test. Verwijder ongebruikte welletjes uit het frame en bewaar ze in het bijgeleverde plastic zakje, verzegeld.

9.4 Pipetteerschema

Vóór gebruik, alle componenten op kamertemperatuur brengen (18-25°C)

- Voeg **100 µl verdund patiëntserum** per aangewezen microwell toe.
- Voeg **100 µl standaarden en controles** per aangewezen well toe.
- Incubeer gedurende **30 minuten** bij kamertemperatuur (18-25°C).
- Was **3 x** met **200 µl wasbuffer** (verdund 1:20).
- Voeg **100 µl conjugaat** per welletje toe.
- Incubeer gedurende **30 minuten** bij kamertemperatuur (18-25°C).
- Was **3 x** met **200 µl wasbuffer** (verdund 1:20).
- Voeg **100 µl substraat** per welletje toe.
- Incubeer gedurende **10 minuten** bij kamertemperatuur (18-25°C).
- Voeg **100 µl stopoplossing** per welletje toe, in dezelfde volgorde als bij het substraat.
- Lees **de absorptie** bij **450 nm** (facultatief 450/650 nm) binnen 30 minuten.

NB: Het wordt aangeraden bij elke run een blanco bepaling in duplex uit te voeren (alleen verdunningsbuffer, geen patiëntmonster).

Procedure voor handmatig wassen

Verwijder de oplossing uit de welletjes door de plaat langzaam om te keren. Klop de plaat met de welletjes naar beneden gericht krachtig uit op absorberend papier uit. Voeg 200 µl verdunde wasbuffer in elk welletje, wacht 20 seconden, herhaal het omdraaien, verwijderen en uitkloppen. Herhaal nog 2 keer.

10. BEREKENINGEN EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

10.1 Semi-kwantitatieve interpretatie op basis van kalibratoren (die de bindingskinetiek weergeven)

Stel de kalibratiecurve op door de O.D. (optische dichtheid) van elke kalibrator uit te zetten tegen de corresponderende eenheidswaarden. Het meest nauwkeurige regressiemodel van de kalibratiecurve is het exponentiële associatie-fittingsmodel:

$$y = a(1 - e^{-bx})$$

waarbij **y** overeenkomt met de **gemeten O.D.** en **x** overeenkomt met de **willekeurige waarde in U/ml** (eenheden/ml)

De O.D. van elk monster (y) kan dan worden berekend in U/ml (x) op basis van de regressievergelijking:

U/ml	Interpretatie
< 20	Negatief
20 - 29	Twijfelachtig
>29	Positief

10.2 Semi-kwantitatieve interpretatie op basis van de cut off waarde

Een eenvoudige semi-kwantitatieve interpretatie van de resultaten is beschikbaar m.b.v. de **25 U/ml** kalibrator, die als cut-off controle gebruikt wordt. De resultaten worden uitgedrukt in **Binding Index**, de ratio tussen de O.D. van het monster en die van de cut-off controle:

$$\text{B.I.} = \text{O.D van patiëntmonster} / \text{O.D van de cut-off controle}$$

Een monster is **negatief** als

$$\text{B.I.} \leq 1.0$$

Een monster is **positief** als

$$\text{B.I.} > 1.0$$

NB: Voor bevestiging moeten twijfelachtige monsters opnieuw worden getest.

10.3 Validatie van de resultaten

Een test wordt als geldig beschouwd als aan de volgende specificaties zijn voldaan.

Indien dit niet het geval is, zie punt 10.5, controleer de gehele procedure en herhaal de test. Als het probleem blijft aanhouden, neem dan voor hulp contact op met de fabrikant of distributeur.

	Specificaties voor kwaliteitsborging	
	O.D.	U/ml
Blanco (verdunningsbuffer)	< 0,100	-
Negatieve controle	-	≤ 20
25 U/ml kalibrator	< 50 % van de 400 U/ml kalibrator	-
Positieve controle	> 0,800	200 - 400

10.4 Belangrijke aanbevelingen voor de interpretatie van de resultaten

1. De kits van Alphadia vormen een diagnostisch *hulpmiddel*. Bijgevolg kan geen enkele diagnose worden gesteld uitsluitend op basis van onze kits. De resultaten moeten altijd worden geïnterpreteerd door rekening te houden met het klinisch onderzoek, de voorgeschiedenis van de patiënt en de resultaten die met andere methoden zijn verkregen.

Geen enkele techniek kan de mogelijkheid van fout-positieve of fout-negatieve resultaten uitsluiten. Met dit in het achterhoofd moet, voor zover mogelijk, een indirecte immunofluorescentietest worden uitgevoerd vóór het gebruik van deze ELISA kit (immunofluorescentie wordt erkend als een referentiemethode in de auto-immuniteit).

2. De intensiteit van een resultaat is niet noodzakelijkerwijs gerelateerd aan de mate van intensiteit van de ziekte, maar eerder aan het niveau van de gedetecteerde antilichamen.
3. Lage titers van auto-antilichamen kunnen voorkomen bij gezonde patiënten. Om deze reden moeten lage positieve resultaten (dicht bij de CO, tussen 20 en 29 U/ml), hoewel geldig, als twijfelachtig (minder betrouwbaar) worden beschouwd. In dergelijke gevallen wordt aanbevolen de patiënt opnieuw te testen, bij voorkeur met een nieuw monster. Als het resultaat bij het tweede testen onduidelijk blijft, moeten andere diagnostische tests en/of klinische informatie worden gebruikt om de auto-immune status van de patiënt te helpen bepalen.
4. Om verschillende redenen en onder bepaalde omstandigheden kan de kit een defect in de prestaties vertonen (zie Problemen oplossen). In dergelijke gevallen zijn de resultaten niet geldig en kunnen ze niet worden geïnterpreteerd. Het wordt aanbevolen om de test te herhalen. Als de fout blijft bestaan, neem dan contact op met uw distributeur.
5. De intensiteit van de resultaten kan afnemen wanneer de kit aan het einde van zijn levensduur wordt gebruikt. De prestaties van de kit worden echter niet beïnvloed (detectie van positieven en negatieven) onder normale gebruiks- en opslagomstandigheden.
6. Opeenvolgende bemonsteringen (op verschillende data) van een auto-immuun patiënt kan soms leiden tot verschillende resultaten van het ene monster tot het andere. Dit verschil kan verschillende oorzaken hebben: de behandeling van de patiënt, de evolutie van de ziekte of een seroconversie. In het specifieke geval van een seroconversie kan het resultaat positief zijn voor een auto-antilichaam bij een vroege bemonstering van de patiënt, en positief worden voor een ander auto-antilichaam bij een latere bemonstering van dezelfde patiënt.

10.5 Problemen oplossen

Probleem	Mogelijke oorzaken + actie
Vershil in resultaten ten opzichte van een referentiemethode	<ul style="list-style-type: none"> - Gebruik <ul style="list-style-type: none"> - verkeerd pipetteren van serum - verkeerd uitgegeven volume - foutieve aflezing, ongeschikt leesfilter (gebruik 450 nm of 450/650nm → de test herhalen - Gebruik van twee verschillende monsters van dezelfde patiënt (zie punt 10.4.6) of verkeerde behandeling/bewaring van het monster tussen de tests - Materiaal <ul style="list-style-type: none"> - storende stof in het monster - het monster is een pool van verschillende menselijke sera → de test herhalen en het resultaat door andere methoden bevestigen - Methode <ul style="list-style-type: none"> - intrinsieke prestaties van de kit (zie 11.2: <i>Analytische sensitiviteit en specificiteit</i>) - vervallen kit - stabiliteitsprobleem <p>Neem contact op met uw distributeur voor verdere technische ondersteuning.</p>
Vershillende resultaten in dezelfde batch of tussen meerdere batches	<ul style="list-style-type: none"> - Gebruik <ul style="list-style-type: none"> - verkeerd pipetteren van serum - verkeerd uitgegeven volume - foutieve aflezing, ongeschikt leesfilter (gebruik 450 nm of 450/650nm → herhaal de test - Methode <ul style="list-style-type: none"> - intrinsieke prestaties van de kit (zie 11.1: <i>Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid</i>)
Vervuiling tussen aangrenzende strips	<ul style="list-style-type: none"> - Gebruik <ul style="list-style-type: none"> - verkeerd pipetteren van serum / reagentia → de test herhalen
Zwake reactie / O.D te laag	<ul style="list-style-type: none"> - Gebruik <ul style="list-style-type: none"> - foutieve aflezing, ongeschikt leesfilter (gebruik 450 nm of 450/650nm → de test herhalen - beschadigde reagentia → de integriteit van de reagentia controleren → neem contact op met uw distributeur als u een probleem vermoedt - was buffer te weinig verdund of monster te veel verdund → de voorbereiding van de reagentia herhalen
Niet-specifieke bindingen / hoge achtergrond / te hoge O.D.	<ul style="list-style-type: none"> - Materiaal <ul style="list-style-type: none"> - storende stof in het monster → de test herhalen en het resultaat door andere methoden bevestigen - Gebruik <ul style="list-style-type: none"> - was buffer te weinig verdund of monster te veel verdund → de voorbereiding van de reagentia herhalen - te lange incubatie of te hoge temperatuur → de test herhalen
Kit niet correct geëtiketteerd	Productieprobleem → neem contact op met uw distributeur

Verkeerde inhoud van de kit	Productieprobleem → neem contact op met uw distributeur
-----------------------------	---

OPMERKING:

De belangrijkste restrisico's van de kit, zoals vermeld in de risicoanalyse van de kit aan het einde van het ontwerp (na mitigatie), zijn de volgende:

- 1) Risico op valse resultaten als gevolg van een pipetfout (slecht serum)**
- 2) Risico op valse resultaten als gevolg van een storende stof in het monster**

11. EIGENSCHAPPEN VAN DE TEST

11.1 Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

Voor elk anilichaan werden referentiemonsters in opeenvolgende statistische representatieve reeksen getest, zowel in dezelfde tests als in verschillende tests en tussen verschillende lotnummers, om respectievelijk de intra-assay, inter-assay en inter-lot variaties te berekenen.

In alle gevallen lagen de variaties in kleurintensiteit binnen de volgende verwachte grenzen:

CV ≤ 10% voor intra-assay reeksen

CV ≤ 15% voor inter-assay reeksen

CV ≤ 20% voor inter-lot reeksen

11.2 Analytische sensitiviteit

Meetbereik: van 0 U/ml (negatief) tot 400 U/ml (hoog positief)

Grens van blanco (O.D) = 0,099.

Aangezien er geen internationale norm beschikbaar is voor het auto-antilichaan, is de juistheid van de meting niet van toepassing op dit product

11.3 Analytische specificiteit

1. De belangrijkste bekende storende stoffen werden getest op de biomarker van deze kit.

Voor elke geteste concentratie van de storende stof bedroeg het verschil tussen het resultaat van het monster *zonder* de storende stof en het resultaat verkregen *in de aanwezigheid* van de storende stof niet meer dan 15%.

Storende stof	Maximale concentratie	Tussentijdse concentratie	Minimale concentratie	Vershil <15%
Bilirubine	100 mg/dl	50 mg/dl	25 mg/dl	Ja
Hemoglobine	200 mg/dl	100 mg/dl	50 mg/dl	Ja
Cholesterol	224.3 mg/dl	112 mg/dl	56 mg/dl	Ja
Reumatoïde factor IgM	~500 IU/ml	~300 IU/ml	~100 IU/ml	Ja

Opmerking: Het is onmogelijk om alle mogelijke storende stoffen die in de literatuur worden beschreven, te testen. Andere interferenties, onder andere door geneesmiddel veroorzaakte interferenties, zijn mogelijk.

2. De hoge analytische specificiteit van de test wordt gegarandeerd door de kwaliteit van het gebruikte antigeen. Deze kit detecteert IgG-antilichamen tegen tissue transglutaminase. Er zijn geen kruisreacties met andere auto-antilichamen gevonden.

11.4 Klinische sensitiviteit en specificiteit

Getypeerde monsters (door referentielaboratoria en/of referentiemethodologieën als bevestigd positief of bevestigd negatief monster voor specifieke antilichamen) werden getest volgens de testinstructies. De sensitiviteit en specificiteit werden berekend op basis van de resultaten van externe prestatie-evaluaties en EQA-controleprogramma's. Een gedetailleerd klinisch rapport is op verzoek verkrijgbaar.

t-Transglutaminase	
IgG	
+	-
echt positief 87	fout positief 8
fout negatief 5	echt negatief 107
Sensitiviteit	$\frac{87}{92} = 95\%$
Specificiteit	$\frac{107}{115} = 93\%$

Publicatie referenties:

- 1: Agardh D, Matthias T, Wusterhausen P, Neidhöfer S, Heller A, Lerner A. Antibodies against neo-epitope of microbial and human transglutaminase complexes as biomarkers of childhood celiac disease. *Clin Exp Immunol.* 2020 Mar;199(3):294-302. doi: 10.1111/cei.13394. Epub 2019 Nov 11. PMID: 31663117; PMCID: PMC7008223.
- 2: Kaur N, Minz RW, Bhadada SK, Saikia B, Dayal D, Anand S, Joshi N, Singh J, Thapa BR, Kochhar RK, Vaiphei K. Role of anti-tissue transglutaminase IgA+IgG antibodies in detection of potential celiac disease in patients with type 1 diabetes. *Indian J Med Res.* 2019 Jan;149(1):18-25. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1136_16. PMID: 31115370; PMCID: PMC6507530.
- 3: Wolf J, Haendel N, Remmler J, Kutzner CE, Kaiser T, Mothes T. Hemolysis and IgA-antibodies against tissue transglutaminase: When are antibody test results no longer reliable? *J Clin Lab Anal.* 2018 May;32(4):e22360. doi: 10.1002/jcla.22360. Epub 2017 Nov 23. PMID: 29168584; PMCID: PMC6816937.
- 4: Arigliani M, Rech Morassutti F, Fabris M, Melli P, Tonutti E, Cogo P. Coeliac disease in infants: antibodies to deamidated gliadin peptide come first! *Ital J Pediatr.* 2017 Aug 10;43(1):70. doi: 10.1186/s13052-017-0392-6. PMID: 28797308; PMCID: PMC5553580.
- 5: De Leo L, Bramuzzo M, Ziberna F, Villanacci V, Martelossi S, Leo GD, Zanchi C, Giudici F, Pandullo M, Riznik P, Mascio AD, Ventura A, Not T. Diagnostic accuracy and applicability of intestinal auto-antibodies in the wide clinical spectrum of coeliac disease. *EBioMedicine.* 2020 Jan;51:102567. doi:10.1016/j.ebiom.2019.11.028. Epub 2020 Jan 2. PMID: 31901853; PMCID: PMC6940709.
- 6: Terryberry J, Tuomi J, Perampalam S, Peloquin R, Brouwer E, Schuppan D, Guandalini S. Diagnostic accuracy of a fully automated multiplex celiac disease antibody panel for serum and plasma. *Clin Chem Lab Med.* 2019 Jul 26;57(8):1207-1217. doi: 10.1515/cclm-2019-0088. PMID: 30903755.
- 7: Smarrazzo A, Magazzù G, Ben-Hariz M, Legarda Tamara M, Velmishi V, Roma E, Kansu A, Mičetić-Turk D, Bravi E, Stellato P, Arcidiaco C, Greco L. Variability of anti-human transglutaminase testing in celiac disease across Mediterranean countries. *World J Gastroenterol.* 2017 Jun 28;23(24):4437-4443. doi: 10.3748/wjg.v23.i24.4437. PMID: 28706427; PMCID: PMC5487508.
- 8: Zanella S, De Leo L, Nguyen-Ngoc-Quynh L, Nguyen-Duy B, Not T, Tran-Thi-Chi M, Phung-Duc S, Le-Thanh H, Malaventura C, Vatta S, Ziberna F, Mazzocco M, Volpato S, Phung-Tuyet L, Le-Thi-Minh H, Borgna-Pignatti C. Cross-sectional study of coeliac autoimmunity in a population of Vietnamese children. *BMJ Open.* 2016 Jun 21;6(6):e011173. doi: 10.1136/bmjopen-2016-011173. PMID: 27329441; PMCID: PMC4916638.
- 9: Karsten Conrad, Werner Schössler, Falk Hiepe, Marvin J. Fritzler, Book "Autoantibodies in Organ Autoimmune Diseases", Volume 8, second edition – 2017

11.5. Diagnostische waarde van het auto-antilichaam

Anti-tissue transglutaminase	IgA-antilichamen tegen tissue ltransglutaminase (endomysium) worden gemeten om de diagnose coeliakie te bevestigen. Endomysium-antilichamen van het type IgA zijn met een gevoeligheid van meer dan 95% en een specificiteit van 99-100% aantoonbaar bij coeliakie en vormen een zeer specifieke marker van deze ziekte. Zij worden ook aangetroffen bij de meeste patiënten met dermatitis herpetiformis. In gevallen van IgA-deficiëntie maken de genoemde antilichamen van de IgG-klasse de weg vrij voor een juiste diagnose.
------------------------------	---

12. BEPERKINGEN VAN DE TEST

1. De met deze bevestigingstest verkregen resultaten zijn afhankelijk van de intrinsieke prestaties van de kit en moeten worden beschouwd als een hulpmiddel bij de uiteindelijke diagnose, waarbij rekening wordt gehouden met de resultaten van een referentietechniek en de klinische gegevens van de patiënt.
2. Hyperlipemische monsters moeten vóór het pipetteren van de 10 µl monster gecentrifugeerd worden; het monster moet uit het supernatans (de bovenstaande vloeistof) worden gepipetteerd.



