

For technical assistance please contact:



IMMCO Diagnostics, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/ Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος της / Representante Autorizado/ Autorisierter Repräsentant/ Représentant Autorisé /Rappresentante Autorizzato / Representante Autorizado
EMERGO Group, Inc.
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com

MAR2010

Document No. PI5159



Immulin™

Celiac G+

Gliadin Peptide Antibody ELISA

IVD For *in vitro* diagnostic use

PRODUCT INSERT

REF	5159A	Celiac G+ IgA ELISA	96 Determinations
REF	5159G	Celiac G+ IgG ELISA	96 Determinations

INTENDED USE

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative and semi-quantitative detection of IgA or IgG antibodies to gliadin in human serum to aid in the diagnosis of celiac disease in conjunction with other laboratory and clinical findings.

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.¹ Consequently, the clinical spectrum of CD has grown much broader than in the past to include patients that do not present with classical symptoms. It is not uncommon for the initial symptoms to be non-gastrointestinal or for gastrointestinal symptoms, if present, to be mild or intermittent. The need to examine a wider range of clinical presentation has led to greater numbers of individuals diagnosed with CD later in life than ever before. The advent of serological methods for the detection of antibodies to gliadin, endomysium and tissue transglutaminase have enabled large-scale screening studies for CD both in Europe and the United States. These studies suggest that CD is far more prevalent than thought previously. Recent serological studies demonstrate incidence of CD between one in 100 and one in 500.^{2,3} Prevalence of CD is much higher in first and second-degree relatives of patients with CD. CD has been associated with many other autoimmune disorders such as type 1 diabetes, thyroid autoimmunity and other autoimmune disorders.

The most common serologic tests for the screening of CD are the immunofluorescence method of detecting endomysial antibodies (EMA) and ELISA methods of detecting antibodies to tissue transglutaminase (tTG) and gliadin.⁴⁻⁸ Because of the limited sensitivity and specificity of gliadin antibody assays this method has largely been replaced with EMA and tTG.

The limitation of the EMA and tTG immunoassays is that both immunoassays detect IgA antibodies, hindering identification of IgA deficient patients with CD.⁹⁻¹¹ IgG gliadin antibody tests are important towards the diagnosis of CD in patients who are IgA deficient.¹⁰ Studies show that 1-2% of the general population is IgA

deficient and that the incidence of CD in IgA deficient subjects is significant, hence the need for specific tests. In addition, some studies question the specificity of tTG assays and the sensitivity of EMA.¹²⁻¹⁶ Gliadin peptide based assays have shown promising results in addressing the limitations of current assays.¹⁷⁻²³ This next generation assay for the detection of gliadin antibodies, the Celiac G+ ELISA, incorporates a proprietary gliadin peptide technology that provides sensitive and specific detection of IgA or IgG isotype antibodies with high degree of reliability.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

The test is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with deamidated gliadin peptides followed by a blocking step to reduce non-specific protein binding during the assay run. Controls, calibrators and patient sera are incubated in the antigen coated wells to allow specific antibodies present in the serum to bind to the gliadin antigen. Unbound antibodies and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgA or IgG conjugate to the microwells. Unbound conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (TMB) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of TMB substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 450 nm. Results are expressed in ELISA units per milliliter (EU/ml) and reported as positive or negative.

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Reagents are stable until the expiration date when stored and handled as directed.

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.

Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date.

Coated microwell strips are for one time use only. Unused microwell strips should be carefully resealed in the pouch containing desiccants to prevent condensation and stored at 2-8°C.

Precautions

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 materials.²⁴

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

**REFERENCES/ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ/REFERENCIAS/REFERENZEN/
RÉFÉRENCES/RIFERIMENTI/REFERÊNCIAS**

1. Guandalini S et al. *Clin Appl Immun Rev*. 2002;2:293-305.
2. Fasano A, et al. *Arch Intern Med*. 2003; 163:286-292.
3. Lohi S et al. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007; 26:1217-25.
4. Chorzelski TP et al. *Br J Dermatol*. 1984;111:395-402.
5. Pacht A et al. *Isr J Med Sci*. 1995; 31:218-20.
6. Grodzinsky E et al. *Acta Paediatr*. 2008; 97:972-6.
7. Tucker NT et al. *J Pediatr*. 1988; 113:286-289.
8. Schuppan D et al. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001; 13: 635-7.
9. Korponay-Szabo IR et al. *Gut*. 2003; 52:1567-1571.
10. Kumar V et al. *Clinical Diagnostic Lab Immunology*. 2002; 9:1295-1300.
11. McGowan KE et al. *Clin Chem*. 2008; 54:1203-9.
12. Song KS, Choi JR. *Yonsei Med J*. 2004; 45:960-2.
13. Luft LM et al. *J Rheumatol*. 2003; 30:2613-9.
14. Sárdy M et al. *Clin Chim Acta*. 2007; 376:126-35.
15. Bizzaro N et al. *J Clin Lab Anal*. 2006; 20:184-9.
16. Villalta D et al. *Clin Chim Acta*. 2005; 356:102-9.
17. Mothes T. *Adv Clin Chem*. 2007; 44:35-63.
18. Kaukinen K et al. *Scand J Gastroenterol*. 2007; 42:1428-33.
19. Schwertz E et al. *Clin Chem*. 2004; 50: 2370-5.
20. Rashtak S et al. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008; 6:426-32.
21. Volta U et al. *Dig Dis Sci*. 2007; 3:1582-8.
22. Ankelo M et al. *Clin Exp Immunol*. 2007; 150: 285-293.
23. Bansal A et al. *Annals NY Acad Sci*. 2009.
24. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health; 1993 (HHS Pub No [CDC] 93-8395).

sources. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.

Materials provided

ImmuliSia™ Celiac G+ IgA ELISA REF 5159A

ImmuliSia™ Celiac G+ IgG ELISA REF 5159G









Kits contains sufficient reagents to perform 96 determinations.

12 x 8	MICROPLATE CG+	Microplate with individual breakaway microwells. Coated with deamidated gliadin peptides. Ready for use.
1 x 1.75 ml	CONTROL+ CG+A	Ready to use Positive Control (red cap) for REF 5159A. Contains human serum positive for gliadin IgA antibodies. The expected concentration range in EU/ml is printed on the label.
1 x 1.75 ml	CONTROL+ CG+G	Ready to use Positive Control (red cap) for REF 5159G. Contains human serum positive for gliadin IgG antibodies. The expected concentration range in EU/ml is printed on the label.
1 x 1.75 ml	CONTROL-	Ready to use Negative Control (white cap). Contains human serum.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A CG+A	Ready to use set of 5 Calibrators for REF 5159A. Calibrator A (green cap) 320 EU/ml, Calibrator B (violet cap) 160 EU/ml, Calibrator C (blue cap) 80 EU/ml, Calibrator D (yellow cap) 20 EU/ml, and Calibrator E (orange cap) 1 EU/ml. Derived from human serum containing gliadin IgA antibodies. Concentrations in EU/ml are printed on the labels.
	CALIBRATOR B CG+A	
	CALIBRATOR C CG+A	
	CALIBRATOR D CG+A	
	CALIBRATOR E CG+A	
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A CG+G	Ready to use set of 5 Calibrators for REF 5159G. Calibrator A (green cap) 160 EU/ml, Calibrator B (violet cap) 80 EU/ml, Calibrator C (blue cap) 40 EU/ml, Calibrator D (yellow cap) 20 EU/ml, and Calibrator E (orange cap) 1 EU/ml. Derived from human serum containing gliadin IgG antibodies. Concentrations in EU/ml are printed on the labels.
	CALIBRATOR B CG+G	
	CALIBRATOR C CG+G	
	CALIBRATOR D CG+G	
	CALIBRATOR E CG+G	
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	HRP goat anti-human IgA Conjugate for REF 5159A. Ready for use. Color coded pink.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP goat anti-human IgG Conjugate for REF 5159G. Ready for use. Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL	Serum Diluent. Ready for use. Color coded purple.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	TMB enzyme substrate. Ready for use. Protect from light.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Stop Solution. Ready for use.
2 x vials	BUF WASH	Powder Wash Buffer. Reconstitute to one liter each.
1 x		Protocol Sheets

Optional Components

1 x 60ml BUF|WASH Liquid concentrated Wash Buffer. **Reconstitute to one liter.**

Symbols used on labels

	Lot number
	Catalog number
	In vitro diagnostic use
	Use by
	Storage temperature
	Read instructions before use
	Number of tests
	Manufacturer

Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 450 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm
- 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. It is recommended that frozen specimens be tested within one year. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Procedural Notes

- Carefully read the product insert before starting the assay.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. It is suggested that reagents be left on the bench out of the box for 30 minutes prior to use. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.

Série do teste (EU/ml)	Inclinação (95% CI)	Intercepção Y (95% CI)	R ²	% de recuperação (obtida/prevista)
IgA				
7,2 - 70,3	0,971 (0,907 - 1,035)	0,468 (-2,415 - 3,349)	0,9958	97,3 - 106,9
4,4 - 136	0,987 (0,942 - 1,033)	2,203 (-1,518 - 5,924)	0,9979	88,9 - 103,3
1,1 - 309,6	0,993 (0,909 - 1,076)	-4,609 (-18,092 - 11,808)	0,9946	94,4 - 114,8
IgG				
5,2 - 75,8	1,011 (0,975 - 1,047)	-0,499 (-2,170 - 1,171)	0,9987	97,3 - 105,7
4,8 - 93,9	1,006 (0,946 - 1,067)	1,161 (-2,217 - 4,538)	0,9963	90,9 - 102
1,2 - 169,8	1,034 (0,992 - 1,076)	0,9027 (-3,196 - 5,002)	0,9971	86,0 - 102,3

Interferência

A interferência foi estudada, misturando o soro com os níveis de anticorpos conhecidos contra a gliadina com amostras de soro potencialmente interferentes e estudando o desvio dos resultados previstos. Seguem-se os resultados para os isotipos IgA e IgG.

Celiac G+ IgA

Amostra	EU/mL		Hemoglobina		Bilirrubina		RF	
	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int
Negativo	8,5	-9,9	9,4	-26,5	11,6	-26,5	11,3	-26,5
Corte 1	25,2	6,3	23,7	7,5	23,5	7,5	26,2	7,5
Corte 2	21,7	0,9	21,5	1,4	21,4	1,4	23,2	1,4
Positivo 1	107,5	3,5	103,9	-4,2	112,2	-4,2	118,0	-4,2
Positivo 2	126,5	3,5	122,2	-8,5	138,4	-8,5	137,6	-8,5

Celiac G+ IgG

	EU/mL		Hemoglobina		Bilirrubina		RF	
	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int
Negativo	5.0	5.5	4.7	8.4	4.6	8.4	5.9	-15.5
Corte 1	22.6	10.8	20.4	12.1	20.2	12.1	24.4	-7.5
Corte 2	18.0	-7.3	19.5	-4.0	18.8	-4.0	22.4	-19.6
Positivo 1	74.6	3.6	72.0	-4.4	78.1	-4.4	82.2	-9.3
Positivo 2	105.0	3.6	101.4	-8.7	115.0	-8.7	114.4	-8.2

Hemoglobina: 2 g/L
 Bilirrubina: 342 µmol/L
 RF: 100 EU/ml

- * Anticorpos Anti-Nucleares
- ** Anticorpos Contra Peptídeos Cíclicos Citruinados
- *** Anticorpos Factor Reumatóide

Precisão

A precisão foi testada com múltiplas amostras seleccionadas ao longo de todo o intervalo de ensaio. Foram realizados três ensaios em dias diferentes, a fim de determinar resultados entre dias. Foi realizada uma experiência adicional de seis réplicas, a fim de determinar a repetibilidade. Os resultados são seguidamente resumidos.

Kit	S #	Média (EU/ml)	Imprecisão Total		Entre dias		Na experiência (Repetibilidade)	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	
Ensaio Celiac G+ IgA	1	15,38	1,713	11,1%	2,474	16,2%	0,572	3,7%
	2	22,09	1,649	7,5%	2,011	9,1%	1,392	6,3%
	3	27,23	1,792	6,6%	1,932	7,1%	1,807	6,7%
	4	37,08	2,565	6,9%	3,043	8,2%	2,277	6,2%
	5	79,94	6,027	7,5%	8,438	10,7%	2,686	3,3%
	6	180,68	5,734	3,2%	7,852	4,3%	3,205	1,8%
	7	186,77	7,926	4,2%	10,837	5,9%	3,872	2,1%
	8	341,97	9,786	2,9%	10,389	3,0%	10,137	3,0%
Ensaio Celiac G+ IgG	1	13,97	0,827	5,9%	0,884	6,4%	0,757	5,3%
	2	23,10	1,274	5,5%	0,327	1,4%	1,821	7,8%
	3	33,81	2,071	6,1%	2,552	7,6%	1,696	5,0%
	4	91,83	3,472	3,8%	4,504	5,0%	1,723	1,9%
	5	116,49	4,360	3,7%	5,813	5,1%	1,349	1,1%
	6	120,44	3,008	2,5%	2,713	2,3%	2,770	2,3%
	7	179,74	4,661	2,6%	5,461	3,1%	3,998	2,2%

Limite de Detecção

O limite de detecção (LoD) foi determinado com base em 60 réplicas das amostras em branco e em 10 réplicas de cada uma das 6 amostras de baixo nível (NHS). O LoD para o IgA foi de 8,9 EU/ml. O LoD para o IgG foi de 2,2 EU/ml.

Linearidade e Recuperação

A linearidade e a recuperação foram testadas diluindo as amostras positivas, através de uma série de ensaios em diluições equidistantes e comparando os valores: actual vs esperado. A série linear dos ensaios foi determinada como 8,9 (LoD) – 320 EU/ml para o IgA e 2,2 (LoD) – 160 EU/ml para o IgG. Os resultados são seguidamente resumidos.

- **Good washing technique is critical.** If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 or 12 wells simultaneously. This speeds the process and provides more uniform incubation times.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.

Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate to room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a **qualitative determination** use Calibrator D (*vial with yellow cap*) only.
- or**
- For a **semi-quantitative determination** use Calibrators A through E as depicted in the sample layout below.

	Qualitative			Semi-Quantitative			
A	Blank	S5	Etc.	A	Blank	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **500µl** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:101**) to the appropriate microwells as per protocol sheet.
- Note:** Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To

blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.

- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within **30 minutes** of adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **450 nm** using a single or at 450/630nm using a 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. The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <5 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of Calibrator D must be greater than that of the negative control and less than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations the positive control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

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

1. QUALITATIVE DETERMINATION

Abs. of Test Sample

----- X EU/ml of Calibrator D = EU/ml Test Sample

Abs. of Calibrator D

It is recommended that qualitative results be reported as "positive" or "negative." Sample results greater than or equal to Calibrator D are considered positive.

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot the absorbance of Calibrator A through E against their respective concentrations on linear-log graph paper. Plot the concentrations in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw a point-to-point curve fit. Determine the concentrations of the patient samples from the curve

Outro Gliadina IgG ELISA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	88	9	97
CELIAC G+	Negativo	7	109	116
IgG ELISA	Total	95	118	213
Acordo percentual positivo:		92,6% (95% CI 84,9% - 96,7%)		
Acordo percentual negativo:		92,4% (95% CI 85,6% - 96,2%)		
Acordo percentual global:		92,5% (95% CI 87,9% - 95,5%)		

B. Celiac G+ vs. EMA: os resultados obtidos com o Celiac G+ ELISA foram comparados com a medida de anticorpos anti-endomísio (EMA) EMA obtidos, utilizando um kit IFA comercialmente disponível e uma população clínica bem caracterizada. Só foram incluídas no método comparativo as amostras no intervalo linear do ensaio. Estes resultados são seguidamente resumidos.

População DC confirmada pela EMA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	78	5	83
CELIAC G+	Negativo	18	55	73
IgA ELISA	Total	96	60	156
Sensibilidade estimada:		81,3% (95% CI 71,7% - 88,2%)		
Especificidade estimada:		91,7% (95% CI 80,9% - 96,9%)		
Acordo:		85,3% (95% CI 78,5% - 90,2%)		

Indivíduos positivos em celíaca EMA: 96

Controlos da doença: 7

Indivíduos saudáveis normais: 53

População DC confirmada pela EMA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positive	94	3	97
CELIAC G+	Negativo	11	105	116
IgG ELISA	Total	105	108	213
Sensibilidade estimada:		89,5% (95% CI 81,6% - 94,4%)		
Especificidade estimada:		97,2% (95% CI 91,5% - 99,3%)		
Acordo:		93,4% (95% CI 89,0% - 96,2%)		

Indivíduos positivos em celíaca EMA: 105

Controlos da doença: 20

Indivíduos saudáveis normais: 88

C. Reactividade Cruzada: um total de 50 amostras, potencialmente com reacções cruzadas, provenientes de indivíduos com outros distúrbios auto-imunes ou positivos em relação a auto-anticorpos, foi testado relativamente aos anticorpos da Gliadina, através do sistema Immulisa™ Celiac G+.

Condição clínica	n	IgA Positivo n (%)	IgG Positivo n (%)
Doença de Graves	11	0 (0%)	0 (0%)
Tireoidite de Hashimoto	11	1 (9%)	0 (0%)
ANA positivo*	9	0 (0%)	0 (0%)
CCP positivo**	10	0 (0%)	2 (20%)
RF positivo***	9	1 (11%)	0 (0%)
Total	50	2 (4%)	2 (4%)

Valor Ab anti-Gliadina	Interpretação
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminado (Linha divisória)
>25 EU/ml	Positivo

Calibrador

São incluídos Calibradores Prontos a Utilizar para providenciar uma semi-quantificação, devendo ser utilizados em cada realização. As amostras de pacientes que contenham elevados níveis de anticorpos podem apresentar valores de absorvância superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semi-quantitativos rigorosos, essas amostras devem ser ainda diluídas de modo a que recaiam no âmbito da medida da curva de calibração quando forem novamente testadas. Para determinar valores EU/ml, multiplicar as unidades obtidas pelo factor de diluição.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Neste procedimento só deverão ser utilizadas amostras de soro. As amostras excessivamente hemolizadas, lipémicas, ou contaminadas microbiologicamente, podem interferir nos resultados do teste, não devendo ser utilizadas. Armazenar as amostras a uma temperatura entre 2 a 8°C durante o máximo de uma semana. Para um armazenamento de maior duração, as amostras de soro deverão ser congeladas. Evitar o repetido congelamento e derretimento das amostras.

VALORES ESPERADOS

Espera-se que os resultados do teste numa população normal sejam negativos. No entanto, como a incidência da DC na população normal é de cerca de 1%, alguns indivíduos aparentemente saudáveis e assintomáticos podem apresentar testes positivos no Celiac G+ ELISA.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade da ImmuLisa™ Celiac G+ ELISA para a detecção dos anticorpos contra a gliadina foi avaliada ao testar amostras de soros EMA positivos bem caracterizados, provenientes de indivíduos suspeitos de sofrerem de DC e através de testes aos controlos de doenças e soro humano «normal». Estas amostras foram igualmente testadas em kits de teste comercialmente disponíveis. Só foram incluídas no método comparativo as amostras no intervalo linear do ensaio. Estes resultados são seguidamente resumidos.

A. Celiac G+ vs. outro kit de Anticorpo Peptídeo Gliadina:

		Outro Gliadina IgA ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	54	27	81
CELIAC G+	Negativo	7	68	75
IgA ELISA	Total	61	95	156
Acordo percentual positivo:		88,5% (95% CI 77,2% - 94,9%)		
Acordo percentual negativo:		71,6% (95% CI 61,3% - 80,1%)		
Acordo percentual global:		78,2% (95% CI 70,8% - 84,3%)		

according to corresponding absorbance values. Alternately, a four parameter curve may be used to plot the standard curve.

It is recommended that semi-quantitative results be reported as “positive,” “negative,” or “indeterminate” with EU/ml unit values. Indeterminate/borderline results should be retested and evaluated along with other laboratory methods, such as assays for detection of EMA and/or tTG antibodies.

Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. These values were determined by testing 64 normal human sera and 50 non-celiac disease controls. The values depicted below are the mean of the normal subjects plus 2SD. Each laboratory must determine its own normal values.

anti-Gliadin Ab value	Interpretation
<20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	Positive

Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing high antibody levels may give absorbance values greater than that of 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 values, multiply the units obtained by the dilution factor.

LIMITATIONS OF PROCEDURE

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.

EXPECTED VALUES

Test results in a normal population are usually expected to be negative. However, as the incidence of CD in normal population is about 1%, some apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive on the Celiac G+ ELISA.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the ImmuLisa™ Celiac G+ ELISAs for the detection of gliadin antibodies was evaluated by testing well-characterized EMA positive serum specimens from suspected CD subjects alongside disease controls and “normal” human sera. These specimens were also tested on commercially available test kits. Only specimens in the linear range of the assay were included in the method comparison. These results are summarized below.

A. Celiac G+ vs. other Gliadin Peptide Antibody kit:

Other Gliadin IgA ELISA

		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	54	27	81
CELIAC G+	Negative	7	68	75
IgA ELISA	Total	61	95	156

Positive Percent Agreement: 88.5% (95% CI 77.2% - 94.9%)
 Negative Percent Agreement: 71.6% (95% CI 61.3% - 80.1%)
 Overall Percent Agreement: 78.2% (95% CI 70.8% - 84.3%)

Other Gliadin IgG ELISA

		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	88	9	97
CELIAC G+	Negative	7	109	116
IgG ELISA	Total	95	118	213

Positive Percent Agreement: 92.6% (95% CI 84.9% - 96.7%)
 Negative Percent Agreement: 92.4% (95% CI 85.6% - 96.2%)
 Overall Percent Agreement: 92.5% (95% CI 87.9% - 95.5%)

B. Celiac G+ vs. EMA: Results obtained with the Celiac G+ ELISAs were compared with endomysial antibody (EMA) EMA titer obtained using a commercially available IFA kit and a well-characterized clinical population. Only specimens in the linear range of the assay were included in the method comparison. These results are summarized below.

CD population confirmed by EMA

		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	78	5	83
CELIAC G+	Negative	18	55	73
IgA ELISA	Total	96	60	156

Estimated Sensitivity: 81.3% (95% CI 71.7% - 88.2%)
 Estimated Specificity: 91.7% (95% CI 80.9% - 96.9%)
 Agreement: 85.3% (95% CI 78.5% - 90.2%)

EMA Positive Celiac Subjects: 96
 Disease Controls: 7
 Healthy Normal Subjects: 53

CD population confirmed by EMA

		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	94	3	97
CELIAC G+	Negative	11	105	116
IgG ELISA	Total	105	108	213

Estimated Sensitivity: 89.5% (95% CI 81.6% - 94.4%)
 Estimated Specificity: 97.2% (95% CI 91.5% - 99.3%)
 Agreement: 93.4% (95% CI 89.0% - 96.2%)

EMA Positive Celiac Subjects: 105
 Disease Controls: 20
 Healthy Normal Subjects: 88

Controlo de Qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivos e Negativos e um reagente branco devem ser executados em cada ensaio, a fim de verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura de absorvância do reagente branco deve ser <0,3. O Calibrador A deve possuir uma leitura de absorvância não inferior a 1,0: caso contrário, o teste deve ser repetido. O controlo negativo deve ser <5 EU/ml. Se o teste for realizado em duplicado, deve ser retirada a média das duas leituras, a fim de determinar EU/ml. Quando se realizam determinações Qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Para as determinações semi-quantitativas, o controlo positivo deve apresentar valores na faixa indicada na ampola.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras do paciente podem ser determinadas por qualquer um dos seguintes métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

$$\frac{\text{Abs. da Amostra de Teste}}{\text{Abs. do Calibrador D}} \times \text{EU/ml do Calibrador D} = \text{EU/ml Amostra de Teste}$$

Abs. do Calibrador D

Recomenda-se que os resultados qualitativos sejam comunicados como “positivos” ou “negativos.” Amostras com resultados superiores ou iguais ao Calibrador D são consideradas positivas.

2. DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA

Traçar a absorvância do Calibrador A até E consoante as respectivas concentrações em papel gráfico de registo linear. Traçar as concentrações em EU/ml no eixo X, consoante a absorvância no eixo Y, e desenhar uma curva que ligue os pontos. Determinar as concentrações das amostras do paciente a partir da curva, de acordo com os valores de absorvância correspondentes. Em alternativa, pode ser utilizada uma curva de quatro parâmetros para traçar uma curva padrão.

Recomenda-se que os resultados semi-quantitativos sejam comunicados como “positivos,” “negativos,” ou “indeterminados” com valores unitários EU/ml. Os resultados indeterminados/linha divisória devem ser novamente testados e avaliados a par de outros métodos laboratoriais.

Interpretação

O seguinte serve apenas como orientação para a interpretação dos resultados laboratoriais. Estes valores foram determinados através de testes a 64 soros de humanos normais e a 50 controlos de doença não celíaca. Os valores demonstrados em seguida constituem a média dos indivíduos normais mais 2SD. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais.

Qualitativa				Semi-quantitativa			
A	Branca	S5	Etc.	A	Branca	S1	Etc.
B	-Control	S6		B	-Control	S2	
C	+ Control	S7		C	+ Control	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

4º Passo Preparar uma diluição **1:101** das amostras dos pacientes, misturando **5 µl** do soro do paciente com **500ul** de Diluente de Soro.

5º Passo Remover os micropoços necessários da embalagem, recolocando as tiras não utilizadas na embalagem fechada, colocada no frigorífico. Colocar os micropoços com firmeza no suporte extra fornecido.

6º Passo Pipetar **100 µl** de Calibradores prontos a utilizar, Controlos Positivo e Negativo, e diluir as amostras do paciente (**1:101**) nos micropoços adequados conforme a folha de protocolo.

Nota: incluir um poço que contenha **100 µl** do Diluente de Soro como um reagente branco. Ajustar o leitor de ELISA para zero em relação ao reagente branco.

7º Passo Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a uma temperatura ambiente.

8º Passo Lavar **4x** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Descartar o líquido por inversão e retirando os conteúdos de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para absorver o líquido da última lavagem, inverter as tiras e limpar os poços, vigorosamente, com toalhas de papel absorvente. Para lavadores automáticos, programar o lavador conforme as instruções do fabricante.

9º Passo Pipetar **100 µl** de Conjugado nos micropoços.

10º Passo Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

11º Passo Lavar todos os micropoços conforme descrito no 8º Passo.

12º Passo Pipetar **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempo utilizados para o Conjugado.

13º Passo Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a uma temperatura ambiente.

14º Passo Pipetar **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço, utilizando a mesma ordem e tempo utilizados para o Substrato Enzimático. Ler os valores de absorvância, no espaço de **30 minutos**, da adição da solução de paragem.

15º Passo Ler a absorvância de cada micropoço a **450 nm**, utilizando um único, ou a 450/630nm, utilizando um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda contra o reagente branco fixado em absorvância zero.

C. Cross Reactivity: A total of 50 potentially cross-reactive specimens from individuals with other autoimmune disorders or positive for other autoantibodies were tested for Gliadin antibodies using the Immulisa™ Celiac G+ system.

Condition	n	IgA Positive n (%)	IgG Positive n (%)
Graves' Disease	11	0 (0%)	0 (0%)
Hashimoto's Thyroiditis	11	1 (9%)	0 (0%)
ANA positive*	9	0 (0%)	0 (0%)
CCP positive**	10	0 (0%)	2 (20%)
RF positive***	9	1 (11%)	0 (0%)
Total	50	2 (4%)	2 (4%)

* Antinuclear Antibodies

** Cyclic Citrullinated Peptides Antibodies

*** Rheumatoid Factor Antibodies

Precision

Precision was tested with multiple specimens selected throughout the range of the assay. Three assay runs were performed on different days to determine results between days. An additional run of six replicates was performed to determine repeatability. Results are summarized below.

Kit	S #	Mean (EU/ml)	Total Imprecision		Between days		Within run (Repeatability)	
			SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
Celiac G+ IgA Assay	1	15.38	1.713	11.1%	2.474	16.2%	0.572	3.7%
	2	22.09	1.649	7.5%	2.011	9.1%	1.392	6.3%
	3	27.23	1.792	6.6%	1.932	7.1%	1.807	6.7%
	4	37.08	2.565	6.9%	3.043	8.2%	2.277	6.2%
	5	79.94	6.027	7.5%	8.438	10.7%	2.686	3.3%
	6	180.68	5.734	3.2%	7.852	4.3%	3.205	1.8%
	7	186.77	7.926	4.2%	10.837	5.9%	3.872	2.1%
	8	341.97	9.786	2.9%	10.389	3.0%	10.137	3.0%
Celiac G+ IgG Assay	1	13.97	0.827	5.9%	0.884	6.4%	0.757	5.3%
	2	23.10	1.274	5.5%	0.327	1.4%	1.821	7.8%
	3	33.81	2.071	6.1%	2.552	7.6%	1.696	5.0%
	4	91.83	3.472	3.8%	4.504	5.0%	1.723	1.9%
	5	116.49	4.360	3.7%	5.813	5.1%	1.349	1.1%
	6	120.44	3.008	2.5%	2.713	2.3%	2.770	2.3%
	7	179.74	4.661	2.6%	5.461	3.1%	3.998	2.2%

Limit of Detection

The limit of detection (LoD) was determined based on 60 replicates of the blank and 10 replicates each of 6 low-level (NHS) samples. LoD for IgA was 8.9 EU/ml. LoD for IgG was 2.2 EU/ml.

Linearity and Recovery

Linearity and recovery were tested by diluting positive specimens through the assay range in equidistant dilutions and comparing actual vs. expected results. The linear range of the assays were determined be 8.9 (LoD) – 320 EU/ml for IgA and 2.2 (LoD) – 160 EU/ml for IgG. Results are summarized below:

Test Range (EU/ml)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R ²	% recovery (obtained/expected)
IgA				
7.2 to 70.3	0.971 (0.907 to 1.035)	0.468 (-2.415 to 3.349)	0.9958	97.3 to 106.9
4.4 to 136	0.987 (0.942 to 1.033)	2.203 (-1.518 to 5.924)	0.9979	88.9 to 103.3
1.1 to 309.6	0.993 (0.909 to 1.076)	-4.609 (-18.092 to 11.808)	0.9946	94.4 to 114.8
IgG				
5.2 to 75.8	1.011 (0.975 to 1.047)	-0.499 (-2.170 to 1.171)	0.9987	97.3 to 105.7
4.8 to 93.9	1.006 (0.946 to 1.067)	1.161 (-2.217 to 4.538)	0.9963	90.9 to 102
1.2 to 169.8	1.034 (0.992 to 1.076)	0.9027 (-3.196 to 5.002)	0.9971	86.0 to 102.3

Interference

Interference was studied by mixing sera with known gliadin antibody levels with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. Results for IgA and IgG isotypes appear below.

Celiac G+ IgA

Sample	EU/mL	Hemoglobin		Bilirubin		RF	
		EU/mL	% Int	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int
Negative	8.5	9.4	-9.9	11.6	-26.5	11.3	-26.5
Cutoff 1	25.2	23.7	6.3	23.5	7.5	26.2	7.5
Cutoff 2	21.7	21.5	0.9	21.4	1.4	23.2	1.4
Positive 1	107.5	103.9	3.5	112.2	-4.2	118.0	-4.2
Positive 2	126.5	122.2	3.5	138.4	-8.5	137.6	-8.5

Celiac G+ IgG

	EU/mL	Hemoglobin		Bilirubin		RF	
		EU/mL	% Int	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int
Negative	5.0	4.7	5.5	4.6	8.4	5.9	-15.5
Cutoff 1	22.6	20.4	10.8	20.2	12.1	24.4	-7.5
Cutoff 2	18.0	19.5	-7.3	18.8	-4.0	22.4	-19.6
Positive 1	74.6	72.0	3.6	78.1	-4.4	82.2	-9.3
Positive 2	105.0	101.4	3.6	115.0	-8.7	114.4	-8.2

Hemoglobin: 2 g/L
 Bilirubin: 342 µmol/L
 RF: 100 EU/ml

semana Para um armazenamento de maior duração, as amostras de soro deverão ser congeladas. Evitar o repetido congelamento e derretimento das amostras. Recomenda-se que as amostras congeladas sejam testadas no prazo de um ano.

PROCEDIMENTO

Notas de Procedimento

- Ler cuidadosamente o folheto do produto antes de iniciar o ensaio.
- Todas as diluições das amostras dos pacientes devem ser preparadas antes de iniciar o ensaio.
- Permitir que as amostras dos pacientes e os reagentes de teste se equilibrem a uma temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento de teste. Sugere-se que os reagentes sejam deixados em cima da bancada, no exterior da caixa, durante 30 minutos antes da sua utilização. Voltar a colocar todas as amostras e reagentes no frigorífico imediatamente após a sua utilização.
- Eliminar as tiras necessárias dos micropoços da embalagem, voltando a fechá-la cuidadosamente, a fim de prevenir a condensação nos poços não utilizados. Voltar a colocar a embalagem de imediato no frigorífico.
- **Uma boa técnica de lavagem é fundamental.** Se a lavagem for realizada manualmente, consegue-se uma lavagem adequada direccionando o fluxo energético do tampão de lavagem por toda a microplaca através de um frasco de lavagem de ponta larga. **Recomenda-se a utilização de uma lavadora automática de microplacas.**
- Utilizar uma pipeta multicanal capaz de libertar 8 ou 12 poços em simultâneo. Este procedimento acelera o processo, fornecendo tempos de incubação mais uniformes.
- É importante o controlo cuidadoso do tempo para todos os passos. O início de todos os períodos de incubação começa com a conclusão da adição do reagente.
- A adição de todas as amostras e reagentes deve ser realizada na mesma proporção e na mesma sequência.

Método de Teste






- 1º Passo** Permitir que todos os reagentes e amostras se equilibrem a uma temperatura ambiente
- 2º Passo** Etiquetar a folha de protocolo indicando a colocação da amostra nos poços. A execução das amostras em duplicado constitui uma boa prática laboratorial.
- 3º Passo** Utilizar apenas o Calibrador D para obter uma **determinação qualitativa** (*ampola com tampa amarela*).
- ou**
- Utilizar os Calibradores A até E para uma **determinação semi-quantitativa**, conforme se descreve no esquema de amostras seguinte.

1 x 15 ml	IGG-CONJ HRP	REF 5159A. Pronto a utilizar. Código de cor rosa. Conjugado HRP de cabra IgG anti-humano para REF 5159G. Pronto a utilizar. Código de cor rosa.
1 x 60 ml	DIL	Diluyente de Soro. Pronto a utilizar. Código de cor púrpura.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrato enzimático TMB. Pronto a utilizar. Proteger da luz.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Solução de Paragem. Pronta a utilizar.
2 x ampolas	BUF WASH	Tampão de lavagem de pó. Reconstituir para um litro cada.
1 x		Folhas de Protocolo

Componentes Opcionais

1 x 60ml	BUF WASH	Tampão de Lavagem Líquido concentrado. Reconstituir para um litro.
----------	-----------------	---

Símbolos utilizados nas etiquetas

LOT	Número de lote
REF	Número de catálogo
IVD	[IVD] Utilização diagnóstica in vitro
	Utilizar até
	Temperatura de armazenamento
	Ler as instruções antes de utilizar
	Número de testes
	Fabricante

Material Exigido Mas Não Fornecido

- Água desionizada ou destilada
- Garrafa de plástico para conter o tampão de lavagem diluído
- Pipetas com capacidade de libertação de 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis
- Tubos de ensaio limpos de 12 x 75 mm e suporte para tubo de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorventes
- Leitor de microplacas capaz de ler valores de absorvância a 450 nm. Se estiver disponível um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda, o filtro de referência deve ser definido para 600-650 nm
- Lavador automático de microplacas capaz de distribuir 200 µl

RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só deverão ser utilizadas amostras de soro. As amostras excessivamente hemolizadas, lipémicas ou contaminadas microbiologicamente, podem interferir nos resultados do teste, não devendo ser utilizadas. Armazenar as amostras a uma temperatura entre 2ª a 8°C durante o máximo de uma



ImmunoLISA™

Κοιλιοκάκη G+

Αντίσωμα ELISA Πεπτιδίου Γλιαδίνης

IVD Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ

REF 5159A	ΚοιλιοκάκηG+ IgA ELISA	96 Προσδιορισμοί
REF 5159G	Κοιλιοκάκη G+ IgG ELISA	96 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Ένζυμικός ανοσοπροσοροφητικός προσδιορισμός (ELISA) για την ποιοτική και ημι-ποσοτική ανίχνευση αντισωμάτων IgA ή IgG στον ιστό τρανσγλουτινάσης στον ανθρώπινο ορό, προκειμένου να βοηθήσει στη διάγνωση κοιλιοκάκης σε συνδυασμό με άλλα εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΞΗΓΗΣΗ

Η κοιλιοκάκη (Κ) είναι μια αυτοάνοση γαστρεντερική διαταραχή που μπορεί να εμφανιστεί σε γενετικά ευαίσθητα άτομα λόγω της κατάποσης κόκκων που περιέχουν γλουτένη, όπως σιτάρι, κριθάρι και σίκαλη. Η κοιλιοκάκη χαρακτηρίζεται από αδυναμία απορρόφησης θρεπτικών συστατικών, η οποία προκύπτει από φλεγμονώδη τραυματισμό του μικρού εντερικού βλεννογόνου και όταν παρατείνεται, μπορεί να προκαλέσει υποσιτισμό. Τα κλασικά συμπτώματα κοιλιοκάκης περιλαμβάνουν διάρροια, απώλεια βάρους και υποσιτισμό. Μόνο ένα μικρό ποσοστό ασθενών με κοιλιοκάκη παρουσιάζει κλασικά συμπτώματα¹. Κατά συνέπεια, το κλινικό φάσμα της κοιλιοκάκης έχει αναπτυχθεί πολύ περισσότερο σε σχέση με το παρελθόν για να συμπεριλάβει ασθενείς που δεν παρουσιάζουν κλασικά συμπτώματα. Δεν είναι ασυνήθιστο τα αρχικά συμπτώματα να είναι μη γαστρεντερικά, ή όταν είναι γαστρεντερικά, να είναι ήπια ή να παρουσιάζονται σε άστατους ρυθμούς. Η ανάγκη εξέτασης ενός μεγαλύτερου φάσματος κλινικών συμπτωμάτων έχει οδηγήσει στη διάγνωση κοιλιοκάκης σε ένα μεγαλύτερο αριθμό ατόμων μεγαλύτερης ηλικίας, σε σχέση με κάθε άλλη φορά. Η έλευση των ορολογικών μεθόδων για την ανίχνευση αντισωμάτων σε γλιαδίνη, ενδομυϊκό και τρανσγλουταμινάση ιστού ενθάρρυναν μελέτες ελέγχου μεγάλης κλίμακας για κοιλιοκάκη, τόσο στην Ευρώπη όσο και στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Οι μελέτες αυτές υποδηλώνουν πως η κοιλιοκάκη είναι πολύ πιο διαδεδομένη από όσο θεωρούταν αρχικά.

Πρόσφατες ορολογικές μελέτες αποδεικνύουν συχνότητα κοιλιοκάκης μεταξύ μίας στις 100 και μίας στις 500.^{2,3} Η επικράτηση της κοιλιοκάκης είναι πολύ συχνότερη σε συγγενείς πρώτου και δεύτερου βαθμού ασθενών με κοιλιοκάκη. Η κοιλιοκάκη έχει συσχετιστεί με πολλές άλλες αυτοάνοσες διαταραχές, όπως διαβήτης τύπου 1, αυτοάνοση θυροειδούς, και άλλες αυτοάνοσες διαταραχές.

Οι πιο κοινές ορολογικές δοκιμασίες για την ανίχνευση κοιλιοκάκης είναι η μέθοδος ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση ενδομυϊκών αντισωμάτων (EMA) και οι μέθοδοι ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων σε ιστό τρανσγλουταμινάσης (tTG) και γλιαδίνης.⁴⁻⁸ Εξαιτίας της περιορισμένης

ευαισθησίας και ειδικότητας των χημικών δοκιμών για αντισώματα γλιαδίνης, η μέθοδος αυτή έχει αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό από τις EMA και tTG.

Ο περιορισμός των ανοσολογικών χημικών δοκιμών EMA και tTG έγκειται στο ότι και οι δυο ανοσολογικές χημικές δοκιμές ανιχνεύουν αντισώματα IgA, εμποδίζοντας τον προσδιορισμό των ασθενών με ανεπάρκεια σε IgA που πάσχουν από κοιλιοκάκη.⁹⁻¹¹ Τα τεστ αντισωμάτων για γλιαδίνη IgG είναι σημαντικά για τη διάγνωση κοιλιοκάκης σε ασθενείς με ανεπάρκεια IgA.¹⁰ Μελέτες δείχνουν ότι το 1-2% του γενικού πληθυσμού παρουσιάζει ανεπάρκεια σε IgA και ότι η συχνότητα της κοιλιοκάκης σε άτομα με ανεπάρκεια IgA είναι σημαντική, και για αυτό υπάρχει και η ανάγκη για συγκεκριμένα τεστ. Επιπρόσθετα, ορισμένες μελέτες αμφισβητούν την ιδιαιτερότητα των χημικών δοκιμών tTG καθώς και την ευαισθησία της EMA.¹²⁻¹⁶ Χημικές δοκιμές βασισμένες σε πεπτιδίο γλιαδίνης, έχουν δείξει ελλιθοφόρα αποτελέσματα, όσον αφορά την αντιμετώπιση των περιορισμών των τρεχόντων χημικών δοκιμών.¹⁷⁻²³ Η χημική δοκιμή της νέας γενιάς για την ανίχνευση αντισωμάτων γλιαδίνης, η Κοιλιοκάκη G+ ELISA, ενσωματώνει μια ιδιόκτητη τεχνολογία πεπτιδίων γλιαδίνης, η οποία παρέχει λεπτή και συγκεκριμένη ανίχνευση ομοιότυπων αντισωμάτων IgA ή IgG, με μεγάλο βαθμό αξιοπιστίας.

ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Το τεστ αυτό πραγματοποιείται ως μια στέρεα φάση ανοσολογικής χημικής δοκιμής. Οι μικροκοιλότητες είναι επικαλυμμένες με πεπτιδία γλιαδίνης, ακολουθούμενα από ένα βήμα για τη μείωση μη ειδικής δέσμευσης πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της χημικής δοκιμής. Έλεγχος, μετρητές και ορός ασθενούς επωάζονται στους επικαλυμμένους με αντιγόνο τοίχους, προκειμένου να επιτρέψουν στα ειδικά αντισώματα που είναι παρόντα στον ορό να συνδεθούν με το αντιγόνο γλιαδίνης. Μη συνδεδεμένα αντισώματα και άλλες πρωτεΐνες ορού έχουν απομακρυνθεί με το πλύσιμο των μικροκοιλοτήτων. Τα συνδεδεμένα αντισώματα ανιχνεύονται με την προσθήκη ενός ενζύμου που χαρακτηρίζεται ως αντι-ανθρώπινο IgA ή IgG και είναι συζευγμένο με τις μικροκοιλοότητες. Το δε ασύνδετο συζευγές, αφαιρείται με το πλύσιμο. Στη συνέχεια, υπόστρωμα ειδικού ενζύμου (TMB) προστίθεται στα φρέατα και η παρουσία αντισωμάτων ανιχνεύεται από μια αλλαγή χρώματος που παράγεται από τη μετατροπή του υποστρώματος TMB σε ένα προϊόν έγχρωμης αντίδρασης. Η αντίδραση διακόπτεται και η ένταση τη χρωματικής αλλαγής, η οποία είναι ανάλογη της περιεκτικότητας των αντισωμάτων, διαβάζεται από φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml) και αναφέρονται ως θετικά ή αρνητικά.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αποθήκευση και Προετοιμασία

Αποθηκεύστε όλα τα αντιδραστήρια στους 2-8°C. **Μην καταψύχετε.** Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης όταν αποθηκεύονται και μεταχειρίζονται σύμφωνα με την καθοδήγηση.

Μην χρησιμοποιείτε αν το αντιδραστήριο δεν είναι διαυγές ή υπάρχει ένζυμο παρόν. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν τη χρήση.

Precauções

Todos os componentes humanos utilizados foram testados para HBsAg, HCV, HIV-1 e 2, HTLV-I e considerados negativos pelos testes exigidos pela FDA. No entanto, os derivados do sangue humano e as amostras de pacientes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais de armazenamento, distribuição e eliminação destes materiais.²⁴

As instruções devem ser seguidas exactamente conforme constam no presente folheto deste kit, a fim de assegurar resultados válidos. Não trocar os componentes do kit por componentes provenientes de outras fontes. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais, a fim de minimizar a contaminação microbiana e cruzada dos reagentes aquando do seu manuseamento. Não utilizar os componentes do kit para além da data de validade impressa nas etiquetas.

Material fornecido

ImmuliSTM Celiac G+ IgA ELISA

[REF] 5159A

ImmuliSTM Celiac G+ IgG ELISA

[REF] 5159G

O kit contém reagentes suficientes para realizar 96 determinações.

12 x 8

[MICROPLATE|CG+]

Microplaca com micropoços individuais separados. Revestida de peptídeos desamidados da gliadina. Pronta a utilizar.

1 x 1,75 ml

[CONTROL|+|CG+A]

Controlo Positivo (*tampa vermelha*) pronto a utilizar para [REF] 5159A. Contém soro humano positivo para anticorpos gliadina IgA. A faixa de concentração esperada em EU/ml está impressa na etiqueta.

1 x 1,75 ml

[CONTROL|+|CG+G]

Controlo Positivo (*tampa vermelha*) pronto a utilizar para [REF] 5159G. Contém soro humano positivo para anticorpos gliadina IgG. A faixa de concentração esperada em EU/ml está impressa na etiqueta.

1 x 1,75 ml

[CONTROL|-]

Controlo Negativo pronto a utilizar (*tampa branca*). Contém soro humano.

5 x 1,75 ml

[CALIBRATOR|A|CG+A]

[CALIBRATOR|B|CG+A]

[CALIBRATOR|C|CG+A]

[CALIBRATOR|D|CG+A]

[CALIBRATOR|E|CG+A]

Conjunto de 5 Calibradores pronto a utilizar para [REF] 5159A. Calibrador A (*tampa verde*) 320 EU/ml, Calibrador B (*tampa violeta*) 160 EU/ml, Calibrador C (*tampa azul*) 80 EU/ml, Calibrador D (*tampa amarela*) 20 EU/ml, e Calibrador E (*tampa laranja*) 1 EU/ml. Produzido a partir do soro humano, contendo anticorpos gliadina IgA. As concentrações em EU/ml estão impressas nas etiquetas.

5 x 1,75 ml

[CALIBRATOR|A|CG+G]

[CALIBRATOR|B|CG+G]

[CALIBRATOR|C|CG+G]

[CALIBRATOR|D|CG+G]

[CALIBRATOR|E|CG+G]

Conjunto de 5 Calibradores pronto a utilizar para [REF] 5159G. Calibrador A (*tampa verde*) 160 EU/ml, Calibrador B (*tampa violeta*) 80 EU/ml, Calibrador C (*tampa azul*) 40 EU/ml, Calibrador D (*tampa amarela*) 20 EU/ml, e Calibrador E (*tampa laranja*) 1 EU/ml. Produzido a partir do soro humano, contendo anticorpos gliadina IgG. As concentrações em EU/ml estão impressas nas etiquetas.

1 x 15 ml

[IgA-CONJ|HRP]

Conjugado HRP de cabra IgA anti-humano para

deficiência de IgA com DC.⁹⁻¹¹ O teste de anticorpos IgG contra a gliadina são importantes para o diagnóstico de DC em pacientes que possuem deficiência de IgA.¹⁰ Os estudos revelam que 1-2% da população em geral possui deficiência de IgA e que a incidência de DC em indivíduos com deficiência em IgA é significativa, havendo por conseguinte a necessidade de realizar testes específicos. Em aditamento, alguns estudos questionam a especificidade dos ensaios tTG e da sensibilidade do EMA.¹²⁻¹⁶ Os ensaios baseados em peptídeos da gliadina revelaram resultados promissores na identificação das limitações dos ensaios actuais.¹⁷⁻²³ Este ensaio de nova geração para a detecção de anticorpos contra a gliadina, o Celiac G+ ELISA, incorpora uma tecnologia proprietária dos peptídeos da gliadina que fornecem a detecção sensível e específica de anticorpos de isotipo IgA ou IgG com elevado grau de rigor.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é realizado como um imunoenensaio de base sólida. Os micropoços são revestidos de peptídeos da gliadina desamidados, seguido por um passo bloqueador para reduzir a ligação da proteína não específica durante a realização do ensaio. Os controlos, os calibradores e o soro do paciente são incubados em poços revestidos com antigénios, permitindo que os anticorpos específicos presentes no soro se liguem ao antigénio da gliadina. Os anticorpos não ligados e as outras proteínas do soro são eliminados através da lavagem dos micropoços. Os anticorpos ligados são detectados pela adição de uma enzima conhecida como IgA anti-humana ou conjugado IgG aos micropoços. O conjugado não ligado é eliminado através de lavagem. Posteriormente, adiciona-se aos poços um substrato de uma enzima específica (TMB), detectando-se a presença de anticorpos, através de uma mudança de cor produzida pela conversão do substrato TMB para um produto de reacção colorido. A reacção é interrompida e a intensidade da mudança de cor, que é proporcional à concentração de anticorpos, é lida através de um espectrofotómetro a 450 nm. Os resultados são expressos em unidades ELISA por mililitro (EU/ml) e comunicados como positivos ou negativos.

REAGENTES

Armazenamento e Preparação

Armazenar todos os reagentes a 2-8°C. **Não congelar.** Os reagentes são estáveis até à data de expiração, quando são armazenados e manuseados conforme as orientações.

Não utilizar reagentes se estes não apresentarem uma cor transparente ou se houver presença de um precipitado. Todos os reagentes devem ser guardados a temperatura ambiente (20-25°C) antes da sua utilização.

Reconstituir o tampão de lavagem a 1 litro com água destilada ou desionizada. Quando armazenado a 2-8°C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade do kit.

As tiras de revestimento dos micropoços destinam-se a uma única utilização. As tiras dos micropoços não utilizadas devem ser cuidadosamente novamente seladas na bolsa com dessecantes, a fim de prevenir a condensação e ser armazenadas a 2-8°C.

Anasυνθέστε το διάλυμα πλύσης στο 1 λίτρο με απεσταγμένο ή απιοντισμένο νερό. Όταν αποθηκεύεται στους 2-8°C, το ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης του kit.

Οι λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων προορίζονται για χρήση μιας μόνο φοράς. Οι μη χρησιμοποιηθείσες λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων θα πρέπει να επανασφραγίζονται προσεκτικά στη σακούλα που περιέχει αποξηραντικές ουσίες για να αποφευχθεί υγραποίηση και να αποθηκεύονται στους 2-8°C.

Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά που παράγονται από τους ανθρώπους και χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για HBsAg, HCV, HIV-1 και 2 και HTLV-I και βρέθηκαν αρνητικά από απαιτούμενα τεστ FDA. Ωστός, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα των ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικώς μολυσματικά. Ακολουθήστε καλές εργαστηριακές πρακτικές αναφορικά με την αποθήκευση, τη παράδοση και τη διάθεση των υλικών αυτών.¹²

Οι οδηγίες θα πρέπει να ακολουθούνται ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο kit, προκειμένου να διασφαλιστούν έγκυρα αποτελέσματα. Μην ανταλλάσσετε τα στοιχεία του kit με αυτά από άλλες πηγές. Ακολουθήστε καλές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιήσετε τη μικροβιακή και την αλληλομόλυνση των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό. Μην χρησιμοποιείτε εξαρτήματα kit μετά την ημερομηνία λήξης στις ετικέτες.

Παρεχόμενα υλικά

ImmunoLisa™ Κοιλιοκάκη G+ IgA ELISA REF 5159A
ImmunoLisa™ Κοιλιοκάκη G+ IgG ELISA REF 5159G

Τα kit περιλαμβάνουν επαρκή αντιδραστήρια για να εκτελέσουν 96 προσδιορισμούς.

12 x 8 MICROPLATE|CG+ Μικρόπλακα με μεμονωμένες αποσχιτικές μικροκοιλότητες. Επικαλυμμένη με πεπτιδία γλιαδίνης. Έτοιμη για χρήση.

1 x 1,75 ml CONTROL|+|CG+A Έτοιμο για χρήση **Θετικού Ελέγχου** (κόκκινο καπάκι) για REF 5159A. Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα IgA γλιαδίνης. Το αναμενόμενο εύρος περιεκτικότητας σε EU/ml αναγράφεται στην ετικέτα.

1 x 1,75 ml CONTROL|+|CG+G Έτοιμο για χρήση **Θετικού Ελέγχου** (κόκκινο καπάκι) για REF 5159G. Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα IgG γλιαδίνης. Το αναμενόμενο εύρος περιεκτικότητας σε EU/ml αναγράφεται στην ετικέτα.

1 x 1,75 ml CONTROL|- Έτοιμο για χρήση το use **Αρνητικού Ελέγχου** (λευκό καπάκι). Περιέχει ανθρώπινο ορό.

5 x 1,75 ml CALIBRATOR|A|CG+A
CALIBRATOR|B|CG+A
CALIBRATOR|C|CG+A
CALIBRATOR|D|CG+A
CALIBRATOR|E|CG+A Έτοιμο για χρήση **σετ 5 Μετρητών** για REF 5159A. Μετρητής A (πράσινο καπάκι) 320 EU/ml, Μετρητής B (βιολετί καπάκι) 160 EU/ml, Calibrator C (μπλε καπάκι) 80 EU/ml, Μετρητής D (κίτρινο καπάκι) 20 EU/ml, και Μετρητής E (πορτοκαλί cap) 1 EU/ml. Παράγεται από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα γλιαδίνης IgA. Οι περιεκτικότητες σε EU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.

5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A CG+G CALIBRATOR B CG+G CALIBRATOR C CG+G CALIBRATOR D CG+G CALIBRATOR E CG+G	Έτοιμο για χρήση σετ 5 Μετρητών για REF 5159G. Μετρητής A (πράσινο καπάκι) 160 EU/ml, Μετρητής B (βιολετί καπάκι) 80 EU/ml, Calibrator C (μπλε καπάκι) 40 EU/ml, Μετρητής D (κίτρινο καπάκι) 20 EU/ml, και Μετρητής E (πορτοκαλί cap) 1 EU/ml. Παράγεται από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα γλισιδίνης IgG. Οι περιεκτικότητες σε EU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	HRP συζυγές αντί -ανθρώπινο IgA κατασκευασμένο για REF 5159A. Έτοιμο για χρήση. Κωδικοποιημένο πορφυρό χρώμα.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP συζυγές αντι-ανθρώπινο IgG κατασκευασμένο για REF 5159G. Έτοιμο για χρήση. Κωδικοποιημένο πορφυρό χρώμα.
1 x 60 ml	DIL	Αραιωτικός ορός. Έτοιμο για χρήση. Κωδικοποιημένο πορφυρό χρώμα.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Υπόστρωμα ενζύμου TMB. Έτοιμο για χρήση. Να προστατεύεται από το φως.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Διακόψτε το διάλυμα. Έτοιμο για χρήση.
2 x	BUF WASH	Σκόνη Πλύσης. Προχωρήστε σε ανασύσταση για κάθε ένα λίτρο.
1 x		Φύλλα Πρωτοκόλλου

Προαιρετικά Συστατικά

1 x 60ml	BUF WASH	Υγρό Συμπυκνωμένο Διάλυμα Πλύσης. Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο.
----------	----------	--

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται σε ετικέτες

LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
IVD	In vitro διαγνωστική χρήση
	Χρήση από
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Διαβάστε οδηγίες πριν τη χρήση
	Αριθμός δοκιμών
	Κατασκευαστής

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Πιέστε το μπουκάλι για να διατηρήσετε το αραιωμένο διάλυμα πλύσης
- Πιπέτες ικανές να αποδώσουν 5 μl ως και 1000 μl
- Διαθέσιμα στόμια πιπέτων
- Καθαρίστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες 12 x 75 mm και δοκιμάστε το ράφι των σωλήνων
- Χρονόμετρο
- Απορροφητικό χαρτί κουζίνας



ImmLisa™

Celiac G+

Anticorpo Peptídeo Gliadina ELISA

IVD Para utilização diagnóstica *in vitro*

FOLHETO DO PRODUTO

REF 5159A	Celiac G+ IgA ELISA	96 Determinações
REF 5159G	Celiac G+ IgG ELISA	96 Determinações

ÂMBITO DE UTILIZAÇÃO

Ensaio imuno-enzimático (ELISA) para a detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos IgA ou IgG contra a gliadina no soro humano para ajudar no diagnóstico da doença celíaca em conjunto com outras descobertas laboratoriais e clínicas.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A Doença Celíaca (DC) é uma patologia auto-imune gastrointestinal, relacionada com a sensibilização ao glúten em indivíduos geneticamente susceptíveis, despoletada pela ingestão de grãos que contêm glúten, como o trigo, a cevada e o centeio. A DC caracteriza-se pela má absorção resultante de lesão inflamatória da mucosa do intestino delgado e, quando prolongada, pode provocar a desnutrição. Os sintomas clássicos da DC incluem a diarreia, a perda de peso e a desnutrição. No entanto, só uma pequena percentagem de pacientes com DC apresenta sintomas clássicos.¹ Consequentemente, o quadro clínico da DC tem crescido de forma mais alargada do que no passado, incluindo os pacientes que não apresentam sintomas clássicos. Não é raro que os sintomas iniciais sejam não gastrointestinais e que os sintomas gastrointestinais, se existirem, sejam leves ou intermitentes. A necessidade de avaliar uma gama mais alargada de apresentação clínica conduziu a quantidades superiores sem precedentes de indivíduos diagnosticados com DC numa fase mais tardia da vida. O advento dos métodos sorológicos para a detecção de anticorpos contra a gliadina, o endomísio e a Transglutaminase Tecidual, permitiram realizar estudos de rastreio da DC, em grande escala, na Europa e nos Estados Unidos. Estes estudos sugerem que a DC é, de longe, mais prevalente do que se pensava. Estudos sorológicos recentes demonstram a incidência de DC entre um em 100 e um em 500.^{2,3} A prevalência da DC é muito mais elevada nos familiares de primeiro e segundo grau de pacientes com DC. A DC tem sido associada a diversos distúrbios auto-ímmunes, como a diabetes tipo 1, a doença auto-imune da tireóide e a outros distúrbios auto-ímmunes.

Os testes sorológicos mais comuns para o rastreio da DC consistem no método da imunofluorescência para a detecção de anticorpos contra o endomísio (EMA) e os métodos ELISA para a detecção da transglutaminase tecidual (tTG) e da gliadina.⁴⁻⁸ Devido à limitada sensibilidade e especificidade dos ensaios dos anticorpos contra a gliadina, este método tem sido largamente substituído pelos EMA e tTG.

A limitação dos imunoenaios do EMA e do tTG consiste em que ambos detectam os anticorpos IgA, impedindo a identificação de pacientes com

Interferenza

L'interferenza è stata studiata mescolando sieri con livelli noti di anticorpi anti-gliadina con campioni di siero potenzialmente interferenti e studiando la deviazione dai risultati attesi. I risultati per gli isotipi IgA e IgG sono mostrati di seguito.

IgA Celiac G+							
Campione	Emoglobina			Bilirubina		RF	
	UE/ml	UE/ml	% Int	UE/ml	% Int	UE/ml	% Int
Negativo	8,5	9,4	-9,9	11,6	-26,5	11,3	-26,5
Cutoff 1	25,2	23,7	6,3	23,5	7,5	26,2	7,5
Cutoff 2	21,7	21,5	0,9	21,4	1,4	23,2	1,4
Positivo 1	107,5	103,9	3,5	112,2	-4,2	118,0	-4,2
Positivo 2	126,5	122,2	3,5	138,4	-8,5	137,6	-8,5

IgG Celiac G+							
	Emoglobina			Bilirubina		RF	
	UE/ml	UE/ml	% Int	UE/ml	% Int	UE/ml	% Int
Negativo	5,0	4,7	5,5	4,6	8,4	5,9	-15,5
Cutoff 1	22,6	20,4	10,8	20,2	12,1	24,4	-7,5
Cutoff 2	18,0	19,5	-7,3	18,8	-4,0	22,4	-19,6
Positivo 1	74,6	72,0	3,6	78,1	-4,4	82,2	-9,3
Positivo 2	105,0	101,4	3,6	115,0	-8,7	114,4	-8,2

Emoglobina: 2 g/l
Bilirubina: 342 µmol/l
RF: 100 UE/ml

- Αναγνώστης μικροπλακών ικανός να αναγνώσει τις τιμές απορρόφησης στα 450 nm. Εάν είναι διαθέσιμος ο αναγνώστης μικροπλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm
- Αυτόματο πλυντήριο μικροπλακών που μπορεί να παρέχει 200 ml

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μόνον δείγματα ορού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σ' αυτήν τη διαδικασία. Αιμολυμένα, λιπαιμικά ή βακτηριδιακά επιμολυσμένα δείγματα μπορούν να παρεμβληθούν στην εκτέλεση της δοκιμασίας και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα δεν θα πρέπει να φυλάσσονται για παραπάνω από μία εβδομάδα στους 2°- 8°C. Για αποθήκευση μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγετε επανειλημμένη απόψυξη και νέα ψύξη των δειγμάτων. Συνιστάται τα κατεψυγμένα δείγματα να υποβάλλονται σε έλεγχο εντός ενός έτους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις διαδικασίας

- Διαβάστε προσεκτικά το ένθεμα του προϊόντος πριν να ξεκινήσετε τη χημική δοκιμή.
- Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών θα πρέπει να προετοιμαστούν πριν την έναρξη της χημικής δοκιμής
- Αφήστε τα δείγματα των ασθενών και ισορροπήστε τα αντιδραστήρια δοκιμών σε θερμοκρασία δωματίου πριν να ξεκινήσετε με τη πειραματική διαδικασία. Συνιστάται να μένουν τα αντιδραστήρια στον πάγκο έξω από το κουτί για 30 λεπτά πριν τη χρήση. Επιστρέψτε όλα τα αχρησιμοποιήτα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση.
- Αφαιρέστε τις απαιτούμενες ταινίες μικροκοιλοτήτων από τη θήκη και προσεκτικά επανασφραγίστε τη θήκη για να αποφύγετε τη συμπύκνωση στα αχρησιμοποιήτα φρεάτια. Επιστρέψτε τη θήκη αμέσως στο ψυγείο.
- **Η τεχνική καλής πλύσης είναι πολύ σημαντική.** Εάν το πλύσιμο γίνεται στο χέρι, το κατάλληλο πλύσιμο επιτυγχάνεται με την κατεύθυνση μιας δυναμικής ροής ενός διαλύματος πλύσης με φαρδύ στόμιο σε όλη τη μικρόπλακα. **Συνιστάται ένα αυτοματοποιημένο πλυντήριο μικρόπλακας.**
- Χρησιμοποιήστε ένα σιφώνι πολλών διαύλων, ικανό να παράσχει 8 ή 12 φρεάτια ταυτόχρονα. Αυτό επιταχύνει τη διαδικασία και παρέχει μια πιο ομοιόμορφη περίοδο επώασης. .
- Για όλα τα βήματα, ο προσεκτικός έλεγχος του χρόνου είναι σημαντικός. Η έναρξη όλων των περιόδων επώασης ξεκινά με τη συμπλήρωση της προσθήκης του αντιδραστηρίου.
- Προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων θα πρέπει να πραγματοποιείται στον ίδιο ρυθμό και σειρά.

Μέθοδος δοκιμασίας

Βήμα 1 Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 2 Επιγράψτε το φύλλο πρωτοκόλλου για να υποδηλώσετε την τοποθέτηση του δείγματος στα φρεάτια. Είναι ορθή εργαστηριακή πρακτική η εκτέλεση δειγμάτων εις διπλούν.

Βήμα 3 Για ένα **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο τον Μετρητή D φιαλίδιο με κίτρινο καπάκι/)

ή

Για ένα **ημί-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τους μετρητές A ως και E όπως απεικονίζεται στο σχεδιάγραμμα δείγματος παρακάτω.

Ποιοτικός			Ημι-Ποσοτικός				
A	Κενός	S5	Κ.λπ.	A	Κενός	S1	Κ.λπ.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Βήμα 4 Ετοιμάστε μια διάλυση **1:101** δειγμάτων των ασθενών ανακατεύοντας **5 μl** του ορού του ασθενούς με **500ul** διαλύτη του ορού.

Βήμα 5 Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκοιλότητες από τη θήκη και επιστρέψτε τις αχρησιμοποίητες ταινίες στη σφραγισμένη θήκη στο ψυγείο. Τοποθετήστε με ασφάλεια τις μικροκοιλότητες στον έξτρα παρεχόμενο κάτοχο.

Βήμα 6 Πιπέτα **100 μl** με μετρητές έτοιμους προς χρήση, θετικούς και αρνητικούς ελέγχους και αραιωμένα δείγματα ασθενών (**1:101**) στις κατάλληλες μικροκοιλότητες, σύμφωνα με το φύλλο πρωτοκόλου.

Σημείωση: Συμπεριλάβετε ένα φρεάτιο το οποίο περιέχει **100 μl** του διαλύτη ορού, ως τυφλό αντιδραστήριο. Μηδενίστε τον αναγνώστη ELISA έναντι του τυφλού αντιδραστήριου.

Βήμα 7 Επώαστε **30 minutes** (\pm 5 min) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 8 Πλύνετε **4x** με διάλυμα πλύσης. Για πλύσιμο στο χέρι, γεμίστε κάθε μικροκοιλότητα με διάλυμα πλύσης που έχει ανασυσταθεί. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας και ακουμπώντας τα περιεχόμενα κάθε φρεατίου, ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε φρεάτιο. Για να στιγματίσετε το τέλος κάθε πλυσίματος, αναστρέψτε τις ταινίες και ακουμπήστε τα φρεάτια σθεναρά σε απορροφητικό χαρτί κουζίνας. Για αυτόματα πλυντήρια, προγραμματίστε το πλυντήριο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Βήμα 9 Πιπέτα **100 μl** του συζευγής σε μικροκοιλότητες.

Βήμα 10 Επώαστε **30 minutes** (\pm 5 min) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 11 Πλύνετε όλες τις μικροκοιλότητες όπως στο βήμα 8.

Βήμα 12 Πιπέτα **100 μl** από υπόστρωμα ενζύμου σε κάθε μικροκοιλότητα σε κάθε σειρά και χρόνο όπως ισχύει για το συζευγής.

Kit	N. c	Media (UE/ml)	Imprecisione totale		Tra i giorni		Tra le sessioni (Ripetibilità)	
			DS (UE/ml)	CV%	DS (UE/ml)	CV%	DS (UE/ml)	CV%
Dosaggio IgA Celiac G+	1	15,38	1,713	11,1%	2,474	16,2%	0,572	3,7%
	2	22,09	1,649	7,5%	2,011	9,1%	1,392	6,3%
	3	27,23	1,792	6,6%	1,932	7,1%	1,807	6,7%
	4	37,08	2,565	6,9%	3,043	8,2%	2,277	6,2%
	5	79,94	6,027	7,5%	8,438	10,7%	2,686	3,3%
	6	180,68	5,734	3,2%	7,852	4,3%	3,205	1,8%
	7	186,77	7,926	4,2%	10,837	5,9%	3,872	2,1%
	8	341,97	9,786	2,9%	10,389	3,0%	10,137	3,0%
Dosaggio IgG Celiac G+	1	13,97	0,827	5,9%	0,884	6,4%	0,757	5,3%
	2	23,10	1,274	5,5%	0,327	1,4%	1,821	7,8%
	3	33,81	2,071	6,1%	2,552	7,6%	1,696	5,0%
	4	91,83	3,472	3,8%	4,504	5,0%	1,723	1,9%
	5	116,49	4,360	3,7%	5,813	5,1%	1,349	1,1%
	6	120,44	3,008	2,5%	2,713	2,3%	2,770	2,3%
	7	179,74	4,661	2,6%	5,461	3,1%	3,998	2,2%

Limite di rilevamento

Il limite di rilevamento (LoD) è stato determinato in base a 60 replicati del bianco e 10 replicati ciascuno dei 6 campioni a basso livello (NHS). Il Lod per le IgA era di 8,9 UE/ml. Il Lod per le IgG era di 2,2 UE/ml.

Linearità e recupero

La linearità e il recupero sono stati testati diluendo i campioni positivi attraverso l'intervallo del dosaggio in soluzioni equidistanti e confrontando i risultati reali con quelli attesi. L'intervallo lineare del dosaggio determinato è stato di 8,9 (LoD), 320 UE/ml per le IgA; 2,2 (LoD), 160 UE/ml per le IgG. I risultati sono riepilogati di seguito:

Test Intervallo (UE/ml)	Pendenza (IC al 95%)	Intercetta Y (IC al 95%)	R ²	% recupero (ottenuto/atteso)
IgA				
7,2 - 70,3	0,971 (0,907 - 1,035)	0,468 (-2,415 - 3,349)	0,9958	97,3 - 106,9
4,4 - 136	0,987 (0,942 - 1,033)	2,203 (-1,518 - 5,924)	0,9979	88,9 - 103,3
1,1 - 309,6	0,993 (0,909 - 1,076)	-4,609 (-18,092 - 11,808)	0,9946	94,4 - 114,8
IgG				
5,2 - 75,8	1,011 (0,975 - 1,047)	-0,499 (-2,170 - 1,171)	0,9987	97,3 - 105,7
4,8 - 93,9	1,006 (0,946 - 1,067)	1,161 (-2,217 - 4,538)	0,9963	90,9 - 102
1,2 - 169,8	1,034 (0,992 - 1,076)	0,9027 (-3,196 - 5,002)	0,9971	86,0 - 102,3

Popolazione CD confermata mediante EMA

		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	78	5	83
CELIAC G+	Negativo	18	55	73
IgA ELISA	Totale	96	60	156

Sensibilità stimata: 81,3% (95% IC 71,7% - 88,2%)

Specificità stimata: 91,7% (95% IC 80,9% - 96,9%)

Concordanza: 85,3% (95% IC 78,5% - 90,2%)

Soggetti celiaci positivi per EMA: 96

Controlli di malattia: 7

Soggetti sani normali: 53

Popolazione CD confermata mediante EMA

		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	94	3	97
CELIAC G+	Negativo	11	105	116
IgG ELISA	Totale	105	108	213

Sensibilità stimata: 89,5% (95% IC 81,6% - 94,4%)

Specificità stimata: 97,2% (95% IC 91,5% - 99,3%)

Concordanza: 93,4% (95% IC 89,0% - 96,2%)

Soggetti celiaci positivi per EMA: 105

Controlli di malattia: 20

Soggetti sani normali: 88

C. Reattività crociata: 50 campioni totali con reattività crociata potenziale, provenienti da soggetti con altri disturbi immunitari o positivi per altri autoanticorpi, sono stati testati per gli anticorpi anti-gliadina utilizzando il sistema Immulisa™ Celiac G+.

Condizione	n	IgA Positivo n (%)	IgG Positivo n (%)
Malattia di Graves	11	0 (0%)	0 (0%)
Tiroidite di Hashimoto	11	1 (9%)	0 (0%)
ANA positivo*	9	0 (0%)	0 (0%)
CCP positivo**	10	0 (0%)	2 (20%)
RF positivo***	9	1 (11%)	0 (0%)
Totale	50	2 (4%)	2 (4%)

* Anticorpi antinucleari

** Anticorpi anti-peptidi citrullinati ciclici

*** Anticorpi del fattore reumatoide

Precisione

La precisione è stata testata con campioni multipli selezionati attraverso l'intervallo del dosaggio. Sono stati eseguiti tre dosaggi in giorni differenti per determinare i risultati tra i giorni. È stata eseguita un'altra sessione di sei replicati per determinare la ripetibilità. I risultati sono riepilogati di seguito.

Bήμα 13 Επρώστε **30 minutes** (\pm 5 min) σε θερμοκρασία δωματίου.

Bήμα 14 Πιπέτα **100 μl** με διάλυμα σε κάθε μικροκοιλότητα χρησιμοποιώντας την ίδια σειρά και χρόνο όπως και με την προσθήκη του υποστρώματος ενζύμου. Διαβάστε τις τιμές απορρόφησης εντός **30 λεπτών** από την προσθήκη του διαλύματος.

Bήμα 15 Διαβάστε την απορρόφηση κάθε μικροκοιλότητας στα **450 nm** χρησιμοποιώντας μια μεμονωμένη μικροκοιλότητα στα 450/630nm χρησιμοποιώντας έναν αναγνώστη μικροπλακιδίων διπλού μήκους έναντι του τυφλού αντιδραστήριου, σε ρύθμιση μηδενικής απορρόφησης.

Ποιοτικός Έλεγχος

Οι μετρητές, οι θετικοί και οι αρνητικοί έλεγχοι και ένα τυφλό αντιδραστήριο θα πρέπει να αναλύονται με κάθε χημική δοκιμή, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της δοκιμασίας. Η ανάγνωση της απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου θα πρέπει να είναι <0.3 . Ο μετρητής A θα πρέπει να έχει μια ανάγνωση απορρόφησης, όχι λιγότερη από 1.0, αλλιώς η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί. Ο αρνητικός έλεγχος θα πρέπει να είναι <5 EU/ml. Εάν η δοκιμασία που θα διεξαχθεί θα είναι εις διπλούν, ο μέσος όρος των δυο αναγνώσεων θα πρέπει να ληφθεί προκειμένου να προσδιοριστεί το EU/ml. Κατά την εκτέλεση ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του μετρητή D θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτή του αρνητικού ελέγχου και λιγότερη από την απορροφητικότητα του θετικού ελέγχου. Για ημί-ποσοτικό προσδιορισμό, ο θετικός έλεγχος θα πρέπει να δίνει τιμές στο εύρος που αναφέρεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι περιεκτικότητες των δειγμάτων ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν με μια από τις δυο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Abs. of δείγμα δοκιμασίας

----- X EU/ml του μετρητή D = EU/ml δείγμα δοκιμασίας

Abs. του μετρητή D

Συνιστάται τα ποιοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως "θετικά" ή "αρνητικά." Τα αποτελέσματα δειγμάτων που είναι μεγαλύτερα από ή ίσα με τον Βαθμονομητή Δ θεωρούνται θετικά.

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Σχεδιάστε την απορρόφηση του μετρητή A ως E έναντι των αντιστοίχων περιεκτικότητων τους στο γραμμικό διάγραμμα. Σχεδιάστε τις περιεκτικότητες σε EU/ml στον άξονα X, έναντι της απορροφητικότητας στον άξονα Y και σχεδιάστε από σημείο σε σημείο μια καμπύλη που να ταιριάζει. Προσδιορίστε τις περιεκτικότητες των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σύμφωνα με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης. Εναλλακτικά, μια καμπύλη τεσσάρων παραμέτρων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να σχεδιαστεί η κανονική καμπύλη.

Συνιστάται τα ημι-ποσοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά,” “αρνητικά,” ή “απροσδιόριστα” με τιμές μονάδας EU/ml. Τα απροσδιόριστα/οριακά αποτελέσματα θα πρέπει να επανελέγχονται και αξιολογούνται μαζί με άλλες εργαστηριακές μεθόδους.

Ερμηνεία

Τα ακόλουθα χρησιμεύουν μόνο ως οδηγός για την ερμηνεία των εργαστηριακών ευρημάτων. Οι τιμές αυτές προσδιορίστηκαν από τη δοκιμή 64 ανθρωπίνων ορών και 50 ελέγχων ασθενειών που δε σχετίζονται με την κοιλιοκάκη. Οι τιμές που απεικονίζονται παρακάτω είναι ο μέσος όρος των φυσιολογικών ατόμων συν 2CD. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να προσδιορίζει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

Τιμή Ab αντί-γλιαδίνης	Ερμηνεία
<20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Οριακό
>25 EU/ml	Θετικό

Μετρητής

Οι μετρητές που είναι έτοιμοι για χρήση, περιλαμβάνονται για να παράσχουν ακριβή ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται με κάθε εκτέλεση. Δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων μπορεί να δώσουν τιμές απορρόφησης μεγαλύτερες από αυτή του μετρητή 'Α. Για προσδιορισμό σωστών ημι-ποσοτικών τιμών, τέτοια δείγματα θα πρέπει να αραιώνονται περαιτέρω, έτσι ώστε να εμπίπτουν στο εύρος της καμπύλης του μετρητή, όταν γίνει επανεξέταση. Για τον προσδιορισμό των τιμών EU/ml πολλαπλασιάστε τις μονάδες που λαμβάνονται από τον παράγοντα αραιώσης.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Μόνο τα δείγματα ορού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε αυτή τη διαδικασία.. Χονδροειδώς αιμολυμένα, λιπαιμικά ή μικροβιακά μολυσμένα δείγματα, μπορεί να επηρεάσουν την εκτέλεση της δοκιμής και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν. Αποθηκεύστε τα δείγματα στους 2°- 8°C, όχι για περισσότερο από μια εβδομάδα. Για μεγαλύτερο διάστημα αποθήκευσης, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψυχθούν. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και την απόψυξη των δειγμάτων.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Τα αποτελέσματα των δοκιμών σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό συνήθως αναμένεται να είναι αρνητικά. Ωστόσο, καθώς η συχνότητα εμφάνισης της κοιλιοκάκης σε φυσιολογικό πληθυσμό ανέρχεται περίπου στο 1%, ορισμένα φαινομενικά υγιή, ασυμπτωματικά άτομα, μπορεί να φανούν θετικά στο Celiac G+ ELISA.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα της ImmuLisa™ Κοιλιοκάκης G+ ELISAs για την ανίχνευση αντισωμάτων γλιαδίνης αξιολογήθηκε από τη δοκιμή καλοχαρακτηρισμένων δειγμάτων θετικού ορού EMA από άτομα που είναι ύποπτα για κοιλιοκάκη,

LIMITI DELLA PROCEDURA

In questa procedura, utilizzare solo campioni di siero. I campioni con emolisi macroscopica, lipemia o contaminazione batterica possono interferire con le prestazioni del test e non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a da 2-8°C per una settimana al massimo. Per conservazioni più lunghe, congelare i campioni di siero. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni.

VALORI ATTESI

I risultati del test attesi in una popolazione normale sono solitamente negativi. Tuttavia, dato che l'incidenza della CD nella popolazione normale è di circa l'1%, alcuni soggetti apparentemente sani e asintomatici possono risultare positivi al test ELISA Celiac G+.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

L'utilità dei test ELISA ImmuLisa™ Celiac G+ per il rilevamento degli anticorpi anti-gliadina è stata valutata testando campioni di siero positivi per EMA ben caratterizzati di soggetti con CD sospetta accanto a controlli di malattia e sierici umani "normali". Questi campioni sono anche stati testati su kit di test commercialmente disponibili. Solo i campioni nell'intervallo lineare del dosaggio sono stati inclusi nel confronto dei metodi. Questi risultati sono riepilogati di seguito.

A. Celiac G+ vs. altro kit anticorpi anti-peptide gliadina:

		Altro ELISA IgA Gliadin		
		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	54	27	81
CELIAC G+	Negativo	7	68	75
IgA ELISA	Totale	61	95	156
Concordanza percentuale positiva:		88,5% (95% IC 77,2% - 94,9%)		
Concordanza percentuale negativa:		71,6% (95% IC 61,3% - 80,1%)		
Concordanza percentuale totale:		78,2% (95% IC 70,8% - 84,3%)		

		Altro ELISA IgG Gliadin		
		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	88	9	97
CELIAC G+	Negativo	7	109	116
IgG ELISA	Totale	95	118	213
Concordanza percentuale positiva:		92,6% (95% IC 84,9% - 96,7%)		
Concordanza percentuale negativa:		92,4% (95% IC 85,6% - 96,2%)		
Concordanza percentuale totale:		92,5% (95% IC 87,9% - 95,5%)		

B. Celiac G+ vs. EMA: i risultati ottenuti con i test ELISA Celiac G+ sono stati confrontati con il titolo degli anticorpi anti-endomisio (EMA) ottenuti utilizzando un kit IFA commercialmente disponibile e una popolazione clinica ben caratterizzata. Solo i campioni nell'intervallo lineare del dosaggio sono stati inclusi nel confronto dei metodi. Questi risultati sono riepilogati di seguito.

Άτομα Θετικής Κοιλιοκάκης EMA: 105

Έλεγχοι Ασθενειών: 20

Υγιή Φυσιολογικά Άτομα: 88

C. Διασταυρούμενη αντίδραση: Ένα σύνολο 50 δυνητικώς διασταυρούμενων-αντιδρώντων ειδών από άτομα με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές ή θετικό αποτέλεσμα για άλλα αυτοαντισώματα υπεβλήθησαν σε τεστ για αντισώματα γλιαδίνης με τη χρήση του συστήματος ImmuLisa™ Κοιλιοκάκη G+.

Κατάσταση	n	IgA Θετικό n (%)	IgG Θετικό n (%)
Ασθένεια του Graves'	11	0 (0%)	0 (0%)
Θυροειδίτιδα του Hashimoto's	11	1 (9%)	0 (0%)
ANA θετικά*	9	0 (0%)	0 (0%)
CCP θετικά**	10	0 (0%)	2 (20%)
RF θετικά***	9	1 (11%)	0 (0%)
Σύνολο	50	2 (4%)	2 (4%)

* Αντιπυρηνικά Αντισώματα

** Αντισώματα Κυκλικών Πεπτιδίων

*** Αντισώματα Ρευματοειδή Παράγοντα

Precision

Δοκιμάστηκε ακρίβεια με πολλαπλά δείγματα που επιλέχθηκαν σε όλο το εύρος της χημικής δοκιμής. Τρεις χημικές δοκιμές διεξήχθησαν σε διαφορετικές μέρες, προκειμένου να προσδιοριστούν τα αποτελέσματα μεταξύ των ημερών. Έξι επιπρόσθετες επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν, προκειμένου να προσδιοριστεί η επαναληψιμότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται περιληπτικά παρακάτω:

Kit	S #	Τρόπος (EU/ml)	Σύνολο ανακρίβειας		Μεταξύ ημερών		Εντός επαναληψίας	
			SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)		SD (EU/ml)	SD
Χημ.Δοκ G+ IgA	1	15,38	1,713	11,1%	2,474	16,2%	0,572	3,7%
	2	22,09	1,649	7,5%	2,011	9,1%	1,392	6,3%
	3	27,23	1,792	6,6%	1,932	7,1%	1,807	6,7%
	4	37,08	2,565	6,9%	3,043	8,2%	2,277	6,2%
	5	79,94	6,027	7,5%	8,438	10,7%	2,686	3,3%
	6	180,68	5,734	3,2%	7,852	4,3%	3,205	1,8%
	7	186,77	7,926	4,2%	10,837	5,9%	3,872	2,1%
	8	341,97	9,786	2,9%	10,389	3,0%	10,137	3,0%
Χημ.Δοκ G+ IgG	1	13,97	0,827	5,9%	0,884	6,4%	0,757	5,3%
	2	23,10	1,274	5,5%	0,327	1,4%	1,821	7,8%
	3	33,81	2,071	6,1%	2,552	7,6%	1,696	5,0%
	4	91,83	3,472	3,8%	4,504	5,0%	1,723	1,9%
	5	116,49	4,360	3,7%	5,813	5,1%	1,349	1,1%
	6	120,44	3,008	2,5%	2,713	2,3%	2,770	2,3%
	7	179,74	4,661	2,6%	5,461	3,1%	3,998	2,2%

Passaggio 4 Preparare una diluizione **1:101** dei campioni del paziente mescolando **5 µl** dei sieri del paziente con **500 µl** di Diluente per siero.

Passaggio 5 Rimuovere i micropozzetti richiesti dalla busta e rimettere nel frigorifero le strisce non utilizzate nella busta sigillata. Posizionare perfettamente i micropozzetti nel supporto aggiuntivo fornito.

Passaggio 6 Pipettare **100 µl** dei calibratori pronti all'uso, dei controlli positivo e negativo e dei campioni del paziente diluiti (**1:101**) nei micropozzetti appropriati come indicato nella scheda del protocollo.

Nota: includere un pozzetto contenente **100 µl** del Diluente per siero come reagente bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il reagente bianco.

Passaggio 7 Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Passaggio 8 Lavare **4x** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ogni micropozzetto con tampone di lavaggio ricostituito. Gettare il fluido presente nei pozzetti invertendo questi ultimi e picchiettandone il fondo oppure aspirando il liquido contenuto. Per l'asciugatura al termine dell'ultimo lavaggio, invertire le strisce e picchiettare energicamente i pozzetti su fogli di carta assorbente. Per le lavatrici automatiche, programmare la macchina in base alle istruzioni del produttore.

Passaggio 9 Pipettare **100 µl** di Coniugato nei micropozzetti.

Passaggio 10 Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Passaggio 11 Lavare tutti i micropozzetti come nel Passaggio 8.

Passaggio 12 Pipettare **100 µl** di Substrato enzimatico in ogni micropozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi del Coniugato.

Passaggio 13 Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Passaggio 14 Pipettare **100 µl** di Soluzione di arresto in ogni micropozzetto utilizzando lo stesso ordine e gli stessi tempi del Substrato enzimatico. Leggere i valori di assorbanza entro **30 minuti** dall'aggiunta della Soluzione di arresto.

Passaggio 15 Leggere l'assorbanza di ogni micropozzetto a **450 nm** utilizzando un lettore per micropiastre a lunghezza d'onda singola o doppia (450/630 nm) contro il reagente bianco impostato ad assorbanza zero.

Controllo di qualità

Inserire in ogni dosaggio i calibratori, i controlli positivo e negativo e il reagente bianco per verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza per il reagente bianco deve essere < 0,3. Il Calibratore A deve avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti il test deve essere ripetuto. Il Controllo negativo deve essere < 5 UE/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, calcolare la media di due letture per determinare il valore in UE/ml. Durante l'esecuzione delle determinazioni qualitative, la densità ottica del Calibratore D deve essere superiore a quella del controllo negativo e inferiore all'assorbanza del controllo positivo. Per le determinazioni semiquantitative, il Controllo positivo deve fornire valori compresi nell'intervallo dichiarato sul flaconcino.

- Tutte le diluizioni dei campioni del paziente vanno preparate prima di iniziare il dosaggio.
- Prima di avviare la procedura del test, attendere che i campioni del paziente e i reagenti del test abbiano raggiunto la temperatura ambiente. Prima dell'uso, si consiglia di lasciare i reagenti sul piano di lavoro e fuori dalla scatola per 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso, rimettere nel frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
- Rimuovere le strisce di micropozzetti necessarie dalla busta e risigillare accuratamente quest'ultima per evitare la formazione di condensa nei pozzetti non utilizzati. Rimettere immediatamente la busta nel frigorifero.
- **È fondamentale una tecnica di lavaggio valida.** Se il lavaggio viene effettuato manualmente, è adeguato se viene eseguito dirigendo un energico getto di tampone di lavaggio con un flacone di lavaggio a bocca larga sull'intera micropiastra. **Si raccomanda l'uso di una lavatrice automatica per micropiastre.**
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di riempire 8 o 12 pozzetti allo stesso tempo. Ciò accelera il lavoro e fornisce tempi di incubazione più uniformi.
- Per tutti i passaggi è importante controllare accuratamente i tempi. L'inizio di tutti i periodi di incubazione corrisponde al completamento dell'aggiunta del reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e i reagenti deve avvenire alla stessa velocità e con la stessa sequenza.

Metodo del test

Passaggio 1 Attendere che tutti i reagenti e i campioni raggiungano la temperatura ambiente.

Passaggio 2 Etichettare la scheda del protocollo per indicare l'inserimento del campione nei pozzetti. La buona pratica di laboratorio richiede di analizzare i campioni in duplicato.

Passaggio 3 Per una **determinazione qualitativa** utilizzare solo il Calibratore D (flaconcino con tappo giallo).

oppure

Per una **determinazione semiquantitativa** utilizzare i Calibratori da A fino ad E come illustrato nel seguente schema esemplificativo.

Qualitativa				Semiquantitativa			
A	Bianco	S5	Ecc.	A	Bianco	S1	Ecc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+ Controllo	S7		C	+ Controllo	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Orario ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (LoD) προσδιορίστηκε βάσει 60 επαναλήψεων του τυφλού αντιδραστηρίου και 10 επαναλήψεων για καθένα από τα δείγματα (NHS) 6 χαμηλών επιπέδων. Το LoD για το IgA ήταν 8,9 EU/ml και για το IgG 2,2 EU/ml.

Γραμμικότητα και ανάρρωση

Η γραμμικότητα και η ανάρρωση δοκιμάστηκαν με την αραιώση θετικών δειγμάτων μέσω του εύρους της χημικής δοκιμής σε ισόποσες διαλύσεις και συγκρίνοντας τα πραγματικά με τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Το γραμμικό εύρος των χημικών δοκιμών προσδιορίστηκε στο 8.9 (LoD) – 320 EU/ml για το IgA και 2.2 (LoD) – 160 EU/ml για το IgG. Τα αποτελέσματα αναφέρονται περιληπτικά παρακάτω:

Δοκιμή Εύρους (EU/ml)	Κλίση (95% CI)	Υ-διακοπή (95% CI)	R ²	% ανάρρωση (πραγματική/αναμενόμενη)
IgA				
7,2 - 70,3	0,971 (0,907 - 1,035)	0,468 (-2,415 - 3,349)	0,9958	97,3 - 106,9
4,4 - 136	0,987 (0,942 - 1,033)	2,203 (-1,518 - 5,924)	0,9979	88,9 - 103,3
1,1 - 309,6	0,993 (0,909 - 1,076)	-4,609 (-18,092 - 11,808)	0,9946	94,4 - 114,8
IgG				
5,2 - 75,8	1,011 (0,975 - 1,047)	-0,499 (-2,170 - 1,171)	0,9987	97,3 - 105,7
4,8 - 93,9	1,006 (0,946 - 1,067)	1,161 (-2,217 - 4,538)	0,9963	90,9 - 102
1,2 - 169,8	1,034 (0,992 - 1,076)	0,9027 (-3,196 - 5,002)	0,9971	86,0 - 102,3

Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε από την ανάμειξη του ορού με επίπεδα αντισωμάτων γνωστής γλιαδίνης tTG με δυνητικά παρεμποδίζονται δείγματα ορού και μελετώντας την απόκλιση από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα για ομοιότυπα IgA και IgG παρουσιάζονται παρακάτω.


Κοιλιοκάκη G+ IgA

Δείγμα	EU/mL	Αιμοσφαιρίνη		Χολερυθρίνη		RF	
		EU/mL	% Int	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int
Αρνητικό	8,5	9,4	-9,9	11,6	-26,5	11,3	-26,5
Cutoff 1	25,2	23,7	6,3	23,5	7,5	26,2	7,5
Cutoff 2	21,7	21,5	0,9	21,4	1,4	23,2	1,4
Θετικό 1	107,5	103,9	3,5	112,2	-4,2	118,0	-4,2
Θετικό 2	126,5	122,2	3,5	138,4	-8,5	137,6	-8,5

Κοιλιοκάκη G+ IgG

	EU/mL	Αιμοσφαιρίνη		Χολερυθρίνη		RF	
		EU/mL	% Int	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int
Αρνητικό	5,0	4,7	5,5	4,6	8,4	5,9	-15,5
Cutoff 1	22,6	20,4	10,8	20,2	12,1	24,4	-7,5
Cutoff 2	18,0	19,5	-7,3	18,8	-4,0	22,4	-19,6
Θετικό 1	74,6	72,0	3,6	78,1	-4,4	82,2	-9,3
Θετικό 2	105,0	101,4	3,6	115,0	-8,7	114,4	-8,2

Αιμοσφαιρίνη: 2 g/L
Χολερυθρίνη: 342 μmol/L
RF: 100 EU/ml

2 x  flaconcini
1 x

Tampone di lavaggio in polvere. **Ricostituire a un litro ciascuno.**









Schede del protocollo

Componenti facoltativi

1 x 60ml 

Tampone di lavaggio concentrato liquido. Ricostituire a un litro.

Simboli utilizzati sulle etichette

-  Numero di lotto
-  Numero di catalogo
-  Uso diagnostico in vitro
-  Data di scadenza
-  Temperatura di conservazione
-  Leggere le istruzioni prima dell'uso
-  Numero di test
-  Produttore

Materiali necessari ma non inclusi

- Acqua deionizzata o distillata
- Flacone morbido per conservare il tampone di lavaggio diluito
- Pipette con capacità di erogazione da 5 μl a 1000 μl
- Puntali monouso per pipette
- Provette pulite 12 x 75 mm e rastrelliera per provette
- Contaminuti
- Fogli di carta assorbente
- Lettore per micropiastre capace di leggere i valori di assorbanza a 450 nm. Se è disponibile un lettore per micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm
- Lavatrice automatica per micropiastre capace di erogare 200 μl

PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare solo campioni di siero. I campioni che mostrano emolisi macroscopica, lipemia o contaminazione microbica possono interferire con le prestazioni del test e non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a 2-8 °C per una settimana al massimo. Per conservazioni più prolungate, congelare i campioni di siero. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni. Si raccomanda di analizzare i campioni congelati entro un anno.

PROCEDURA**Note sulla procedura**

- Prima di iniziare il dosaggio, leggere attentamente il foglio illustrativo del prodotto.

Per garantire la validità dei risultati, seguire le istruzioni esattamente come appaiono nel presente foglio illustrativo del kit. Non scambiare i componenti del kit con quelli di altre fonti. Seguire le buone pratiche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza segnata sulle etichette.

Materiali forniti

ELISA IgA Immulisa™ Celiac G+
ELISA IgG Immulisa™ Celiac G+

REF 5159A
REF 5159G

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 96 determinazioni.

12 x 8	MICROPLATE CG+	Micropiastra con micropozzetti separabili singolarmente. Rivestiti con peptidi gliadina deamidati. Pronto per l'uso.
1 x 1,75 ml	CONTROL+ CG+A	Pronto per l'uso Controllo positivo (<i>tappo rosso</i>) per REF 5159A. Contiene siero umano positivo per anticorpi IgA anti-gliadina. L'intervallo di concentrazione previsto in UE/ml è stampato sull'etichetta.
1 x 1,75 ml	CONTROL+ CG+G	Pronto per l'uso Controllo positivo (<i>tappo rosso</i>) per REF 5159G. Contiene siero umano positivo per anticorpi IgG anti-gliadina. L'intervallo di concentrazione previsto in UE/ml è stampato sull'etichetta.
1 x 1,75 ml	CONTROL-	Pronto per l'uso Controllo negativo (<i>tappo bianco</i>). Contiene siero umano.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A CG+A CALIBRATOR B CG+A CALIBRATOR C CG+A CALIBRATOR D CG+A CALIBRATOR E CG+A	Pronto per l'uso Serie di 5 calibratori per REF 5159A. Calibratore A (<i>tappo verde</i>) 320 UE/ml, Calibratore B (<i>tappo viola</i>) 160 UE/ml, Calibratore C (<i>tappo blu</i>) 80 UE/ml, Calibratore D (<i>tappo giallo</i>) 20 UE/ml, e Calibratore E (<i>tappo arancione</i>) 1 UE/ml. Derivato da siero umano contenente anticorpi IgA anti-gliadina. Le concentrazioni in UE/ml sono stampate sulle etichette.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A CG+G CALIBRATOR B CG+G CALIBRATOR C CG+G CALIBRATOR D CG+G CALIBRATOR E CG+G	Pronto per l'uso Serie di 5 calibratori per REF 5159G. Calibratore A (<i>tappo verde</i>) 160 UE/ml, Calibratore B (<i>tappo viola</i>) 80 UE/ml, Calibratore C (<i>tappo blu</i>) 40 UE/ml, Calibratore D (<i>tappo giallo</i>) 20 UE/ml, e Calibratore E (<i>tappo arancione</i>) 1 UE/ml. Derivato da siero umano contenente anticorpi IgG anti-gliadina. Le concentrazioni in UE/ml sono stampate sulle etichette.
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	Coniugato HRP di montone anti-IgA umane per REF 5159A. Pronto per l'uso. Colore codificato rosa.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Coniugato HRP di montone anti-IgG umane per REF 5159G. Pronto per l'uso. Colore codificato rosa.
1 x 60 ml	DIL	Diluyente per siero. Pronto per l'uso. Colore codificato porpora.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrato enzimatico TMB. Pronto per l'uso. Proteggere dalla luce.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Soluzione di arresto. Pronto per l'uso.



ImmLisa™ Celiaco G+

ELISA para anticuerpos péptidos de gliadina

IVD Para utilización de diagnóstico *in vitro*

ETIQUETA DEL PRODUCTO

REF 5159A	Celiaco G+ IgA ELISA	96 Determinaciones
REF 5159G	Celiaco G+ IgG ELISA	96 Determinaciones

UTILIZACIÓN PREVISTA

Inmunoensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos IgA o IgG frente a gliadina en suero humano para el diagnóstico de enfermedades celíacas (EC) junto con otras conclusiones clínicas y de laboratorio.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las enfermedades celíacas (EC) son afecciones gastrointestinales autoinmunes que pueden tener lugar en individuos genéticamente susceptibles inducidas por la ingestión de cereales que contienen gluten, como el trigo, la cebada y el centeno. Las EC se caracterizan por una mala absorción resultante de una inflamación de la mucosa del intestino delgado y, en caso de prolongarse, pueden causar desnutrición. Los síntomas clásicos de las EC incluyen diarrea, pérdida de peso y desnutrición. Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de los pacientes con EC presenta los síntomas clásicos.¹ En consecuencia, el espectro clínico de las EC ha crecido mucho más que en el pasado para incluir a otros pacientes que no presentan los síntomas clásicos. Es bastante común que los síntomas iniciales no sean gastrointestinales o que los síntomas gastrointestinales, en caso de presentarse, sean leves o intermitentes. La necesidad de examinar una variedad más amplia de presentaciones clínicas ha provocado que se diagnostique de EC a una mayor cantidad de individuos de edad avanzada que antes. La utilización de métodos serológicos para la detección de anticuerpos contra gliadina, endomisiales y transglutaminasa tisular ha permitido realizar estudios a gran escala de las EC tanto en Europa como en Estados Unidos. Estos estudios sugieren que las EC están mucho más extendidas de lo que se pensaba antiguamente. Estudios serológicos recientes demuestran una incidencia de las EC entre una de cada 100 personas y una de cada 500.^{2,3} La prevalencia de las EC es mucho mayor en los parientes de primer grado y segundo grado de pacientes con EC. Las EC se han relacionado con muchas afecciones autoinmunes como la diabetes de tipo 1, la autoinmunidad tiroidea y otras enfermedades autoinmunes.

Los análisis serológicos más comunes para detectar las EC son el método de inmunofluorescencia para detectar anticuerpos endomisiales (EMA) y los métodos ELISA para detectar anticuerpos de transglutaminasa tisular (tTG) y gliadina.⁴⁻⁸ Debido a la sensibilidad y especificidad limitada de los ensayos de anticuerpos de gliadina, este método ha sido sustituido en gran medida por métodos de EMA y tTG.

La limitación de los ensayos de EMA y tTG es que ambos inmunoensayos detectan los anticuerpos IgA, dificultando la identificación de pacientes deficientes en IgA con EC.⁹⁻¹¹ Los análisis de anticuerpos de gliadina IgG son importantes para el diagnóstico de las EC en pacientes con déficit de IgA.¹⁰ Los estudios demuestran que el 1-2% de la población general tiene déficit de IgA y que la incidencia de las EC en sujetos con déficit de IgA es bastante importante, de ahí la necesidad de análisis específicos. Además, algunos estudios cuestionan la especificidad de los ensayos de tTG y la sensibilidad de EMA.¹²⁻¹⁶ Los ensayos basados en péptidos de gliadina han arrojado unos resultados prometedores a la hora de atajar las limitaciones de los análisis actuales.¹⁷⁻²³ Este ensayo de nueva generación para la detección de los anticuerpos de gliadina, el Celiaco G+ ELISA, incorpora una tecnología patentada de péptidos de gliadina que ofrece sensibilidad y detección específica de anticuerpos de isotipos IgA o IgG con un alto grado de fiabilidad.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El análisis es realizado como un inmunoensayo de fase sólida. Los micropocillos son recubiertos con péptidos de gliadina deamidadada y a continuación se realiza una fase de bloqueo para reducir los vínculos de proteínas no específicos durante el ensayo. Se incuban en los pozos recubiertos con el antígeno controles, calibradores y el suero del paciente para que los anticuerpos específicos puedan presentarse en el suero para unirse al antígeno de gliadina. Los anticuerpos separados y otras proteínas del suero son eliminados lavando los micropocillos. Se detectan los anticuerpos unidos añadiendo a los micropocillos una enzima etiquetada conjugado anti-humano IgA o IgG. El conjugado no unido es eliminado lavándolo. A continuación se añade a los pocillos sustrato de enzima específica (TMB) y se detecta la presencia de anticuerpos gracias a un cambio de color producido por la conversión del sustrato de TMB en un producto de reacción de color. Se detiene la reacción y la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, es leída por un espectrofotómetro a 250 nm. Los resultados son expresados en unidades de ELISA por milímetro (EU/ml) y consignados como positivos o negativos.

REACTIVOS

Almacenamiento y preparación

Guarde todos los reactivos a entre 2 y 8°C. **No los congele.** Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si se los maneja y almacena de acuerdo con estas instrucciones.

No lo utilice si el reactivo no está limpio o si contiene un precipitado. Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (20-25°C) antes de su utilización.

Reconstituya el tampón de lavado hasta un litro con agua destilada o desionizada. Si lo guarda entre 2 y 8°C, el tampón de lavado reconstituido es estable hasta la fecha de caducidad del equipo.

Las tiras de micropocillos recubiertos son de un solo uso. Las tiras de micropocillos no utilizadas deberían ser recolocadas con cuidado en la bolsa con desecantes para evitar la condensación y ser almacenadas a 2-8°C.

popolazione generale è carente di IgA e che l'incidenza della CD nei soggetti con carenza di IgA è significativa; da qui la necessità di test specifici. Inoltre, alcuni studi mettono in dubbio la specificità dei dosaggi tTG e la sensibilità dei dosaggi EMA.¹²⁻¹⁶ I dosaggi basati sul peptide gliadina hanno mostrato risultati promettenti nell'affrontare i limiti dei dosaggi attuali.¹⁷⁻²³ Questo dosaggio di nuova generazione per il rilevamento degli anticorpi anti-gliadina, cioè l'ELISA Celiac G+, include una tecnologia del peptide gliadina proprietaria che fornisce un rilevamento sensibile e specifico degli anticorpi isotipo IgA o IgG con un livello elevato di affidabilità.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il test viene eseguito come dosaggio immunoenzimatico in fase solida. I micropozzetti sono rivestiti con peptidi gliadina deamidati, cui segue un passaggio bloccante per ridurre il legame proteico non specifico durante l'esecuzione del dosaggio. Controlli, calibratori e sieri del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti con l'antigene per consentire agli anticorpi specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene gliadina. Gli anticorpi non legati e le altre proteine seriche vengono rimossi tramite lavaggio dei micropozzetti. Gli anticorpi legati sono rilevati aggiungendo ai pozzetti un coniugato anti-IgA o anti-IgG umano marcato con enzima. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Si aggiunge quindi ai pozzetti un substrato enzimatico specifico (TMB) e la presenza degli anticorpi viene rilevata tramite una variazione cromatica prodotta dalla conversione del substrato TMB in un prodotto di reazione colorato. La reazione viene arrestata e l'intensità della variazione cromatica, che è proporzionale alla concentrazione anticorpale, viene letta con uno spettrofotometro a 450 nm. I risultati sono espressi in unità ELISA per millimetro (UE/ml) e riportati come positivi o negativi.

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. **Non congelare.** I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza, quando conservati e maneggiati secondo le indicazioni.

Non utilizzare se il reagente non è limpido o in presenza di un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'uso.

Ricostituire il tampone di lavaggio a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Quando conservato a 2-8 °C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Le strisce di micropozzetti rivestiti sono monouso. Le strisce di micropozzetti non utilizzate devono essere risigillate accuratamente in buste contenenti essiccanti per impedire la formazione di condensa e conservati a 2-8 °C.

Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi in base ai test richiesti dalla FDA. Gli emoderivati umani e i campioni dei pazienti devono essere tuttavia considerati potenzialmente infettivi. Seguire le buone pratiche di laboratorio durante la conservazione, la distribuzione e lo smaltimento di questi materiali.²⁴



ImmuLisa™ Celiac G+

ELISA anticorpi anti-peptide gliadina

IVD Per uso diagnostico *in vitro*

Foglio illustrativo del prodotto

REF	5159A	ELISA IgA Celiac G+	96 determinazioni
REF	5159G	ELISA IgG Celiac G+	96 determinazioni

USO PREVISTO

Dosaggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il rilevamento qualitativo e semiquantitativo degli anticorpi IgA o IgG anti-gliadina nel siero umano per facilitare la diagnosi della malattia celiaca, in combinazione con altri riscontri clinici e di laboratorio.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

La malattia celiaca (CD) è un disturbo gastrointestinale autoimmune che può colpire soggetti geneticamente sensibili ed è scatenato dall'ingestione di cereali contenenti glutine, come ad esempio grano, orzo e segale. La CD è caratterizzata dal malassorbimento che deriva da lesioni infiammatorie a carico della mucosa intestinale e può causare malnutrizione, quando prolungato. I sintomi classici della CD includono diarrea, perdita di peso e malnutrizione. Solo una piccola percentuale di pazienti con CD presenta tuttavia i sintomi classici.¹ Lo spettro clinico della CD si è quindi notevolmente ampliato rispetto al passato, includendo pazienti che non presentano i sintomi classici. È abbastanza comune che i sintomi iniziali non siano gastrointestinali o se lo sono siano lievi o intermittenti. La necessità di esaminare una gamma più ampia di presentazioni cliniche ha fatto aumentare sempre più il numero di soggetti con diagnosi di CD in età più avanzata. L'avvento dei metodi sierologici per il rilevamento degli anticorpi anti-gliadina, anti-endomisio e anti-transglutaminasi tissutale ha permesso l'esecuzione di studi di screening su grande scala per la CD, sia in Europa, sia negli Stati Uniti. Questi studi suggeriscono che la CD abbia una prevalenza maggiore di quanto ritenuto in precedenza. Studi sierologici recenti dimostrano un'incidenza della CD compresa fra uno su 100 e uno su 500.^{2,3} La prevalenza della CD è molto maggiore nei parenti di primo e secondo grado dei pazienti affetti da CD. La CD è stata associata con molti altri disturbi autoimmuni come ad esempio il diabete di tipo 1, la tiroidite autoimmune e altri.

I test sierologici più comuni per lo screening della CD sono il metodo di immunofluorescenza per il rilevamento degli anticorpi anti-endomisio (EMA) e i metodi ELISA per il rilevamento degli anticorpi anti-transglutaminasi tissutale (tTG) e anti-gliadina.⁴⁻⁸ Date la sensibilità e specificità limitate del dosaggio degli anticorpi anti-gliadina, questo metodo è stato ampiamente sostituito da EMA e tTG.

I limiti dei dosaggi immunoenzimatici EMA e tTG sono che entrambi rilevano gli anticorpi IgA, ritardando l'identificazione dei pazienti con carenza di IgA affetti da CD.⁹⁻¹¹ I test per gli anticorpi IgG anti-gliadina sono importanti per la diagnosi di CD nei pazienti con carenza di IgA.¹⁰ Gli studi mostrano che l'1-2% della

Precauciones

Todos los componentes provenientes de seres humanos utilizados han sido analizados en busca de HBsAg, HCV, HIV-1 y 2 y HTLV-I y han dado negativo de acuerdo con los exámenes necesarios de la FDA. Sin embargo, los derivados de sangre humana y las muestras de pacientes deberían considerarse potencialmente infecciosas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio a la hora de guardar, preparar y desechar estos materiales.²⁴

Deben seguirse las instrucciones exactamente tal como aparecen aquí para garantizar unos resultados válidos. No cambie los componentes del equipo por otros de fuentes externas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio para minimizar la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos a la hora de manejarlos. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas.

Materiales proporcionados

Celiaco G+ IgA ELISA ImmuLisa™	REF 5159A
Celiaco G+ IgG ELISA ImmuLisa™	REF 5159G

El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 96 determinaciones.

12 x 8	MICROPLATE CG+	Microplaca con micropocillos individuales escindibles. Recubierta con péptidos de gliadina deamidadada. Listo para su utilización.
1 x 1,75 ml	CONTROL + CG+A	Control Positivo listo para su utilización (<i>tapón rojo</i>) para REF 5159A. Contiene suero humano positivo en anticuerpos de gliadina IgA. El registro de concentración esperado en EU/ml está impreso en la etiqueta.
1 x 1,75 ml	CONTROL + CG+G	Control Positivo listo para su utilización (<i>tapón rojo</i>) para REF 5159G. Contiene suero humano positivo en anticuerpos de gliadina IgG. El registro de concentración esperado en EU/ml está impreso en la etiqueta.
1 x 1,75 ml	CONTROL -	Control Negativo listo para su utilización (<i>tapón blanco</i>). Contiene suero humano.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A CG+A CALIBRATOR B CG+A CALIBRATOR C CG+A CALIBRATOR D CG+A CALIBRATOR E CG+A	Juego de 5 calibradores listos para su utilización para REF 5159A. Calibrador A (<i>tapón verde</i>) 320 EU/ml, Calibrador B (<i>tapón violeta</i>) 160 EU/ml, Calibrador C (<i>tapón azul</i>) 80 EU/ml, Calibrador D (<i>tapón amarillo</i>) 20 EU/ml, y Calibrador E (<i>tapón naranja</i>) 1 EU/ml. Provenientes de suero humano con anticuerpos de gliadina IgA. Las concentraciones en EU/ml están impresas en las etiquetas.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A CG+G CALIBRATOR B CG+G CALIBRATOR C CG+G CALIBRATOR D CG+G CALIBRATOR E CG+G	Juego de 5 calibradores listos para su utilización para REF 5159G. Calibrador A (<i>tapón verde</i>) 160 EU/ml, Calibrador B (<i>tapón violeta</i>) 80 EU/ml, Calibrador C (<i>tapón azul</i>) 40 EU/ml, Calibrador D (<i>tapón amarillo</i>) 20 EU/ml, y Calibrador E (<i>tapón naranja</i>) 1 EU/ml. Provenientes de suero humano con anticuerpos de gliadina IgG. Las concentraciones en EU/ml están impresas en las etiquetas.

1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	Conjugado HRP antihumano IgA para REF 5159A. Listo para su utilización. De color rosa.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Conjugado HRP antihumano IgG para REF 5159G. Listo para su utilización. De color rosa.
1 x 60 ml	DIL	Diluyente de suero. Listo para su utilización. De color morado.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Solución de parada. Lista para su utilización.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Solución de parada. Lista para su utilización.
2 x viales	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir a un litro cada uno.
1 x		Hojas de protocolo

Componentes opcionales

1 x 60ml	BUF WASH	Tampón de lavado líquido concentrado. Reconstituir a un litro.
----------	----------	--

Símbolos utilizados en las etiquetas

	Número de lote
	Número de catálogo
	Utilización diagnóstica in vitro
	Utilizar antes de
	Temperatura de almacenamiento
	Leer las instrucciones antes de utilizar
	Número de análisis
	Fabricante

Materiales necesarios pero no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella de plástico blando para el tampón de lavado diluido
- Pipetas capaces de suministrar de 5 µl a 1000 µl
- Extremos de pipeta desechables
- Tubos de ensayo limpios de 12 x 75 mm y rejilla para tubos de ensayo
- Temporizador
- Toallitas de papel absorbentes
- Lector de microplaca capaz de leer valores de absorbencia a 450 nm. Si está disponible el lector de microplaca de longitud de onda dual, el filtro de referencia debería fijarse a 600-650 nm
- Lavador de microplaca automático capaz de suministrar 200 µl

RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECIMENES

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. Guarde los especímenes entre 2° y 8°C durante un máximo de una semana.

Gamme de test (EU/ml)	Pente (95 % d'IC)	Segment sur l'axe y (95 % D'IC)	R²	% de récupération (obtenue / attendu)
IgA				
7,2 - 70,3	0,971 (0,907 - 1,035)	0,468 (-2,415 - 3,349)	0,9958	97,3 - 106,9
4,4 - 136	0,987 (0,942 - 1,033)	2,203 (-1,518 - 5,924)	0,9979	88,9 - 103,3
1,1 - 309,6	0,993 (0,909 - 1,076)	-4,609 (-18,092 - 11,808)	0,9946	94,4 - 114,8
IgG				
5,2 - 75,8	1,011 (0,975 - 1,047)	-0,499 (-2,170 - 1,171)	0,9987	97,3 - 105,7
4,8 - 93,9	1,006 (0,946 - 1,067)	1,161 (-2,217 - 4,538)	0,9963	90,9 - 102
1,2 - 169,8	1,034 (0,992 - 1,076)	0,9027 (-3,196 - 5,002)	0,9971	86,0 - 102,3

Interférence

L'interférence a été étudiée en mélangeant des sérums sanguins avec des niveaux d'anticorps anti-gliadine connus avec des échantillons de sérum interférants potentiellement et en étudiant la déviation par rapport aux résultats attendus. Les résultats pour les isotypes IgA et IgG apparaissent ci-dessous :

Cœliaque G+ IgA

Échantillon	Hémoglobine			Bilirubine		FR	
	EU/ml	EU/ml	% d'int.	EU/ml	% d'int.	EU/ml	% d'int.
Négatif	8,5	9,4	-9,9	11,6	-26,5	11,3	-26,5
Coupure 1	25,2	23,7	6,3	23,5	7,5	26,2	7,5
Coupure 2	21,7	21,5	0,9	21,4	1,4	23,2	1,4
Positif 1	107,5	103,9	3,5	112,2	-4,2	118,0	-4,2
Positif 2	126,5	122,2	3,5	138,4	-8,5	137,6	-8,5

Cœliaque G+ IgG

	Hémoglobine			Bilirubine		FR	
	EU/ml	EU/ml	% d'int.	EU/ml	% d'int.	EU/ml	% d'int.
Négatif	5,0	4,7	5,5	4,6	8,4	5,9	-15,5
Coupure 1	22,6	20,4	10,8	20,2	12,1	24,4	-7,5
Coupure 2	18,0	19,5	-7,3	18,8	-4,0	22,4	-19,6
Positif 1	74,6	72,0	3,6	78,1	-4,4	82,2	-9,3
Positif 2	105,0	101,4	3,6	115,0	-8,7	114,4	-8,2

Hémoglobine: 2 g/l
Bilirubine: 342 µmol/L
FR: 100 EU/ml

- * Anticorps antinucléaires
- ** Anticorps antipeptides cycliques citrullinés
- *** Anticorps de facteur rhumatoïde

Précision

La précision a été testée avec de multiples spécimens sélectionnés à travers la gamme de tests. Trois tests ont été effectués à différents jours pour déterminer les résultats entre les jours. Un test supplémentaire de six dupliqués a été effectué pour déterminer la répétabilité. Les résultats sont résumés ci-dessous :

Kit	N° S	Moyenne (EU/ml)	Imprécision totale		Entre les jours		Au sein du test (répétabilité)	
			Écart-type (EU/ml)	% de val. cor.	Écart-type (EU/ml)	% de val. cor.	Écart-type (EU/ml)	% de val. cor.
Analyse cœliaque G+ IgA	1	15,38	1,713	11,1 %	2,474	16,2 %	0,572	3,7 %
	2	22,09	1,649	7,5 %	2,011	9,1 %	1,392	6,3 %
	3	27,23	1,792	6,6 %	1,932	7,1 %	1,807	6,7 %
	4	37,08	2,565	6,9 %	3,043	8,2 %	2,277	6,2 %
	5	79,94	6,027	7,5 %	8,438	10,7 %	2,686	3,3 %
	6	180,68	5,734	3,2 %	7,852	4,3 %	3,205	1,8 %
	7	186,77	7,926	4,2 %	10,837	5,9 %	3,872	2,1 %
	8	341,97	9,786	2,9 %	10,389	3,0 %	10,137	3,0 %
Analyse cœliaque G+ IgG	1	13,97	0,827	5,9 %	0,884	6,4 %	0,757	5,3 %
	2	23,10	1,274	5,5 %	0,327	1,4 %	1,821	7,8 %
	3	33,81	2,071	6,1 %	2,552	7,6 %	1,696	5,0 %
	4	91,83	3,472	3,8 %	4,504	5,0 %	1,723	1,9 %
	5	116,49	4,360	3,7 %	5,813	5,1 %	1,349	1,1 %
	6	120,44	3,008	2,5 %	2,713	2,3 %	2,770	2,3 %
	7	179,74	4,661	2,6 %	5,461	3,1 %	3,998	2,2 %

Limite de détection

La limite de détection (LdD) a été déterminée sur la base de 60 mesures de l'échantillon vierge et 10 mesures chacun de 6 échantillons de bas niveau (NHS). La LdD pour IgA était de 8,9 EU/ml. La LdD pour IgG était de 2,2 EU/ml.

Linéarité et récupération

La linéarité et la récupération ont été testées en diluant les spécimens positifs à travers l'ensemble de l'analyse dans des solutions équidistantes et en comparant les résultats actuels aux résultats attendus. La gamme linéaire des analyses a été déterminée être de 8,9 (LdD) – 320 EU/ml pour IgA et 2,2 (LdD) – 160 EU/ml pour IgG. Les résultats sont résumés ci-dessous :

Para periodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente. Es recomendable que los especímenes congelados sean analizados al cabo de un año.

PROCEDIMIENTO

Notas del procedimiento

- Lea detenidamente la etiqueta del producto antes de empezar el ensayo.
- Todas las diluciones de las muestras del paciente deberían prepararse antes de empezar con el ensayo.
- Deje que los especímenes del paciente y los reactivos de los análisis se adapten a la temperatura ambiente antes de empezar con el procedimiento de análisis. Le sugerimos que deje los reactivos sobre la mesa de trabajo y fuera de la caja unos 30 minutos antes de su utilización. Vuelva a meter todos los especímenes y reactivos no utilizados en la nevera después de su utilización.
- Saque las tiras de micropocillos necesarias de la bolsa y vuelva a cerrarla cuidadosamente para evitar la condensación de los pocillos no utilizados. Vuelva a meter la bolsa a la nevera inmediatamente.
- **Una buena técnica de lavado es fundamental.** Si el lavado va a ser realizado a mano, aplique una corriente fuerte de tampón de lavado con una botella de lavado de boca ancha por toda la microplaca. **Se recomienda utilizar un lavador de microplacas automático.**
- Utilice una pipeta multicanal capaz de proveer a 8 a 12 pozos simultáneamente. Esto acelera el proceso y proporciona tiempos de incubación más uniformes.
- En todos los pasos es necesario controlar cuidadosamente el tiempo. El inicio de todos los periodos de incubación empieza al terminar de añadir el reactivo.
- Todas las muestras y reactivos deberían ser añadidos a la misma velocidad y en el mismo orden.

Método de análisis

- Paso 1** Deje que los reactivos y especímenes se adapten a la temperatura ambiente.
- Paso 2** Etiquete la hoja de protocolo para indicar que se han colocado muestras en los micropocillos. Una buena práctica de laboratorio es analizar las muestras por duplicado.
- Paso 3** Para una **determinación cualitativa** utilice únicamente el Calibrador D (*vial con tapón amarillo*).
- o Para una **determinación semi-cuantitativa** utilice los Calibradores A a E tal como aparece en el plan de muestras siguiente.

Cualitativo			
A	Base	S5	Etc.
B	-	S6	
C	+	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

Semi-cuantitativo			
A	Base	S1	Etc.
B	-	S2	
C	+	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

- Paso 4** Prepare una dilución **1:101** de las mezclas del paciente mezclando **5 µl** del suero del paciente con **500µl** de Diluyente de Suero.
- Paso 5** Saque los micropocillos necesarios de la bolsa y vuelva a meter en la nevera las tiras no utilizadas dentro de la bolsa cerrada. Coloque los micropocillos en la funda adicional proporcionada.
- Paso 6** Vierta **100 µl** de Calibradores listos para usar, controles positivos y negativos y muestras del paciente diluidas (**1:101**) en los micropocillos adecuados en base a la hoja de protocolo.
- Nota:** Incluya un pocillo con **100 µl** del Diluyente de Suero como reactivo base. Ajuste el medidor ELISA en función del reactivo base.
- Paso 7** Incúbelo **30 minutos** (\pm 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** Lávelo **4x** con tampón de lavado. Para un lavado manual, llene cada micropocillo con tampón de lavado reconstituido. Deseche el fluido volcando y vertiendo el contenido de cada pocillo o aspirando el líquido de cada pocillo. Para secar el final del último lavado, vuelque las tiras y golpee los pocillos con fuerza con toallitas de papel absorbentes. Para lavadores automáticos, programe el lavador siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Paso 9** Vierta **100 µl** de Conjugado en los micropocillos.
- Paso 10** Incúbelo **30 minutos** (\pm 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave todos los micropocillos siguiendo las instrucciones del Paso 8.
- Paso 12** Vierta **100 µl** de Sustrato de Enzimas en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Conjugado.
- Paso 13** Incúbelo **30 minutos** (\pm 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Vierta **100 µl** de Solución de Parada en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Sustrato de Enzimas. Lea los valores de absorbencia a los **30 minutos** de añadir la Solución de Parada.
- Paso 15** Lea la absorbencia de cada micropocillo a **450 nm** si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda simple o a **450/630nm** si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda dual con el reactivo base fijado a absorbencia cero.

Autre gliadine IgG ELISA

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	88	9	97
CÆLIAQUE G+	Négatif	7	109	116
IgG ELISA	Total	95	118	213

Accord de pourcentage positif : 92,6% (95% IC 84,9% - 96,7%)

Accord de pourcentage négatif : 92,4% (95% IC 85,6% - 96,2%)

Accord de pourcentage global : 92,5% (95% IC 87,9% - 95,5%)

B. Cœliaque G+ vs. EMA : Les résultats obtenus avec les cœliaques G+ ELISA ont été comparés aux titres anticorps anti-endomysium (EMA) obtenus en utilisant des kits IFA disponibles dans le commerce et une population clinique bien caractérisée. Seuls les spécimens dans la gamme linéaire de l'analyse ont été inclus dans la méthode de comparaison. Ces résultats sont résumés ci-dessous.

population atteinte de CD confirmée par EMA

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	78	5	83
CÆLIAQUE G+	Négatif	18	55	73
IgA ELISA	Total	96	60	156

Sensibilité estimée : 81,3% (95% IC 71,7% - 88,2%)

Spécificité estimée : 91,7% (95% IC 80,9% - 96,9%)

Accord : 85,3% (95% IC 78,5% - 90,2%)

Sujets atteints de CD avec EMA positive: 96

Résolutions de maladie : 7

Sujets normaux en bonne santé : 53

population atteinte de CD confirmée par EMA

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	94	3	97
CÆLIAQUE G+	Négatif	11	105	116
IgG ELISA	Total	105	108	213

Sensibilité estimée : 89,5% (95% IC 81,6% - 94,4%)

Spécificité estimée : 97,2% (95% IC 91,5% - 99,3%)

Accord : 93,4% (95% IC 89,0% - 96,2%)

Sujets atteints de CD avec EMA positive: 105

Résolutions de maladie : 20

Sujets normaux en bonne santé : 88

C. Réactivité croisée : Un total de 50 spécimens à réaction potentiellement croisée d'individus avec d'autres troubles auto-immunitaires ou positifs à d'autres auto-anticorps ont été testés pour les anticorps anti-gliadine en utilisant le système Immulisa™ cœliaque G+.

Condition	n	IgA Positif n (%)	IgG Positif n (%)
Maladie de Graves	11	0 (0 %)	0 (0 %)
Thyroïdite de Hashimoto	11	1 (9 %)	0 (0 %)
Positif aux ANA*	9	0 (0 %)	0 (0 %)
Positif aux AAC**	10	0 (0 %)	2 (20 %)
Positif au FR***	9	1 (11 %)	0 (0 %)
Total	50	2 (4 %)	2 (4 %)

Valeur absolue de l'anti-gliadine	Interprétation
<20 EU/ml	Négative
de 20 à 25 EU/ml	Indéterminée (limite)
>25 EU/ml	Positive

Calibreur

Les calibreurs prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et ils doivent être utilisés avec chaque test. Les échantillons de patients contenant de hauts niveaux d'anticorps peuvent avoir des valeurs supérieures à celles du calibreur A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, de tels spécimens doivent être encore plus dilués pour qu'ils tombent dans la gamme de la courbe du calibreur lors du nouveau test. Pour déterminer les valeurs EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Les spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou contaminés par des microbactéries peuvent interférer avec l'exécution du test et ils ne doivent pas être utilisés. Stocker les spécimens entre 2 ° et 8 °C pendant une semaine maximum. Pour un stockage à plus long terme, les spécimens de sérum doivent être congelés. Éviter la congélation et la décongélation des échantillons.

VALEURS ATTENDUES

Il est attendu que les résultats des tests dans une population normale soient négatifs. Toutefois, comme l'incidence de la CD dans la population normale est d'environ 1 %, certains individus asymptomatiques apparemment sains peuvent tester positif à l'ELISA cœliaque G+.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

L'utilité de l'ImmuLisa™ cœliaque G+ ELISA pour la détection des anticorps anti-gliadine a été évaluée en testant des spécimens de sérums à EMA positifs bien caractérisés de sujets suspectés de souffrir de CD avec des sérums de résolutions de maladie et d'humains « normaux ». Ces spécimens ont aussi été testés sur des kits de test disponibles dans le commerce. Seuls les spécimens dans la gamme linéaire de l'analyse ont été inclus dans la méthode de comparaison. Ces résultats sont résumés ci-dessous.

A. Cœliaque G+ vs. d'autres kits d'anticorps anti-peptides de la gliadine :

		Autre gliadine IgA ELISA		
		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	54	27	81
CŒLIAQUE G+	Négatif	7	68	75
IgA ELISA	Total	61	95	156

Accord de pourcentage positif : 88,5% (95% IC 77,2% - 94,9%)

Accord de pourcentage négatif : 71,6% (95% IC 61,3% - 80,1%)

Accord de pourcentage global : 78,2% (95% IC 70,8% - 84,3%)

Control de calidad

Los Calibradores, los Controles Positivo y Negativo y el reactivo base deben comprobarse en cada ensayo para verificar la integridad y la precisión del análisis. La medición de absorbencia del reactivo base debería ser <0,3. El Calibrador A debería tener una lectura de absorbencia de no menos de 1,0, de lo contrario la prueba debe repetirse. El control negativo debe ser <5 EU/ml. Si se realiza la prueba por duplicado, debería tomarse la media de ambas lecturas para determinar la lectura en EU/ml. Al realizar determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser mayor que la del control negativo y menor que la absorbencia del control positivo. Para las determinaciones semicuantitativas el control positivo debe arrojar valores dentro del registro estipulado en el vial.

RESULTADOS

Cálculos

Las concentraciones de las muestras del paciente pueden ser determinadas utilizando dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. muestra de análisis

----- X EU/ml de Calibrador D = EU/ml Muestra Análisis

Abs. de Calibrador D

Es recomendable indicar si los resultados cualitativos son "positivos" o "negativos". Los resultados de los análisis iguales o superiores al Calibrador D son considerados positivos.

2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTITATIVA

Determine la absorbencia de los Calibradores A a E en base a sus concentraciones respectivas sobre papel para gráficos lineales logarítmicos. Determine las concentraciones en EU/ml en el eje X y la absorbencia en el eje Y y dibuje una curva de punto a punto. Determine las concentraciones de las muestras del paciente desde la curva de acuerdo con los valores de absorbencia correspondientes. Como alternativa, puede utilizar una curva de cuatro parámetros para trazar la curva estándar.

Es recomendable indicar si los resultados semi-cuantitativos son "positivos", "negativos" o "indeterminados" con valores en unidades EU/ml. Los resultados indeterminados/en el límite deberían ser reanalizados y evaluados junto con otros métodos de laboratorio

Interpretación

La información siguiente sirve únicamente como guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Estos valores fueron determinados analizando 64 muestras de suero humano normal y 50 muestras sin enfermedades celiacas. Los valores que aparecen a continuación son la media de los sujetos normales más 2SD. Cada laboratorio debe determinar sus propios valores normales.

Valor anti-Gliadina Ab	Interpretación
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminado (Límite)
>25 EU/ml	Positivo

Calibrador

Los calibradores listos para utilizar vienen incluidos para proporcionar una determinación semi-cuantitativa y deben ser utilizados en cada análisis. Las muestras de pacientes que contienen niveles altos de anticuerpos pueden arrojar unos valores de absorbencia superiores que los del Calibrador A. Para determinar unos valores semi-cuantitativos precisos, esos especímenes deberían diluirse más para que entren en el registro de la curva del calibrador al volver a analizarlos. Para determinar los valores en EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. Guarde los especímenes entre 2°C y 8°C durante un máximo de una semana. Para periodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente.

VALORES ESPERADOS

Normalmente se espera que los resultados de los análisis en la población normal sean negativos. Sin embargo, como la incidencia de las EC en la población normal es aproximadamente del 1%, algunos individuos aparentemente saludables y asintomáticos podrían dar positivo en la prueba Celiaco G+ ELISA.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La utilidad de las pruebas ELISA Immulisa™ Celiaco G+ para detección de anticuerpos de gliadina fue evaluada analizando especímenes de suero positivos característicos EMA de sujetos sospechosos de sufrir EC junto con controles de enfermedades y sueros humanos "normales". Estos especímenes también fueron analizados con equipos de análisis de disponibles comercialmente. Sólo se incluyeron en la comparación los especímenes del registro lineal del ensayo. Los resultados se resumen a continuación.

A. Celiaco G+ vs. otros equipos de Anticuerpos Péptidos de Gliadina:

		Otros Gliadina IgA ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	54	27	81
CELIACO G+	Negativo	7	68	75
IgA ELISA	Total	61	95	156
Concordancia de porcentaje positivo:		88,5% (95% CI 77,2% - 94,9%)		
Concordancia de porcentaje negativo:		71,6% (95% CI 61,3% - 80,1%)		
Concordancia de porcentaje total:		78,2% (95% CI 70,8% - 84,3%)		

Contrôle de la qualité

Les calibres, les résolutions positives et négatives et un réactif vierge doivent être utilisés pour chaque analyse afin de vérifier l'intégrité et la précision du test. Le résultat d'absorbance du réactif vierge doit être <0,3. Le calibre A ne doit pas avoir un résultat d'absorbance inférieur à 1,0, sinon le test doit être répété. La résolution négative doit être < 5 EU/ml. Si le test est effectué en dupliqué, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer EU/ml. Lors de la performance des déterminations qualitatives, la densité optique du calibre D doit être supérieure à celle de la résolution négative et inférieure à celle de l'absorbance de la résolution positive. Pour les déterminations semi-quantitatives, la résolution positive doit donner des valeurs dans la gamme figurant sur la fiole.

RÉSULTATS

Calculs

Les concentrations des échantillons du patient peuvent être déterminées par n'importe laquelle des deux méthodes suivantes :

1. DETERMINATION QUALITATIVE

Abs. d'échantillon témoin

$$\text{-----} \times \text{EU/ml de calibre D} = \text{EU/ml échantillon témoin}$$

Abs. de calibre D

Il est recommandé que les résultats qualitatifs soient signalés comme « positif » ou « négatif ». Les résultats d'échantillon supérieurs ou égaux au calibre D sont considérés comme positifs.

2. DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Tracer l'absorbance des calibres de A à E en fonction de leur concentration respective sur papier millimétré linéaire. Tracer les concentrations en EU/ml sur l'axe des abscisses et l'absorbance sur l'axe des ordonnées et dessiner une courbe point à point. Déterminer les concentrations des échantillons du patient à partir de la courbe suivant les valeurs d'absorbance correspondantes. Comme alternative, une courbe à quatre paramètres peut être utilisée pour tracer une courbe standard.

Il est recommandé que les résultats semi-quantitatifs soient signalés comme « positif », « négatif » ou « indéterminé » avec les valeurs unitaires EU/ml. Les résultats indéterminés ou limite doivent être testés de nouveau et évalués selon d'autres méthodes de laboratoire.

Interprétation

Ce qui suit ne sert que de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire. Ces valeurs ont été déterminées en testant 64 sérums sanguins humains normaux et 50 résolutions non atteintes de la maladie cœliaque. Les valeurs décrites ci-dessous sont la moyenne des sujets normaux plus 2 écarts-type. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Qualitative				Semi-qualitative			
A	Vierge	S5	Etc.	A	Vierge	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	Contrôle	S7		C	Contrôle	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal D	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- Étape 4** Préparer une dilution à **1 : 101** des échantillons du patient en mélangeant **5 µl** du sérum sanguin du patient à **500 µl** de diluant pour sérum.
- Étape 5** Retirer les micropuits nécessaires du sachet et remettre les bandes non utilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer de manière sécurisée les micropuits dans le support supplémentaire fourni.
- Étape 6** Pipette de **100 µl** des calibres, des régulations positives et négatives prêtes à utiliser et des échantillons patients dilués (**1 : 101**) dans les micropuits appropriés suivant la feuille de protocole.
Remarque : Inclure un puits contenant **100 µl** de diluant pour sérum comme réactif vierge. Mettre l'ELISA à zéro par rapport à ce réactif vierge.
- Étape 7** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 8** Laver **4 fois** avec le tampon de lavage. Pour un lavage manuel, remplir chaque micropuits avec le tampon de lavage reconstitué. Vider le fluide en renversant et en tapotant chaque puits pour en faire sortir le liquide ou en aspirant chaque puits. Pour sécher à la fin du dernier lavage, renverser les bandes sur des serviettes en papier absorbantes et taper vigoureusement sur les puits. Pour les laveurs automatiques, programmer le laveur suivant les instructions du fabricant.
- Étape 9** Pipette de **100 µl** de conjugué dans les micropuits.
- Étape 10** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 11** Laver tous les micropuits comme à l'étape 8.
- Étape 12** Pipette de **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque micropuits dans le même ordre et la même chronométrie que pour le conjugué.
- Étape 13** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 14** Pipette de **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque micropuits en utilisant le même ordre et la même chronométrie que pour le substrat d'enzymes. Lire les valeurs d'absorbance dans les **30 minutes** de l'addition de la solution d'arrêt.
- Étape 15** Lire l'absorbance de chaque micropuits à **450 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à longueur d'onde simple ou à 450 / 630 nm avec un lecteur de microplaques à longueur d'onde double par rapport au réactif vierge définissant le zéro d'absorbance.

Otros Gliadina IgG ELISA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	88	9	97
CELIACO G+	Negativo	7	109	116
IgG ELISA	Total	95	118	213

Concordancia de porcentaje positivo: 92,6% (95% CI 84,9% - 96,7%)

Concordancia de porcentaje negativo: 92,4% (95% CI 85,6% - 96,2%)

Concordancia de porcentaje total: 92,5% (95% CI 87,9% - 95,5%)

B. Celiaco G+ vs. EMA: Los resultados obtenidos con las ELISA Celiaco G+ fueron comparados con los resultados de anticuerpos endomisiales (EMA) obtenidos utilizando un equipo IFA disponible comercialmente y una población clínica bien caracterizada. Sólo se incluyeron en la comparación los especímenes del registro lineal del ensayo. Los resultados se resumen a continuación.

Población con EC confirmada por EMA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	78	5	83
CELIACO G+	Negativo	18	55	73
IgA ELISA	Total	96	60	156

Sensibilidad estimada: 81,3% (95% CI 71,7% - 88,2%)

Especificidad estimada: 91,7% (95% CI 80,9% - 96,9%)

Concordancia: 85,3% (95% CI 78,5% - 90,2%)

Sujetos celíacos positivos en EMA: 96

Controles de enfermedades: 7

Sujetos normales sanos: 53

Población con EC confirmada por EMA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	94	3	97
CELIACO G+	Negativo	11	105	116
IgG ELISA	Total	105	108	213

Sensibilidad estimada: 89,5% (95% CI 81,6% - 94,4%)

Especificidad estimada: 97,2% (95% CI 91,5% - 99,3%)

Concordancia: 93,4% (95% CI 89,0% - 96,2%)

Sujetos celíacos positivos en EMA: 105

Controles de enfermedades: 20

Sujetos normales sanos: 88

C. Reactividad cruzada: Un total de 50 especímenes potencialmente reactivos cruzados de individuos con otras afecciones autoinmunes o que dieron positivo en otros autoanticuerpos fueron analizados en anticuerpos de Gliadina utilizando el sistema Immulisa™ Celiaco G+.

Enfermedad	n	IgA Positivo n (%)	IgG Positivo n (%)
Enfermedad de Graves	11	0 (0%)	0 (0%)
Tiroiditis de Hashimoto	11	1 (9%)	0 (0%)
Positivo en ANA*	9	0 (0%)	0 (0%)
Positivo en CCP**	10	0 (0%)	2 (20%)
Positivo en RF**	9	1 (11%)	0 (0%)
Total	50	2 (4%)	2 (4%)

- * Anticuerpos Antinucleares
- ** Anticuerpos Anti-Péptidos Cíclicos Citrulinados
- *** Anticuerpos Factor Reumatoide

Precisión

La precisión fue analizada con múltiples especímenes seleccionados en todo el registro del ensayo. Se realizaron tres ensayos en días distintos para determinar los resultados entre días. Se realizó otra serie adicional de seis duplicados para determinar la repetibilidad. Los resultados se resumen a continuación.

Equipo	N.º S	Media (EU/ml)	Imprecisión total		Entre días		Dentro de serie (Repetibilidad)	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	
Ensayo Celiaco G+ IgA	1	15,38	1,713	11,1%	2,474	16,2%	0,572	3,7%
	2	22,09	1,649	7,5%	2,011	9,1%	1,392	6,3%
	3	27,23	1,792	6,6%	1,932	7,1%	1,807	6,7%
	4	37,08	2,565	6,9%	3,043	8,2%	2,277	6,2%
	5	79,94	6,027	7,5%	8,438	10,7%	2,686	3,3%
	6	180,68	5,734	3,2%	7,852	4,3%	3,205	1,8%
	7	186,77	7,926	4,2%	10,837	5,9%	3,872	2,1%
	8	341,97	9,786	2,9%	10,389	3,0%	10,137	3,0%
Ensayo Celiaco G+ IgG	1	13,97	0,827	5,9%	0,884	6,4%	0,757	5,3%
	2	23,10	1,274	5,5%	0,327	1,4%	1,821	7,8%
	3	33,81	2,071	6,1%	2,552	7,6%	1,696	5,0%
	4	91,83	3,472	3,8%	4,504	5,0%	1,723	1,9%
	5	116,49	4,360	3,7%	5,813	5,1%	1,349	1,1%
	6	120,44	3,008	2,5%	2,713	2,3%	2,770	2,3%
	7	179,74	4,661	2,6%	5,461	3,1%	3,998	2,2%

Límite de detección

El límite de detección (LD) fue determinado en base a 60 duplicados de la base y 10 duplicados de 6 muestras de nivel bajo (NHS). El LD para IgA fue de 8,9 EU/ml. El LD para IgG fue de 2,2 EU/ml.

Linealidad y recuperación

La linealidad y la recuperación fueron analizadas diluyendo especímenes positivos en el registro de ensayo en diluciones equidistantes y comparando los resultados reales frente a los esperados. El registro lineal de los ensayos se fijó en 8,9 (LD) – 320 EU/ml para IgA y 2,2 (LoD) – 160 EU/ml para IgG. Los resultados se resumen a continuación:

congelés. Evitez la congelación repetida y el degel de los especímenes. Es recomendado de probar los especímenes congelados en un tiempo de un año.

PROCÉDURE

Notes de procédure

- Lire attentivement l'encart du produit avant de commencer l'analyse.
- Toutes les dilutions des échantillons des patients doivent être préparées avant de commencer l'analyse.
- Laisser les spécimens des patients et les réactifs de test s'équilibrer à la température ambiante avant de commencer la procédure de test. Il est suggéré de laisser les réactifs sur le banc de travail en dehors de leur boîte pendant 30 minutes avant d'être utilisés. Remettre immédiatement après utilisation tous les spécimens et réactifs non utilisés dans le réfrigérateur.
- Retirer les bandes de micropuits nécessaires du sachet et resceller avec soin le sachet afin d'empêcher la condensation dans les puits non utilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.
- **Une bonne technique de lavage est essentielle.** Si le lavage est effectué manuellement, un lavage adéquat est accompli en dirigeant un jet puissant du tampon de lavage avec une pipette à tête large sur l'ensemble de la microplaque. **Il est recommandé d'utiliser un laveur automatique de microplaques.**
- Utiliser une pipette multicanaux capable de distribuer simultanément 8 ou 12 puits. Ceci accélère la procédure et donne des temps d'incubation uniformes.
- Pour toutes les étapes, un contrôle attentif du temps est important. Le début de toutes les périodes d'incubation commence avec la complétion de l'addition du réactif.
- L'addition de tous les échantillons et réactifs doit être effectuée au même taux et suivant la séquence chronologique.

Méthode de test






- Étape 1** Laisser tous les réactifs et spécimens s'équilibrer à température ambiante.
- Étape 2** Annoter la feuille de protocole pour indiquer le positionnement des échantillons dans les puits. Il est de bonne pratique de laboratoire de dupliquer les échantillons.
- Étape 3** Pour une **détermination qualitative**, n'utiliser que le calibre D (*firole avec le capuchon jaune*).
- ou**
- Pour une **détermination semi-quantitative**, utiliser les calibres de A à E comme décrit dans l'exemple de mise en place ci-dessous.

1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Conjugué anticorps de chèvre anti-IgG humaines pour REF 5159G. Prêt à l'emploi. Couleur de codage rose.
1 x 60 ml	DIL	Diluant pour sérum. Prêt à l'emploi. Couleur de codage violet.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrat d'enzyme : TMB Prêt à l'emploi. Protéger de la lumière.
1 x 15 ml	STOP	Solution d'arrêt Prêt à l'emploi.
2 x fioles	BUF WASH	Tampon de lavage en poudre. Pour reconstituer un litre par sachet.
1 x	Feuilles de protocole	

Composants optionnels

1 x 60ml	BUF WASH	Tampon de lavage en liquide concentré. Réhydratez jusqu'à un litre.
----------	-----------------	---

Symboles utilisés sur les étiquettes

LOT	Numéro de lot
REF	Numéro de catalogue
IVD	Utilisation avec diagnostic in vitro
	À utiliser avant
	Température de stockage
	Lire les instructions avant utilisation
	Nombre de tests
	Fabricant

Matériaux nécessaires mais non fournis

- Eau déminéralisée ou distillée
- Pissette en plastique pour contenir le tampon de lavage dilué
- Pipettes capables de distribuer entre 5 µl et 1000 µl
- Pointes de verre jetables
- Tubes à essai propres de 12 x 75 mm et portoir
- Compte-minutes
- Serviettes en papier absorbantes
- Lecteur de microplaques capable de lire les valeurs d'absorbance à 450 nm. Si un lecteur de microplaques à double longueur d'onde est utilisé, le filtre de référence doit être configuré à 600-650 nm.
- Un laveur automatique de microplaques capable de distribuer 200 µl

COLLECTION ET MANIPULATION DES SPÉCIMENS

Seuls les spécimens de sérum doivent être utilisés lors de cette procédure. Des spécimens largement contaminés d'hématolyses, de lipémiqes et de microbes peuvent interférer avec la réalisation du test et ne doivent pas être utilisés. Stockez les spécimens entre 2° et 8°C pour une période n'excédant pas une semaine. Pour un stockage plus long, les spécimens de sérum doivent être

Registro de análisis (EU/ml)	Inclinación (95% CI)	Corte Y (95% CI)	R²	% recuperación (obtenido/esperado)
IgA				
7,2 - 70,3	0,971 (0,907 - 1,035)	0,468 (-2,415 - 3,349)	0,9958	97,3 - 106,9
4,4 - 136	0,987 (0,942 - 1,033)	2,203 (-1,518 - 5,924)	0,9979	88,9 - 103,3
1,1 - 309,6	0,993 (0,909 - 1,076)	-4,609 (-18,092 - 11,808)	0,9946	94,4 - 114,8
IgG				
5,2 - 75,8	1,011 (0,975 - 1,047)	-0,499 (-2,170 - 1,171)	0,9987	97,3 - 105,7
4,8 - 93,9	1,006 (0,946 - 1,067)	1,161 (-2,217 - 4,538)	0,9963	90,9 - 102
1,2 - 169,8	1,034 (0,992 - 1,076)	0,9027 (-3,196 - 5,002)	0,9971	86,0 - 102,3

Interferencia

La interferencia fue estudiada mezclando sueros con niveles de anticuerpos de gliadina conocidos con muestras de suero con interferencia potencial y estudiando la desviación respecto a los resultados esperados. Los resultados para los isotipos IgA e IgG aparecen a continuación.

Celiaco G+ IgA

Muestra	Hemoglobina			Bilirrubina		RF	
	EU/mL	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int
Negativo	8,5	9,4	-9,9	11,6	-26,5	11,3	-26,5
Límite 1	25,2	23,7	6,3	23,5	7,5	26,2	7,5
Límite 2	21,7	21,5	0,9	21,4	1,4	23,2	1,4
Positivo 1	107,5	103,9	3,5	112,2	-4,2	118,0	-4,2
Positivo 2	126,5	122,2	3,5	138,4	-8,5	137,6	-8,5

Celiaco G+ IgG

	Hemoglobina			Bilirrubina		RF	
	EU/mL	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int
Negativo	5,0	4,7	5,5	4,6	8,4	5,9	-15,5
Límite 1	22,6	20,4	10,8	20,2	12,1	24,4	-7,5
Límite 2	18,0	19,5	-7,3	18,8	-4,0	22,4	-19,6
Positivo 1	74,6	72,0	3,6	78,1	-4,4	82,2	-9,3
Positivo 2	105,0	101,4	3,6	115,0	-8,7	114,4	-8,2

Hemoglobina: 2 g/L
 Bilirrubina: 342 µmol/L
 RF: 100 EU/ml



ImmuLisa™ Celiac G+

Gliadin Peptid Antikörper ELISA

IVD Nur zur In-vitro-Diagnostik

Produkteinlage

REF 5159A	Celiac G+ IgA ELISA	96 Bestimmungen
REF 5159G	Celiac G+ IgG ELISA	96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) zur qualitativen und semi-quantitativen Bestimmung von anti-humanem Gewebe-Transglutaminase IgA oder IgG-Antikörpern auf Gliadin im Humanserum, zur Unterstützung bei der Diagnose von Zöliakie (CD), in Verbindung mit anderen laboratorischen und klinischen Befunden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Zöliakie (CD) ist autoimmune gastrointestinale Störung, die bei Personen mit erblicher Vorbelastung auftreten kann, ausgelöst durch die Aufnahme von glutenhaltigem Getreide wie Weizen, Gerste und Roggen. CD wird charakterisiert durch Malabsorption als Folge einer entzündlichen Verletzung der Schleimhaut des Dünndarms und, bei längerem Anhalten, zu Unterernährung führen kann. Nur ein geringer Prozentsatz der Patienten mit CD weisen die klassischen Symptome auf. Als Konsequenz ist das klinische Spektrum von Zöliakie umfassender als in der Vergangenheit, um auch die Patienten einzuschließen, die nicht die klassischen Symptome aufweisen. Als erste Symptome sind nicht gastrointestinale nicht ungewöhnlich, auch können gastrointestinale Symptome in leichter oder diskontinuierlicher Form auftreten. Die Notwendigkeit, ein breiteres Spektrum klinischer Befunde zu untersuchen, führte zu einem Anstieg der Anzahl Personen, bei denen Zöliakie in fortgeschrittenem Alter diagnostiziert wurde. Das Aufkommen serologischer Methoden für die Erkennung von Antikörpern gegen Gliadin, Endomysium und Gewebe-Transglutaminase haben in Europa und den USA umfassende Untersuchungen für CD ermöglicht. Diese Studien zeigen, dass CD verbreiteter ist als zunächst angenommen. Aktuelle serologische Studien zeigen ein Vorkommen von CD bei einem von 100 und einem von 500.^{2,3} Die Verbreitung von CD ist weit höher bei Verwandten ersten und zweiten Grades von Patienten mit CDCD wurde mit vielen anderen Autoimmunerkrankheiten in Verbindung gebracht, wie Diabetes Typ 1, Thyroid Autoimmunität und andere Autoimmunerkrankheiten.

Der verbreitetste serologische Test für CD ist die immunfluoreszierende Methode, für die Entdeckung von endomysialen Antikörpern (EMA) und die ELISA Methode, wobei Antikörper gegen Gewebe-Transglutaminase (tTG) erkannt werden und Gliadin.⁴⁻⁸ Auf Grund der beschränkten Sensitivität und Spezifität von Gliadin Antikörpertests wurde diese Methode weitgehend von EMA und tTG abgelöst.

Die Beschränkungen der EMA und tTG Untersuchungen sind, dass beide Immununtersuchungen IgA-Antikörper entdecken, wodurch die Identifikation von

Précautions

Toutes les composantes à dérivée humaine utilisées ont été testées pour HBsAg, HCV, HIV-1 et 2 et HTLV-I et tous les tests requis par la FDA sont revenus négatifs. Toutefois, les dérivés de sang humain et les spécimens des patients doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire en matière de stockage, de distribution et d'élimination de ces matériaux.²⁴

Les instructions doivent être suivies exactement comme elle apparaissent dans cet encart afin d'assurer des résultats valides. Ne pas échanger les composantes de ce kit avec celles d'autres sources. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire afin de minimiser la contamination microbienne et croisée des réactifs lors de la manipulation. Ne pas utiliser de composantes du kit au-delà de la date d'expiration indiquée sur les étiquettes.

Matériaux fournis

ImmuLisa™ cœliaque G+ IgA ELISA	REF 5159A
ImmuLisa™ cœliaque G+ IgG ELISA	REF 5159G

Les kits contiennent suffisamment de réactifs pour effectuer 96 mesures.

12 x 8	MICROPLATE CG+	Microplaque avec micropuits détachables individuels Enduite de peptides de la gliadine désamidés. Prêt à l'emploi.
1x1,75 ml	CONTROL+ CG+A	Régulation positive prête à l'emploi (<i>capuchon rouge</i>) pour REF 5159A. Contient du sérum humain positif pour anticorps anti-gliadine IgA. La gamme de concentration attendue en EU/ml est imprimée sur l'étiquette.
1x1,75 ml	CONTROL+ CG+G	Régulation positive prête à l'emploi (<i>capuchon rouge</i>) pour REF 5159G. Contient du sérum humain positif pour anticorps anti-gliadine IgG. La gamme de concentration attendue en EU/ml est imprimée sur l'étiquette.
1x1,75 ml	CONTROL-	Régulation négative prête à l'emploi (<i>capuchon blanc</i>). Contient du sérum humain.
5x1,75 ml	CALIBRATOR A CG+A CALIBRATOR B CG+A CALIBRATOR C CG+A CALIBRATOR D CG+A CALIBRATOR E CG+A	Jeu de 5 calibres prêts à l'emploi pour REF 5159A. Calibre A (<i>capuchon vert</i>) 320 EU/ml, Calibre B (<i>capuchon violet</i>) 160 EU/ml, Calibre C (<i>capuchon bleu</i>) 80 EU/ml, Calibre D (<i>capuchon jaune</i>) 20 EU/ml, et Calibre E (<i>capuchon orange</i>) 1 EU/ml. Dérivé de sérum humain contenant des anticorps anti-gliadine IgA. Les concentrations en EU/ml sont imprimées sur les étiquettes.
5x1,75 ml	CALIBRATOR A CG+G CALIBRATOR B CG+G CALIBRATOR C CG+G CALIBRATOR D CG+G CALIBRATOR E CG+G	Jeu de 5 calibres prêts à l'emploi pour REF 5159G. Calibre A (<i>capuchon vert</i>) 160 EU/ml, Calibre B (<i>capuchon violet</i>) 80 EU/ml, Calibre C (<i>capuchon bleu</i>) 40 EU/ml, Calibre D (<i>capuchon jaune</i>) 20 EU/ml, et Calibre E (<i>capuchon orange</i>) 1 EU/ml. Dérivé de sérum humain contenant des anticorps anti-gliadine IgG. Les concentrations en EU/ml sont imprimées sur les étiquettes.
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	Conjugué anticorps de chèvre anti-IgA humaines pour REF 5159A. Prêt à l'emploi. Couleur de codage rose.

limitée des analyses d'anticorps anti-gliadine, cette méthode a largement été remplacée par l'EMA et la tTG.

La limite des immunoessais EMA et de la tTG est que ces deux types d'immunoessais détectent les anticorps IgA, ce qui gêne l'identification des patients souffrants de la CD ayant une déficience en IgA.⁹⁻¹¹ Les tests d'anticorps anti-gliadine IgG sont importants pour le diagnostic de la CD chez les patients qui ont une déficience en IgA.¹⁰ Les études montrent que 1 à 2 % de la population générale a une déficience en IgA et que l'incidence de la CD sur les sujets ayant une déficience en IgA est importante, d'où le besoin de tests spécifiques. De plus, certaines études questionnent la spécificité des analyses tTG et la sensibilité des EMA.¹²⁻¹⁶ Les analyses basées sur les peptides de la gliadine ont montré des résultats prometteurs en répondant aux limites des analyses actuelles.¹⁷⁻²³ Cette prochaine génération d'analyses pour la détection des anticorps anti-gliadine, la Coélie G+ ELISA, offre une technologie propriétaire des peptides de la gliadine qui fournit une détection sensible et spécifique des anticorps isotopes IgA et IgG avec un haut niveau de fiabilité.

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Le test est effectué sur immunoessais de phase solide. Les micropuits sont enduits de peptides de la gliadine désamidés suivis par une étape de blocage pour réduire la ligature de protéines non spécifiques pendant l'analyse. Les régulations, les calibreurs et les sérums sanguins des patients sont incubés dans les puits d'antigène enduits pour permettre aux anticorps spécifiques présents dans le sérum de se lier à l'antigène de la gliadine. Les anticorps non liés et les autres protéines du sérum sont enlevés par lavage des micropuits. Les anticorps liés sont détectés en ajoutant une enzyme étiquetée IgA anti-humain ou conjugué IgG aux micropuits. Le conjugué non lié est enlevé par lavage. Le substrat enzymatique spécifique (TMB) est ensuite ajouté aux puits et la présence des anticorps est détectée par un changement de couleur produit par la conversion du substrat TMB à un réactif coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnelle à la concentration des anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 450 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA par millilitre (EU/ml) et rapportés comme positifs ou négatifs.

RÉACTIFS

Stockage et préparation

Stockez tous les réactifs entre 2 et 8°C. **A ne pas congeler.** Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration lorsqu'ils sont stockés et manipulés comme indiqué.

A ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant utilisation.

Réhydratez le tampon à eau jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée ou déminéralisée. Lorsque stocké entre 2 et 8°C, le tampon à eau réhydraté est stable jusqu'à la date d'expiration du kit.

Les lamelles enduites des micro-réceptacles sont pour un usage unique. Les lamelles de micro-réceptacles non utilisées doivent être réapposés avec précaution dans le sachet contenant les déshydratants pour empêcher une condensation et stockés entre 2 et 8°C.

IgA Patients mit CD behindert wird.⁹⁻¹¹ IgG Gliadin Antikörpertests sind wichtig für die Diagnose von CD bei Patienten die IgA-Defizient sind.¹⁰ Studien zeigen, dass 1-2% der allgemeinen Bevölkerung IgA-defizient ist und dass die Verbreitung von CD bei IgA-defizienten Personen erheblich ist, daher der Bedarf nach spezifischen Tests. Zusätzlich stellen manche Tests die Spezifität von tTG-Untersuchungen in Frage und die Sensitivität von EMA.¹²⁻¹⁶ Gliadin Peptid basierte Tests haben vielversprechende Ergebnisse erbracht bei der Adressierung der Beschränkung aktueller Untersuchungen. Diese nächste Generation Test für die Entdeckung von Gliadin-Antikörpern, die Celiac G+ ELISA, enthält eine eigene Gliadin Peptid Technologie, die eine sensitive und spezifische Entdeckung von IgA oder IgG isotopischen Antikörpern mit einer hohen Verlässlichkeit finden.

VERFAHRENSPRINZIPIEN

Der Test wird als immunologischer Festphasentest durchgeführt. Ungebundene Antikörper und andere Proteine des Serums werden durch Auswaschung der Mikrovertiefungen entfernt. Gebundene Antikörper werden durch die Hinzugabe eines Enzym-gekennzeichneten IgA- oder IgG-Konjugats zu den Mikrovertiefungen erkannt. Das ungebundene Konjugat wird durch Auswaschung entfernt. Ein bestimmtes Enzymsubstrat (TMB) wird dann zu den Vertiefungen hinzugefügt und das Vorhandensein von Antikörpern wird durch eine Änderung der Farbe angezeigt, durch die Konversion des TMB-Substrats zu einem farbigen Reaktionsprodukt. Die Reaktion wird angehalten und die Intensität der Farbänderung, die proportional zu der Konzentration der Antikörper ist, wird von einem Spektrofotometer bei 450 nm abgelesen. Die Ergebnisse werden ELISA Einheiten pro Millimeter (EU/ml) angegeben und als positiv oder negativ angezeigt.

REAGENZNIEN

Lagerung und Vorbereitung

Alle Reagenzien bei 2-8°C lagern. **Nicht einfrieren.** Die Reagenzien sind bis zum Ablaufdatum stabil, wenn sie wie angewiesen gelagert und behandelt werden.

Verwenden Sie es nicht, wenn das Reagenz nicht farblos oder wenn ein Präzipitat vorhanden ist. Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch (20-25°C) auf Raumtemperatur gebracht werden.

Den Waschpuffer zu 1 Liter mit destilliertem oder vollentsalztem Wasser herstellen. Bei Lagerung mit 2-8°C bleibt der hergestellte Waschpuffer bis zum Kit-Ablaufdatum stabil.

Beschichtete Mikrovertiefungsstreifen sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Ungebrauchte Mikrovertiefungsstreifen sollten im Beutel, der Trocknungsmittel enthält, sorgfältig wieder versiegelt werden, um Kondensation zu verhindern, und bei 2-8 °C gelagert werden.

Vorsichtsmaßnahmen

Alle verwendeten menschlichen Bestandteile wurden negativ auf HBsAg, HCV, HIV-1 und 2 und HTLV-I getestet, mit Hilfe eines FDA erforderlichen Tests. Derivate menschlichen Blutes und Patientenproben sollten als potentiell

ansteckend behandelt werden. Befolgen Sie die sachgemäßen Vorgänge bezüglich Lagerung, Zubereitung und Entsorgung dieser Materialien. 24

Die Anleitung in diesem Kit sollte genauestens befolgt werden, um genaue Resultate zu erzielen. Tauschen Sie keine Teile des Kits mit denen aus anderen Quellen aus. Befolgen Sie die sachgemäßen Vorgänge, um die mikrobielle und Kreuzkontamination von Reagenzien bei der Nutzung zu minimieren. Benutzen Sie keine Teile des Kits nach dem Verfallsdatum auf dem Etikett.

Materialien

ImmuLisa™ Celiac G+ IgA ELISA
ImmuLisa™ Celiac G+ IgG ELISA

REF 5159A
REF 5159G

Das Set enthält ausreichend Reagenzien für 96 Tests.

12 x 8	MICROPLATE CG+	Mikroplatte mit einzelnen abbrechbaren Mikrovertiefungen. Ummantelt mit deamisierten Gliadin Peptiden. Gebrauchsfertig.
1 x 1,75 ml	CONTROL+ CG+A	Gebrauchsfertige positive Kontrolle (rote Kappe) für REF 5159A. Enthält menschliches Serum, positiv auf Gliadin, IgA-Antikörper. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt.
1 x 1,75 ml	CONTROL+ CG+G	Gebrauchsfertige positive Kontrolle (rote Kappe) für REF 5159G. Enthält menschliches Serum, positiv auf Gliadin, IgG-Antikörper. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt.
1 x 1,75 ml	CONTROL-	Gebrauchsfertige negative Kontrolle (weiße Kappe). Enthält menschliches Serum.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A CG+A	Gebrauchsfertiger Satz von 5 Kalibratoren für REF 5159A. Kalibrator A (<i>grüne Kappe</i>) 320 EU/ml, Kalibrator B (<i>violette Kappe</i>) 160 EU/ml, Kalibrator C (<i>blaue Kappe</i>) 80 EU/ml, Kalibrator D (<i>gelbe Kappe</i>) 20 EU/ml, und Kalibrator E (<i>orangene Kappe</i>) 1 EU/ml. Aus menschlichem Serum mit Gliadin IgA-Antikörpern. Konzentrationen in EU/ml stehen auf dem Etikett.
	CALIBRATOR B CG+A	
	CALIBRATOR C CG+A	
	CALIBRATOR D CG+A	
	CALIBRATOR E CG+A	
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A CG+G	Gebrauchsfertiger Satz von 5 Kalibratoren für REF 5144G. Kalibrator A (<i>grüne Kappe</i>) 160 EU/ml, Kalibrator B (<i>violette Kappe</i>) 80 EU/ml, Kalibrator C (<i>blaue Kappe</i>) 40 EU/ml, Kalibrator D (<i>gelbe Kappe</i>) 20 EU/ml, und Kalibrator E (<i>orangene Kappe</i>) 1 EU/ml. Aus menschlichem Serum mit Gliadin IgG-Antikörpern. Konzentrationen in EU/ml stehen auf dem Etikett.
	CALIBRATOR B CG+G	
	CALIBRATOR C CG+G	
	CALIBRATOR D CG+G	
	CALIBRATOR E CG+G	
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	HRP anti-menschliches IgA Konjugat für REF 5159A. Gebrauchsfertig Farbkodiert pink.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP anti-menschliches IgG Konjugat für REF 5159G. Gebrauchsfertig Farbkodiert pink.
1 x 60 ml	DIL	Serum Verdünnungsmittel. Gebrauchsfertig Farbkodiert lila.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	TMB Enzymsubstrat. Gebrauchsfertig. Vor Licht schützen.



ImmuLisa™

Cœliaque G+

Anticorps des peptides de la gliadine ELISA

IVD Pour utilisation avec diagnostic *in vitro*

ENCART DE PRODUIT

REF 5159A Cœliaque G+ IgA ELISA 96 mesures
REF 5159G Cœliaque G+ IgG ELISA 96 mesures

APPLICATION

Analyse immunoabsorbante associée aux enzymes (ELISA) pour une détection qualitative et semi-quantitative des anticorps anti-gliadines IgA ou IgG dans le sérum humain pour aider au diagnostic de la maladie cœliaque en conjonction avec les autres résultats cliniques et de laboratoire.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La maladie cœliaque (CD) est un trouble gastrointestinal auto-immunitaire qui se produit chez les individus génétiquement susceptibles et qui est activé par l'ingestion de céréales contenant du gluten telles que le blé, l'orge et le son. La CD est caractérisée par la mauvaise absorption consécutive de la blessure inflammatoire de la muqueuse du petit intestin. Lorsqu'elle est prolongée, cela peut entraîner une malnutrition. Les symptômes classiques de la CD sont la diarrhée, la perte de poids et la malnutrition. Toutefois, seul un faible pourcentage de patients atteints de la CD présente des symptômes classiques.¹ En conséquence, le spectre clinique de la CD s'est plus largement agrandi que dans le passé pour inclure les patients qui ne présentent pas les symptômes classiques. Il n'est pas rare que les symptômes initiaux ne soient pas gastrointestinaux ou que les symptômes gastrointestinaux, s'il y en a, soient légers ou intermittents. Le besoin d'examiner une gamme de présentations cliniques plus étendue a amené le diagnostic d'un plus grand nombre d'individus avec la CD plus tard au cours de leur vie qu'auparavant. L'apparition des méthodes sérologiques pour la détection des anticorps anti-gliadine, à l'anti-endomysium et anti-transglutaminase du tissu a permis des études de dépistage à grande échelle pour la CD, à la fois en Europe et aux États-Unis. Ces études suggèrent que la CD est bien plus répandue que ce que l'on pensait auparavant. Des études sérologiques récentes démontrent l'incidence de la CD entre 1 sur 100 et 1 sur 500^{2,3} La prévalence de la CD est bien plus élevée dans les membres de la famille au premier et deuxième degré des patients souffrant de la CD. La CD a été associée avec bien d'autres troubles auto-immunitaires tels que le diabète de type 1, l'auto-immunité thyroïdienne et les autres troubles auto-immunitaires.

Les tests sérologiques les plus courants pour le dépistage de la CD sont la méthode de détection des anticorps anti-endomysium par immunofluorescence (EMA) et les méthodes ELISA de détection des anticorps à la transglutaminase du tissu (tTG) et anti-gliadine.⁴⁻⁸ En raison de la sensibilité et de la particularité

Linearität und Erholung

Linearität und Erholung wurden getestet durch verdünnte positive Proben durch die Bandbreite des Versuchs in äquidistanten Verdünnungen und den Vergleich tatsächlicher und erwarteter Ergebnisse. Der lineare Bereich der Versuche wurde als 8,9 (LoD) festgelegt – 320 EU/ml für IgA und 2,2 (LoD) – 160 EU/ml für IgG. Die Ergebnisse finden Sie unten:

Testmethode Bandbreite (EU/ml)	Slope (95% CI)	Y-Abfang (95% CI)	R ²	% Wiederherstellung (erhalten/erwartet)
IgA				
7,2 - 70,3	0,971 (0,907 - 1,035)	0,468 (-2,415 - 3,349)	0,9958	97,3 - 106,9
4,4 - 136	0,987 (0,942 - 1,033)	2,203 (-1,518 - 5,924)	0,9979	88,9 - 103,3
1,1 - 309,6	0,993 (0,909 - 1,076)	-4,609 (-18,092 - 11,808)	0,9946	94,4 - 114,8
IgG				
5,2 - 75,8	1,011 (0,975 - 1,047)	-0,499 (-2,170 - 1,171)	0,9987	97,3 - 105,7
4,8 - 93,9	1,006 (0,946 - 1,067)	1,161 (-2,217 - 4,538)	0,9963	90,9 - 102
1,2 - 169,8	1,034 (0,992 - 1,076)	0,9027 (-3,196 - 5,002)	0,9971	86,0 - 102,3

Interferenz

Interferenz wurde untersucht durch die Mischung von Serum mit bekannten Gliadin-Antikörper Niveaus mit potentiellen störenden Serumproben und die Abweichung von den erwarteten Ergebnissen untersucht. Ergebnisse für IgA und IgG Isotypen finden Sie unten.

Celiac tTG IgA

Probe	EU/mL	Hämoglobin		Bilirubin		RF	
		EU/mL	% Int	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int
Negativ	8,5	9,4	-9,9	11,6	-26,5	11,3	-26,5
Cutoff 1	25,2	23,7	6,3	23,5	7,5	26,2	7,5
Cutoff 2	21,7	21,5	0,9	21,4	1,4	23,2	1,4
Positiv 1	107,5	103,9	3,5	112,2	-4,2	118,0	-4,2
Positiv 2	126,5	122,2	3,5	138,4	-8,5	137,6	-8,5

Celiac G+ IgG

	EU/mL	Hämoglobin		Bilirubin		RF	
		EU/mL	% Int	EU/mL	% Int	EU/mL	% Int
Negativ	5,0	4,7	5,5	4,6	8,4	5,9	-15,5
Cutoff 1	22,6	20,4	10,8	20,2	12,1	24,4	-7,5
Cutoff 2	18,0	19,5	-7,3	18,8	-4,0	22,4	-19,6
Positiv 1	74,6	72,0	3,6	78,1	-4,4	82,2	-9,3
Positiv 2	105,0	101,4	3,6	115,0	-8,7	114,4	-8,2

Hämoglobin: 2 g/L
 Bilirubin: 342 µmol/L
 RF: 100 EU/ml

1 x 15 ml STOP|H2SO4

2 x BUF|WASH

Ampullen

1 x

Stopplösung. Gebrauchsfertig.

Puderwaschpuffer. **Auf jeweils einen Liter einstellen.**









Protokollblätter

Optionale Komponenten

1 x 60ml BUF|WASH

Flüssigkeit konzentrierter Waschpuffer. Zu einem Liter herstellen.

Symbole auf den Etiketten

	Patientennummer
	Katalognummer
	In-vitro-Diagnostik
	Gebrauch durch
	Lagertemperatur
	Anweisungen vor dem Gebrauch lesen
	Anzahl Tests
	Hersteller

Erforderliche Materialien, die nicht enthalten sind

- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für verdünnten Waschpuffer
- Pipetten für 5 µl bis 1000 µl
- Wegwerfbare Pipettenköpfe
- Saubere Reagenzgläser 12 x 75 mm und Halter für Reagenzgläser
- Absorbierende Papiertücher
- Leser für Mikroplatten, für Absorptionswerte bis 450 nm. Wenn ein Doppelwellenlängen-Leser für Mikroplatten verfügbar ist, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm gestellt sein.
- Automatischer Wascher für Mikroplatten für die Verteilung von 200 µl

SAMMLUNG UND BEHANDLUNG VON PROBEN

Bei diesem Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Grob hämolisierte, lipämisch oder mikrobisch verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinträchtigen und sollten nicht verwendet werden. Die Proben bei 2-8°C für nicht länger als eine Woche lagern. Bei längerer Lagerung sollten die Serumproben eingefroren werden. Das wiederholte Einfrieren und Auftauen von Proben vermeiden. Es wird empfohlen, dass eingefrorene Proben innerhalb eines Jahres geprüft werden.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie genau die Packungsbeilage bevor Sie mit der Untersuchung beginnen.

- Alle Verdünnungen der Patientenprobe müssen vor Beginn der Untersuchung vorbereitet sein.
- Lassen Sie Patientenproben und Testreagenzien vor Beginn der Untersuchung auf Zimmertemperatur aufwärmen. Es wird empfohlen, dass die Reagenzien 30 Minuten vor dem Gebrauch außerhalb der Box gelassen werden. Stellen Sie direkt nach dem Gebrauch alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien wieder in den Kühlschrank.
- Entfernen Sie alle Mikrotiterstreifen aus dem Behälter und verschließen Sie den Behälter wieder vorsichtig, um Kondensation der nichtgebrauchten Vertiefungen zu verhindern. Bringen Sie den Behälter direkt nach dem Gebrauch wieder in den Kühlschrank.
- **Eine korrekte Waschtechnik ist entscheidend.** Wenn die Waschung von Hand durchgeführt wird, wird die korrekte Waschung erreicht durch einen starken Strom des Waschpuffers mit einer Waschflasche mit großer Öffnung über der ganzen Mikroplatte. **Ein automatischer Reiniger für Mikroplatten wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Pipette mit mehreren Kanälen, für 8 oder 12 Vertiefungen gleichzeitig. Dies beschleunigt den Prozess und bietet einheitlichere Inkubationszeiten.
- Eine genaue Überwachung der Zeit ist bei allen Schritten wichtig. Der Beginn der Inkubationszeit beginnt mit der Komplettierung der Hinzufügung der Reagenzien.
- Die Hinzufügung aller Proben und Reagenzien sollte in der gleichen Menge und der gleichen Häufigkeit geschehen.

Testmethode

Schritt 1 Lassen Sie alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur erwärmen.

Schritt 2 Beschriften Sie das Protokollblatt um die Hinzugabe der Probe zur Vertiefung anzugeben. Von den Proben sollten Duplikate vorhanden sein.

Schritt 3 Für eine **qualitative Bestimmung** nutzen Sie nur Kalibrator D (*Ampulle mit gelber Kappe*).

oder

Für eine semi-qualitative Bestimmung nutzen Sie die Kalibratoren A bis E wie unten gezeigt.

Kondition	n	IgA Positiv n (%)	IgG Positiv n (%)
Basedowkrankheit	11	0 (0%)	0 (0%)
Hashimoto's Thyroiditis	11	1 (9%)	0 (0%)
ANA positiv*	9	0 (0%)	0 (0%)
CCP positiv**	10	0 (0%)	2 (20%)
RF positiv**	10	0 (0%)	0 (0%)
Gesamt	50	2 (4%)	2 (4%)

* Antinukleare Antikörper

** Cyclic Citrullinated Peptides Antikörper

*** Rheumatoid Factor Antibodies

Genauigkeit

Die Genauigkeit wurde mithilfe mehrerer Proben getestet, die aus der gesamten Bandbreite des Versuchs ausgewählt wurden. Drei Durchläufe der Untersuchung wurden ausgeführt, an verschiedenen Tagen, um die Ergebnisse zwischen den Tagen zu bestimmen. Ein zusätzlicher Durchlauf von sechs Replikaten wurde durchgeführt, um die Wiederholungsrate zu bestimmen. Die Ergebnisse finden Sie unten.

Set	S #	Mittel (EU/ml)	Gesamt Ungenauigkeit		Zwischen Tagen		Innerhalb Test (Wiederholbarkeit)	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	
Celiac G+ IgA Test	1	15,38	1,713	11,1%	2,474	16,2%	0,572	3,7%
	2	22,09	1,649	7,5%	2,011	9,1%	1,392	6,3%
	3	27,23	1,792	6,6%	1,932	7,1%	1,807	6,7%
	4	37,08	2,565	6,9%	3,043	8,2%	2,277	6,2%
	5	79,94	6,027	7,5%	8,438	10,7%	2,686	3,3%
	6	180,68	5,734	3,2%	7,852	4,3%	3,205	1,8%
	7	186,77	7,926	4,2%	10,837	5,9%	3,872	2,1%
	8	341,97	9,786	2,9%	10,389	3,0%	10,137	3,0%
Celiac G+ IgG Test	1	13,97	0,827	5,9%	0,884	6,4%	0,757	5,3%
	2	23,10	1,274	5,5%	0,327	1,4%	1,821	7,8%
	3	33,81	2,071	6,1%	2,552	7,6%	1,696	5,0%
	4	91,83	3,472	3,8%	4,504	5,0%	1,723	1,9%
	5	116,49	4,360	3,7%	5,813	5,1%	1,349	1,1%
	6	120,44	3,008	2,5%	2,713	2,3%	2,770	2,3%
	7	179,74	4,661	2,6%	5,461	3,1%	3,998	2,2%

Beschränkung der Erkennung

Die Beschränkung der Erkennung (LoD) wurde basierend auf 60 Replikaten des Leerversuchs und 10 Replikaten der jeweiligen 6 niedrigstufigen (NHS) Proben bestimmt. LoD für IgA war 8,9 EU/ml. LoD für IgG war 2,2 EU/ml.

Andere Gliadin IgG ELISA

		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	88	9	97
CELIAC G+	Negativ	7	109	116
IgG ELISA	Gesamt	95	118	213

Positiv Prozentsatz Übereinstimmung: 92,6% (95% CI 84,9% - 96,7%)

Negativ Prozentsatz Übereinstimmung: 92,4% (95% CI 85,6% - 96,2%)

Gesamt Prozentsatz Übereinstimmung: 92,5% (95% CI 87,9% - 95,5%)

B. Celiac G+ vs. EMA: Ergebnisse die durch Celiac G+ ELISAs erhalten werden, werden mit endomysiale Antikörper (EMA) EMA-Titer aus einem kommerziell verfügbaren IFA und einer gut charakterisierten klinische Population verglichen. Nur Proben mit einem linearen Bereich des Versuchs werden in dem Vergleich der Methoden betrachtet. Die Ergebnisse finden Sie unten.

CD Population von EMA bestätigt

		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positive	78	5	83
CELIAC G+	Negativ	18	55	73
IgA ELISA	Gesamt	96	60	156

Geschätzte Sensitivität: 81,3% (95% CI 71,7% - 88,2%)

Geschätzte Genauigkeit: 91,7% (95% CI 80,9% - 96,9%)

Übereinstimmung: 85,3% (95% CI 78,5% - 90,2%)

EMA positive Zöliakie-Patienten: 96

Krankheitskontrollen: 7

Gesunde normale Patienten: 53

CD Population von EMA bestätigt

		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	94	3	97
CELIAC G+	Negativ	11	105	116
IgG ELISA	Gesamt	105	108	213

Geschätzte Sensitivität: 89,5% (95% CI 81,6% - 94,4%)

Geschätzte Genauigkeit: 97,2% (95% CI 91,5% - 99,3%)

Übereinstimmung: 93,4% (95% CI 89,0% - 96,2%)

EMA positive Zöliakie-Patienten: 105

Krankheitskontrollen: 20

Gesunde normale Patienten: 88

C. Kreuzreaktivität: Insgesamt 50 potentiell kreuzreaktive Proben von Individuen mit anderen autoimmunen Krankheiten oder positiv auf andere Antikörper wurden auf Gliadin-Antikörper getestet mit dem ImmuLisa™ Celiac G+ System.

Qualitativ

A	Leerprobe	S5	usw.
B	-Kontrolle	S6	
C	+ Kontrolle	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	

1 2 3

Semiquantitativ

A	Leerprobe	S1	usw.
B	-Kontrolle	S2	
C	+ Kontrolle	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	

1 2 3

- Schritt 4 Bereiten Sie **1:101** Verdünnung der Patientenproben vor indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit **500ul der Serumsverdünnung mischen**.
- Schritt 5 Entfernen Sie die erforderlichen Mikrotiterstreifen aus dem Behälter und geben Sie die nicht gebrauchten Streifen in dem verschlossenen Behälter in den Kühlschrank. Stellen Sie die Mikrovertiefungen in den zusätzlichen Halter.
- Schritt 6 Pipette mit **100 µl** gebrauchsfertigen Kalibratoren, positiven und negativen Kontrollen und verdünnten Patientenproben (**1:101**) gemäß dem Protokollblatt in die passenden Mikrovertiefungen.
Beachte: Nutzen Sie eine Vertiefung mit **100 µl** der Serenverdünnung als Leerversuch.
- Schritt 7 **30 Minuten** (± 5 min) bei Zimmertemperatur inkubieren.
- Schritt 8 **4x** mit Waschpuffer waschen. Füllen Sie bei manueller Waschung jede Vertiefung mit neuem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit indem Sie alle Inhalte der einzelnen Vertiefungen auswaschen oder saugen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung heraus. Um nach der letzten Waschung abzulöschen, geben Sie einen Streifen hinein und stellen Sie die Vertiefungen auf Papiertücher. Für die automatische Reinigung programmieren Sie den Reiniger gemäß den Angaben des Herstellers.
- Schritt 9 Pipette mit **100 µl** des Konjugats in Mikrovertiefungen.
- Schritt 10 **30 Minuten** (± 5 min) bei Zimmertemperatur inkubieren.
- Schritt 11 Waschen Sie alle Mikrovertiefungen gemäß Schritt 8.
- Schritt 12 Pipette mit **100 µl** des Enzymsubstrats in jede Vertiefung in der gleichen Reihenfolge und der Zeit wie das Konjugat.
- Schritt 13 **30 Minuten** (± 5 min) bei Zimmertemperatur inkubieren.
- Schritt 14 Pipette mit **100 µl** de Stopplösung in jede Vertiefung in der gleichen Reihenfolge und der Zeit wie bei der Zugabe des Enzymsubstrats geben. Lesen Sie die Absorbierungswerte innerhalb von 30 Minuten ab Hinzugabe der Stopplösung ab.
- Schritt 15 Lesen Sie die Absorbierung der einzelnen Vertiefungen bei 450 nm ab, durch einen einzelnen oder bei 450/630nm durch einen doppel-Wellenlängen Leser für Mikroplatten ab, gegen den Leerversuch, der als null Absorbierung eingestuft wird.

Qualitätskontrolle

Kalibratoren, positive und negative Kontrollen und ein Leerversuch sind bei jeder Untersuchung nötig, um die Integrität und Genauigkeit des Tests zu gewährleisten. Der Absorbierungswert des Leerversuchs sollte <0.3 sein. Der Kalibrator A muss einen Absorbierungswert von nicht weniger als 1,0 haben, ansonsten muss der Test wiederholt werden. Die negative Kontrolle muss <10 EU/ml sein. Wenn der Test als Duplikat durchgeführt wird, muss der Mittelwert der Ablesungen genutzt werden, um die EU/ml zu bestimmen. Während der qualitativen Bestimmungen, muss die optische Dichte von Kalibrator D größer sein als die der negativen Kontrolle und geringer als der Absorbierung der positiven Kontrolle. Bei den semi-quantitativen Bestimmungen muss die positive Kontrolle Werte ergeben, die auf dem Behälter angegeben sind.

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Abs. der Testprobe

----- X EU/ml von Kalibrator D = EU/ml Testprobe

Abs. von Kalibrator D

Es wird empfohlen, dass qualitative Resultate als "positiv" oder "negativ" berichtet werden. Probenresultate größer oder gleich Kalibrator D werden als positiv angesehen.

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Notieren Sie die Absorbierung von Kalibrator A bis E gegen die entsprechenden Konzentrationen auf linearem Millimeterpapier. Notieren Sie die Konzentrationen in EU/ml auf der X-Achse gegen die Absorbierung auf der Y-Achse und zeichnen Sie eine Punkt-zu-Punkt Kurve. Bestimmen Sie die Konzentrationen der Patientenproben aus der Kurve entsprechend den Absorbierungswerten. Als Alternative kann eine Kurve mit 4 Parametern genutzt werden, um die Standardkurve zu zeichnen.

Es wird empfohlen, dass semiquantitative Resultate als "positiv", "negativ", oder "unbestimmt" mit EU/ml Einheitswerten berichtet werden. Unbestimmte/Grenzlinien Resultate sollten erneut getestet und zusammen mit anderen Labormethoden.

Interpretation

Folgendes dient lediglich als Richtwert bei der Interpretation von Laborergebnissen. Die unten stehenden Werte sind die Mittelwerte normaler Individuen plus 2 SD. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte ermitteln.

<u>anti-tTG Ab Wert</u>	<u>Interpretation</u>
<20 EU/ml	Negativ
20-25 EU/ml	Unbestimmt (Borderline)
>25 EU/ml	Positiv

Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind enthalten für eine semi-quantitative Bestimmung und bei jedem Test verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörper-Niveaus können Absorbierungswerte ergeben, die höher sind als die von Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte zu ermitteln, müssen solche Proben weiter verdünnt werden, damit sie in den Bereich der Kalibratorcurve fallen wenn sie erneut getestet werden. Um die EU/ml Werte zu bestimmen, multiplizieren Sie die erhaltenen Einheiten mit dem Verdünnungsfaktor.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Nur Serenproben sollten bei diesem Verfahren verwendet werden. Grob hämolisiert, lipämisch oder mikrobiell infizierte Proben können die Leistung der Untersuchung beeinträchtigen und dürfen nicht verwendet werden. Lagern Sie Proben bei 2°- 8°C nicht länger als eine Woche. Für eine längere Lagerung sollten die Proben gefroren werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben.

Die Testergebnisse dienen als Hilfe bei der Diagnose und sollten im Zusammenhang mit anderen Laboruntersuchungen und klinischen Befunden betrachtet werden. Dieser Test wurde nicht mit pädiatrischen Proben bewertet.

ERWARTETE WERTE

Testergebnisse in einer normalen Population werden als negativ erwartet. Da das Vorkommen von CD in der normalen Population bei etwa 1% liegt, können manche scheinbar gesunden, symptomfreien Personen einen positiven Test auf Celiac G+ ELISA ergeben.

LEISTUNGSSCHARAKTERISTIKEN

Die Verwendung der ImmuLisa™ Celiac G+ ELISAs für die Entdeckung von Gliadin-Antikörpern wurde dadurch bewertet, dass gut charakterisierte EMA positive Serenproben von eventuellen CD-Patienten getestet wurden, zusammen mit Krankheitskontrollen und regulärem menschlichen Serum. Diese wurden auch mit kommerziell verfügbaren ELISA Testsets getestet. Nur Proben mit einem linearen Bereich des Versuchs werden in dem Vergleich der Methoden betrachtet. Die Ergebnisse finden Sie unten.

A. Celiac G+ vs. anderes Gliadin Peptide Antikörper Kit:

		Andere Gliadin IgA ELISA		
		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	54	27	81
CELIAC G+	Negativ	7	68	75
IgA ELISA	Gesamt	61	95	156
Positiv Prozentsatz Übereinstimmung:		88,5% (95% CI 77,2% - 94,9%)		
Negativ Prozentsatz Übereinstimmung:		71,6% (95% CI 61,3% - 80,1%)		
Gesamt Prozentsatz Übereinstimmung:		78,2% (95% CI 70,8% - 84,3%)		