



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 



ImmuLisa™ AGA Enhanced ELISA

Gliadin IgA or IgG Antibody ELISA

IVD For *in vitro* diagnostic use
CLIA Complexity: High
CDC Analyte Identification Code: 0528
CDC Test System Identification Code: 28513/28514

PRODUCT INSERT

| | | | |
|------------|-------|---------------|-------------------|
| REF | 5117A | AGA IgA ELISA | 96 Determinations |
| REF | 5117G | AGA IgG ELISA | 96 Determinations |

INTENDED USE

Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) for the detection and semi-quantitation of IgA or IgG anti-gliadin antibodies in human serum to aid in the diagnosis of patients with celiac disease and dermatitis herpetiformis.

SUMMARY AND EXPLANATION

Gluten sensitive enteropathy (GSE), i.e. celiac disease (CD) and dermatitis herpetiformis (DH), is a common clinically heterogenous gastrointestinal disorder with sensitivity to gluten, and can exhibit with non-classic or minimal symptoms.¹ There is some genetic component associated with GSE which is illustrated by showing, that approximately 5-10% of first degree relatives have symptomatic or asymptomatic CD. Children with short stature and patients with insulin dependent diabetes and other autoimmune disorders also demonstrate a greater likelihood of developing GSE. Strict avoidance of gluten in the diet is recommended to control the disease activity and early diagnosis in such patients may improve their overall prognosis.²

Published literature suggests the use of serological testing for patients suspected of GSE and to monitor dietary compliance.³⁻⁶ The European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) has recommended the inclusion of various serological tests to reduce the number of intestinal biopsies needed to make a diagnosis.⁷ These include tests for anti-gliadin (AGA), anti-reticulín (ARA) and anti-endomysial (EMA) antibodies. Of these, AGA have been studied the most.⁸⁻²⁰ Using ELISA, both IgA and IgG class AGA are detected in sera of patients with GSE. Of these, IgG class AGA seem more sensitive but less specific indicators of GSE than IgA class AGA. IgA class AGA on the other hand are less sensitive but more specific for GSE.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

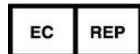
Gliadin antigen is bound to the wells of a polystyrene microwell plate followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Controls, calibrators and diluted patient sera are added to separate wells, allowing any gliadin antibodies present to bind to the immobilized antigen. Unbound sample is washed away and an enzyme labeled anti-human IgA or IgG conjugate is added to each well. These enzyme conjugated antibodies bind specifically to the human immunoglobulin of the appropriate class. After washing away any

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



EMERGO Europe
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com

SEP2012
Document No. PI5117

unbound conjugate, specific enzyme substrate (TMB) is then added to the wells. After stopping the enzymatic reaction, the intensity of 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).

REAGENTS

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. 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.²¹

Stop Solution is a dilute sulfuric acid solution. Sulfuric acid (H₂SO₄) is poisonous and corrosive. Do not ingest and avoid contact with skin and eyes. Avoid exposure to bases, metals or other compounds that may react with acids.

TMB Enzyme Substrate contains an irritant that may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. Do not ingest and avoid contact with skin and eyes.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources. 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

ImmuLisa™ AGA IgA ELISA

REF 5117A

ImmuLisa™ AGA IgG ELISA

REF 5117G

Kits contains sufficient reagents to perform 96 determinations.

| | | |
|--------------------|-----------------------|---|
| 12 x 8 | MICROPLATE AGA | Microplate with individual breakaway microwells. Coated with gliadin antigen. Ready for use. |
| 1 x 1.75 ml | CONTROL+ AGA-A | Ready to use Positive Control (red cap) for REF 5117A. 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+ AGA-G | Ready to use Positive Control (red cap) for REF 5117G. 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. |

EFERENCES • ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ • BIBLIOGRAFÍA • REFERENZEN • REFERENCES • BIBLIOGRAFIA • REFERÊNCIAS

- Pare P, Douville P, Coron D, et al. Adult celiac sprue: changes in the pattern of clinical recognition. *J Clin Gastroenterol*; 10:395-400, 1988.
- Hall MJ, Cooper BT, Rooney H et al. Coeliac disease and malignancy of the duodenum: diagnosis by endoscopy, successful treatment of malignancy and response to gluten free diet. *Gut* 32:90-92, 1991.
- Rautonen J, Rautonen N and Saufihti E. Antibodies to gliadin in children with celiac disease. *Acta Paediatr Scand*; 1991, 80:1200-1205.
- Bürgin-Wolff A, Lentze MJ. Relation of anti-gliadin antibodies to gluten sensitive enteropathy B. Diagnostic significance of antibodies against gliadin in celiac disease in children. In serologic diagnosis of celiac disease eds. Chorzelski TP, Beutner EH, Kumar V and Zalewski TP. CRC Press, Boca Raton FL, 1990 pp. 59-75.
- Lerner A, Kumar V, Iancu TC. Immunological diagnosis of childhood coeliac disease: comparison between antigliadin, antireticulin and antiendomysial antibodies. *Clin Exp Immunol*; 1994, 95:78-82.
- Patinen P, Björkstén F, Malmström M et al. Salivary and serum antigliadin antibodies in dermatitis herpetiformis. *Eur J Oral Sci*; 1995, 103.
- Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, et al. Revised criteria for diagnosis of celiac disease. Report of working group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* 1990; 65:909-911.
- Savilahti E, Perkkio M, Kalimo K, et al. IgA antigliadin antibodies: a marker of mucosal damage in childhood celiac disease. *Lancet* 1973; i:320-322.
- Kumar V, Jain N, Lerner A, Beutner EH, Chorzelski TP, Lebenthal E. Comparative studies of different gliadin preparations in detecting antigliadin antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986; 5:730-734.
- Montgomery AMP, Goka AKJ, Kumar PJ, et al. Low gluten diet in the treatment of adult coeliac disease: effect on jejunal morphology and serum anti-gluten antibodies. *Gut* 1988; 29:1564-1568.
- Weiss JB, Austin RK, Schanfield MS, et al. Gluten-sensitive enteropathy. IgG heavy-chain (Gm) allotypes and the immune response to wheat gliadin. *J Clin Invest* 1983; 72:96-101.
- Mearin ML, Konincox CR, Biemond I, et al. Influence of genetic factors on the serum levels of antigliadin antibodies in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3:373-377.
- Levenson SD, Austin RK, Dietler MD, et al. Specificity of antigliadin antibody in celiac disease. *Gastroenterology* 1985; 89:1-5.
- Lerner A, Lebenthal E. The controversy of antigliadin antibody (AGA) as a diagnostic tool in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 12:407-409.
- Lebenthal E, Heitlinger LA. Gliadin antibodies in celiac disease. *J Pediatr* 1983; 102:711-712.
- Kumar V, Lerner A, Jain N, Beutner EH. Are antigliadin antibodies specific for celiac disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3:815.
- Tucker NT, Barghuthy FS, Prihoda TJ, Kumar V, Lerner A, Lebenthal E. Antigliadin antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay as a marker of childhood celiac disease. *J Pediatr* 1988; 113:286-289.
- Unsworth DJ, Kieffer M, Holborow EJ, et al. IgA anti-gliadin antibodies in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1981; 46:286-293.
- Bürgin-Wolff A, Bertele RM, Berger R et al. A reliable screening test for childhood celiac disease: fluorescent immunosorbent test for gliadin antibodies. A prospective multicenter study. *J Pediatr* 1983; 102:655-660.
- Kelly J, O'Farrelly C, Rees JPR, et al. Humoral response to alpha gliadin as serological screening test for coeliac disease. *Arch Dis Child* 1987; 62:469-473.
- Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health; 1993 (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
- Unsworth DJ. Serological diagnosis of gluten sensitive enteropathy. *J Clin Pathol*, 1996, 49:704-711.

PT

| IgA | Intervalo de Teste | Desvio (95% CI) | Interseção-Y (95% CI) | R ² | % Recuperação (Obtida/Prevista) |
|-----|--------------------|-------------------------|-----------------------|----------------|---------------------------------|
| | 1,2 a 41,6 | 1,03 (0,959 a 1,109) | 0,4 (-1,4 a 2,2) | 0,995 | 95% a 110% |
| | 2,3 a 101,6 | 1,05 (0,929 a 1,168) | 2,2 (-4,6 a 9,0) | 0,987 | (-109% a 115%) |
| | 4,7 a 273,4 | 0,95 (0,887 a 1,014) | 3,0 (-7,8 a 13,8) | 0,996 | 93% a 114% |

| IgG | Intervalo de Teste | Desvio (95% CI) | Interseção-Y (95% CI) | R ² | % Recuperação (Obtida/Prevista) |
|-----|--------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|---------------------------------|
| | 2,7 a 47,0 | 0,97 (0,891 a 1,040) | 0,89 (-1,3 a 3,1) | 0,994 | 94% a 117% |
| | 12,8 a 116,8 | 0,95 (0,957 a 1,046) | -0,24 (-7,5 a 7,0) | 0,991 | 90% a 96% |
| | 96,8 a 227,0 | 0,96 (0,776 a 1,141) | -6,69 (-39,8 a 26,4) | 0,965 | 87% a 92% |

Interferência

A interferência foi estudada misturando o soro com níveis conhecidos de anticorpos anti-gliadina para cada isótipo com amostras de soro potencialmente interferentes e estudando o desvio dos resultados previstos. Não foi demonstrada qualquer interferência significativa para as seguintes substâncias nos níveis indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 µmol/L), Fator reumatoide (100 UE/ml), Triglicéridos (37 mmol/L), e Colesterol (13 mmol/L).






EN

| | | |
|--------------------|---|--|
| 5 x 1.75 ml | CALIBRATOR A AGA-A CALIBRATOR B AGA-A CALIBRATOR C AGA-A CALIBRATOR D AGA-A CALIBRATOR E AGA-A | Ready to use set of 5 Calibrators for REF 5117A. 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 AGA IgA. Concentrations in EU/ml are printed on the labels. |
| 5 x 1.75 ml | CALIBRATOR A AGA-G CALIBRATOR B AGA-G CALIBRATOR C AGA-G CALIBRATOR D AGA-G CALIBRATOR E AGA-G | Ready to use set of 5 Calibrators for REF 5117G. 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 AGA IgG. Concentrations in EU/ml are printed on the labels. |
| 1 x 15 ml | IgA-CONJ HRP | HRP goat anti-human IgG Conjugate for REF 5117A. Ready for use. Color coded pink. |
| 1 x 15 ml | IgG-CONJ HRP | HRP goat anti-human IgG Conjugate for REF 5117G. Ready for use. Color coded pink. |
| 1 x 60 ml | DIL | Serum Diluent. Ready for use. Color coded blue. |
| 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 60 ml | BUF WASH | Liquid concentrated Wash Buffer. Reconstitute to one liter. |
|------------------|-----------------|--|

Symbols used on labels

| | |
|---|------------------------------|
| LOT | Lot number |
| REF | Catalog number |
| IVD | 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

EN

- 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. Avoid repeated freezing and thawing of samples. It is recommended that frozen specimens be tested within one year.

PROCEDURE

Procedural Notes

- Carefully read the product insert before starting the assay.
- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. 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.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- **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

PT

| | | | | | |
|-----------------|-----|---|------|---|-------|
| Doença de Crohn | 15 | 1 | 6,7% | 2 | 13,3% |
| Total | 180 | 5 | 2,8% | 7 | 3,9% |

Precisão

A precisão foi testada com amostras positivas selecionadas ao longo de todo o intervalo do ensaio. Foram conduzidos ensaios a 6 réplicas de cada amostra durante 13 dias. A repetibilidade foi determinada com 12 réplicas de cada amostra. Os resultados são apresentados em seguida.

| AGA IgA | S # | Média (UE/ml) | Imprecisão Total | | Entre dias | | No ensaio (Repetibilidade) | |
|------------|-----|------------------|------------------|------|---------------|------|-------------------------------|------|
| | | | SD (UE/ml) | CV% | SD (UE/ml) | CV% | SD (UE/ml) | CV% |
| | 1 | 10,4 | 0,536 | 5,2% | 0,559 | 5,4% | 0,251 | 2,4% |
| | 2 | 15,8 | 0,725 | 4,6% | 0,766 | 4,8% | 0,281 | 1,8% |
| | 3 | 24,5 | 1,872 | 7,6% | 1,949 | 8,0% | 1,266 | 5,1% |
| | 4 | 45,9 | 1,700 | 3,7% | 1,680 | 3,7% | 1,269 | 2,7% |
| | 5 | 84,4 | 2,485 | 2,9% | 2,591 | 3,1% | 1,291 | 1,5% |
| | 6 | 116,3 | 5,932 | 5,1% | 6,174 | 5,3% | 2,653 | 2,2% |

| AGA IgG | S # | Média (UE/ml) | Imprecisão Total | | Entre dias | | No ensaio (Repetibilidade) | |
|------------|-----|------------------|------------------|-------|---------------|-------|-------------------------------|------|
| | | | SD (UE/ml) | CV% | SD (UE/ml) | CV% | SD (UE/ml) | CV% |
| | 1 | 9,3 | 0,846 | 9,1% | 0,892 | 9,6% | 0,429 | 4,6% |
| | 2 | 15,4 | 1,108 | 7,2% | 1,131 | 7,4% | 0,316 | 1,9% |
| | 3 | 24,4 | 2,461 | 10,1% | 2,615 | 10,7% | 0,801 | 3,3% |
| | 4 | 37,1 | 4,429 | 11,9% | 4,362 | 11,6% | 0,696 | 2,1% |
| | 5 | 63,1 | 8,408 | 13,3% | 8,177 | 12,7% | 4,027 | 7,4% |
| | 6 | 127,9 | 11,132 | 8,7% | 11,288 | 8,7% | 5,649 | 4,7% |

Reprodutibilidade

Foram realizadas 80 réplicas na série inferior negativa, perto do corte, na série positiva moderada, e aproximadamente +/-20% do corte do ensaio para determinar a reprodutibilidade qualitativa para cada isótipo AGA. Todas as amostras produziram um acordo qualitativo de 100%, exceto uma amostra de IgA com um valor de 24,4 UE/ml (acordo qualitativo 98%).

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 limite de detecção foi determinado como sendo 1,8 UE/ml para IgA e 3,7 UE/ml para IgG.

Linearidade e Recuperação

A linearidade e a recuperação foram testadas mediante diluição das amostras positivas através da série de ensaio em diluições equidistantes e comparando os resultados atuais e previstos. A série linear do ensaio foi determinada como 1,8 (LoD) – 160 UE/ml para IgA e 3,7 (LoD) – 160 UE/ml para IgG. Os resultados são seguidamente resumidos:

PT

| | | | | | |
|---------------------------------|-----|----|------|----|-------|
| Colite ulcerativa | 15 | 0 | 0,0% | 1 | 6,7% |
| Doença de Crohn | 15 | 1 | 6,7% | 2 | 13,3% |
| Soro humano normal pediátrico | 130 | 0 | 0,0% | 4 | 3,1% |
| Soro humano normal adulto | 139 | 7 | 5,0% | 6 | 4,3% |
| NHS Total | 269 | 7 | 2,6% | 10 | 3,7% |
| NHS Total e Controlo de Doenças | 449 | 12 | 2,7% | 17 | 3,8% |

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade do ELISA para Anticorpos Anti-gliadina ImmuLisa™ foi avaliada ao testar pacientes com doença celíaca a par de 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. ELISA AGA ImmuLisa™ vs. outros ELISAs AGA:

| | | Outro AGA IgA Ab ELISA | | |
|------------------------------|-------|------------------------|------------------------|-------|
| | | Pos | Neg | Total |
| IMMCO AGA IgA Ab ELISA | Pos | 87 | 24 | 111 |
| | Neg | 1 | 350 | 351 |
| | Total | 88 | 374 | 462 |
| Acordo Pos. | | 98,9% | (95% CI 92,9% - 99,9%) | |
| Acordo Neg. | | 93,6% | (95% CI 90,5% - 95,%) | |
| Acordo % Global | | 94,6% | (95% CI 90,7% - 95,3%) | |

| | | Outro Gliadina IgG Ab ELISA | | |
|------------------------------|-------|-----------------------------|------------------------|-------|
| | | Pos | Neg | Total |
| IMMCO AGA IgG Ab ELISA | Pos | 251 | 6 | 257 |
| | Neg | 3 | 156 | 159 |
| | Total | 254 | 162 | 416 |
| Acordo Pos. | | 98,8% | (95% CI 96,3% - 99,7%) | |
| Acordo Neg. | | 96,3% | (95% CI 91,8% - 98,5%) | |
| Acordo % Global | | 97,8% | (95% CI 95,9% - 98,9%) | |

B. Reatividade Cruzada: Foram selecionados um total de 160 indivíduos com doenças autoimunes com potencial de reatividade cruzada para testar os anticorpos anti-gliadina utilizando o teste ImmuLisa™. Os resultados são apresentados abaixo.

| Doença | n | Gliadina IgA | | Gliadina IgG | |
|-----------------------------|----|--------------|-------|--------------|-------|
| | | n Pos | % Pos | n Pos | % Pos |
| Artrite Reumatoide | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Tireoidite | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Lúpus eritematoso sistémico | 30 | 2 | 6,7% | 3 | 10,0% |
| Vasculite | 30 | 0 | 0,0% | 1 | 3,3% |
| Esclerose sistémica | 30 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| Colite ulcerativa | 15 | 0 | 0,0% | 1 | 6,7% |

EN

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 **500 µl** 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 450/630 nm 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

<10 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining units. While performing Qualitative determinations, the optical density of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser 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

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{Units of Calibrator D} = \text{Units of Test Sample}$$

It is recommended that qualitative results be reported as “positive” or “negative.” Sample results greater than or equal to Calibrator D are considered positive. Qualitative positive results should be confirmed with a semi-quantitative assay run to determine units and assess results in comparison with applicable reference ranges as indicated in **Interpretation**.

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 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, as indicated in **Limitations of Procedure**.

Interpretation

Interpretation values were determined by testing 64 normal blood donors and disease control specimens. The mean of these subjects plus 3SD was established as the assay cutoff and assigned an arbitrary value of 20 EU/ml. The following information serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values.

| 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.

a par de outros métodos laboratoriais, conforme indicado em **Limitações do Procedimento**.

Interpretação

Os valores de interpretação foram determinados testando 64 doadores de sangue normal e amostras de controlo de doença. A média destes indivíduos normais mais 3SD foi estabelecida como o corte do ensaio e foi atribuído um valor arbitrário de 20 UE/ml. A informação seguinte serve apenas como um guia para a interpretação dos resultados laboratoriais. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais.

| Valor Ab. Gliadina | Interpretação |
|--------------------|---------------------------------|
| <20 UE/ml | Negativo |
| 20-25 UE/ml | Indeterminado (Linha divisória) |
| >25 UE/ml | Positivo |

Calibrador

Os Calibradores prontos a usar são incluídos para determinar a semi-quantificação e devem ser utilizados em cada teste. As amostras dos doentes que contêm níveis de anticorpos mais elevados podem dar valores de absorvância mais elevados do que os do Calibrador A. Para determinar valores semi-quantitativos com precisão, essas amostras de soro devem ser mais diluídas, de modo a que entrem dentro do intervalo da curva do calibrador quando são novamente testadas. Para determinar as UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo fator de diluição.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Este teste não deve ser executado em amostras muito hemolisadas, com contaminação microbiológica ou lipémicas. Este método só deve ser utilizado para testar amostras de soro humano.

Os resultados obtidos servem apenas como uma ajuda ao diagnóstico, não devendo ser interpretados como diagnóstico por si só. Em pacientes com DC e deficiência de IgA, o AGA IgA pode ser negativo.

VALORES PREVISTOS

Os valores previstos para uma população normal são negativos. Contudo, verificou-se que indivíduos assintomáticos, aparentemente saudáveis, podem apresentar resultados positivos para anticorpos anti-gliadina IgA ou IgG.

Foram testados conjuntos de amostras clínicas nos ELISAs AGA Immulisa™. Os resultados que demonstram a incidência nas populações do presente estudo são fornecidos em seguida.

| Doença | n | Gliadina IgA | | Gliadina IgG | |
|---------------------------------------|-----|--------------|-------|--------------|-------|
| | | n Pos | % Pos | n Pos | % Pos |
| Doença Celíaca | 306 | 133 | 43,5% | 191 | 62,4% |
| Doença celíaca com deficiência de IgA | 64 | 0 | 0,0% | 63 | 98,4% |
| Doença celíaca pediátrica | 123 | 31 | 25,2% | 70 | 56,9% |
| Dermatite herpetiforme | 30 | 11 | 36,7% | 16 | 53,3% |
| Artrite Reumatoide | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Tireoidite | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Lúpus eritematoso sistémico | 30 | 2 | 6,7% | 3 | 10,0% |
| Vasculite | 30 | 0 | 0,0% | 1 | 3,3% |
| Esclerose sistémica | 30 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |

PT

- 9º Passo** Pipetar **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- 10º Passo** Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a uma 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 na adição do 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.

Controlo de Qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o branco de reagente devem ser executados em cada teste para verificar a integridade e a precisão desse teste. A leitura de absorvância do reagente branco deve ser <0,3. O calibrador deve ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário, deve-se repetir o teste. O controlo negativo deve ser <10 UE/ml. Se o teste for efetuado em duplicado, deve-se calcular a média das duas leituras para determinar as unidades. Quando se efetuam as determinações qualitativas, a densidade ótica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Nas determinações semi-quantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado no frasco.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras dos doentes podem ser determinadas por ambos os métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

----- X Unidades do Calibrador D = Unidades da Amostra de Teste

Abs. do Calibrador D

Recomenda-se que os resultados qualitativos sejam comunicados como "positivos" ou "negativos". Os resultados das amostras que forem superiores ou iguais aos do Calibrador D são considerados positivos. Os resultados qualitativos positivos devem ser confirmados com um teste semi-quantitativo para determinar as unidades e avaliar os resultados em comparação com os intervalos de referência aplicáveis, conforme indicado em **Interpretação**.

2. DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA

Registe a absorvância do Calibrador A ao E em relação às respetivas concentrações num papel milimétrico linear. Registe a concentração em UE/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e trace a curva mais lógica. Determine as concentrações das amostras dos doentes pela curva em relação ao seu valor de absorvância correspondente. Em alternativa, pode ser utilizada uma curva de quatro parâmetros para traçar a curva padrão.

Recomenda-se que os resultados semi-quantitativos sejam comunicados como "positivos," "negativos," ou "indeterminados" com valores unitários em UE/ml. Os resultados indeterminados/linha divisória devem ser novamente testados e avaliados

EN

LIMITATIONS OF PROCEDURE

This test should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only.

The results obtained serve only as an aid in the diagnosis and should not be interpreted as diagnostic in themselves. In IgA deficient CD patients IgA-AGA may be negative.

EXPECTED VALUES

The expected values in a normal population are negative. However, it has been determined that some apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive for IgA or IgG anti-gliadin antibodies.

Sets of clinical samples were tested on the Immulisa™ AGA ELISAs. Results demonstrating incidence in the populations for this study are provided below.

| Disease | n | Gliadin IgA | | Gliadin IgG | |
|-------------------------------|-----|-------------|-------|-------------|-------|
| | | n Pos | % Pos | n Pos | % Pos |
| Celiac disease | 306 | 133 | 43.5% | 191 | 62.4% |
| IgA Deficient Celiac disease | 64 | 0 | 0.0% | 63 | 98.4% |
| Pediatric Celiac disease | 123 | 31 | 25.2% | 70 | 56.9% |
| Dermatis herpetiformis | 30 | 11 | 36.7% | 16 | 53.3% |
| Rheumatoid Arthritis | 30 | 1 | 3.3% | 0 | 0.0% |
| Thyroiditis | 30 | 1 | 3.3% | 0 | 0.0% |
| Systemic lupus erythematosus | 30 | 2 | 6.7% | 3 | 10.0% |
| Vasculitis | 30 | 0 | 0.0% | 1 | 3.3% |
| Systemic sclerosis | 30 | 0 | 0.0% | 0 | 0.0% |
| Ulcerative Colitis | 15 | 0 | 0.0% | 1 | 6.7% |
| Crohn's disease | 15 | 1 | 6.7% | 2 | 13.3% |
| Pediatric Normal Human Sera | 130 | 0 | 0.0% | 4 | 3.1% |
| Adult Normal Human sera | 139 | 7 | 5.0% | 6 | 4.3% |
| Total NHS | 269 | 7 | 2.6% | 10 | 3.7% |
| Total NHS and Disease Control | 449 | 12 | 2.7% | 17 | 3.8% |

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the Immulisa™ Gliadin Antibody ELISA was evaluated by testing Celiac disease patients 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. Immulisa™ AGA ELISAs vs. other AGA ELISAs:

| | | Other AGA IgA Ab ELISA | | |
|---------------------------------------|-------|------------------------|------------------------|-------|
| | | Pos | Neg | Total |
| IMMCO AGA IgA Ab ELISA | Pos | 87 | 24 | 111 |
| | Neg | 1 | 350 | 351 |
| | Total | 88 | 374 | 462 |
| Pos Agreement | | 98.9% | (95% CI 92.9% - 99.9%) | |
| Neg Agreement | | 93.6% | (95% CI 90.5% - 95.8%) | |
| Overall % Agreement | | 94.6% | (95% CI 90.7% - 95.3%) | |

| | | Other Gliadin IgG Ab ELISA | | |
|---------------------------------------|-------|----------------------------|------------------------|-------|
| | | Pos | Neg | Total |
| IMMCO AGA IgG Ab ELISA | Pos | 251 | 6 | 257 |
| | Neg | 3 | 156 | 159 |
| | Total | 254 | 162 | 416 |
| Pos Agreement | | 98.8% | (95% CI 96.3% - 99.7%) | |
| Neg Agreement | | 96.3% | (95% CI 91.8% - 98.5%) | |
| Overall % Agreement | | 97.8% | (95% CI 95.9% - 98.9%) | |

B. Cross Reactivity: A total of 160 sera from individuals with other potentially cross-reactive autoimmune disorders were selected to test for gliadin antibodies using the Immulisa™ assay. The results appear below.

| Disease | n | Gliadin IgA | | Gliadin IgG | |
|------------------------------|-----|-------------|-------|-------------|-------|
| | | n Pos | % Pos | n Pos | % Pos |
| Rheumatoid Arthritis | 30 | 1 | 3.3% | 0 | 0.0% |
| Thyroiditis | 30 | 1 | 3.3% | 0 | 0.0% |
| Systemic lupus erythematosus | 30 | 2 | 6.7% | 3 | 10.0% |
| Vasculitis | 30 | 0 | 0.0% | 1 | 3.3% |
| Systemic sclerosis | 30 | 0 | 0.0% | 0 | 0.0% |
| Ulcerative Colitis | 15 | 0 | 0.0% | 1 | 6.7% |
| Crohn's disease | 15 | 1 | 6.7% | 2 | 13.3% |
| Total | 180 | 5 | 2.8% | 7 | 3.9% |

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 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 as 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 Para uma **determinação qualitativa** use exclusivamente o Calibrador D (*frasco com a tampa amarela*).

ou

Para uma **determinação semi-quantitativa**, use os Calibradores A a E, como descrito no esquema das amostras abaixo.

| | Determinação Qualitativa | | | Determinação Semi-Quantitativa | | | |
|---|--------------------------|-----|------|--------------------------------|--------|----|------|
| A | Branca | S5 | Etc. | A | Branca | 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 |

4º Passo Prepare uma diluição **1:101** das amostras dos pacientes, misturando **5 µl** do soro do paciente com **500 µl** de Diluente do 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 Deite com uma pipeta **100 µl** de Calibradores prontos a usar, Controlo Positivo e Negativo e amostras dos doentes diluídas (**1:101**) nos micropoços respetivos como indicado na folha de protocolo.

Nota: Incluir um poço que contenha **100 µl** de 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 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.

Símbolos utilizados nos rótulos

| | |
|--|------------------------------------|
|  | Número de lote |
|  | Número de catálogo |
|  | Utilização em diagnóstico in vitro |
|  | Utilização por |
|  | Temperatura de armazenamento |
|  | Ler as instruções de utilização |
|  | 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 pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 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 à disposição 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 devem 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. Recomenda-se que as amostras congeladas sejam testadas no prazo de um ano.

PROCEDIMENTO**Notas sobre o procedimento**

- Ler cuidadosamente o folheto do produto 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. Voltar a colocar todas as amostras e reagentes não usados no frigorífico 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.
- Todas as diluições das amostras do paciente devem ser preparadas antes de se iniciar o ensaio.
- **Uma boa técnica de lavagem é fundamental.** Se a lavagem for realizada manualmente, consegue-se uma lavagem adequada direcionando o fluxo energético do tampão de lavagem por toda a microplaca, através de um frasco de lavagem de

Precision

Precision was tested with positive specimens selected throughout the range of the assay. Assay runs of 6 replicates of each specimen were conducted on 13 days. Repeatability was determined with 12 replicates of each specimen. Results are shown below.

| AGA IgA | S # | Mean (EU/ml) | Total Imprecision | | Between days | | Within run (Repeatability) | |
|------------|-----|-----------------|-------------------|------|---------------|------|-------------------------------|------|
| | | | SD (EU/ml) | CV% | SD (EU/ml) | CV% | SD (EU/ml) | CV% |
| | 1 | 10.4 | 0.536 | 5.2% | 0.559 | 5.4% | 0.251 | 2.4% |
| | 2 | 15.8 | 0.725 | 4.6% | 0.766 | 4.8% | 0.281 | 1.8% |
| | 3 | 24.5 | 1.872 | 7.6% | 1.949 | 8.0% | 1.266 | 5.1% |
| | 4 | 45.9 | 1.700 | 3.7% | 1.680 | 3.7% | 1.269 | 2.7% |
| | 5 | 84.4 | 2.485 | 2.9% | 2.591 | 3.1% | 1.291 | 1.5% |
| | 6 | 116.3 | 5.932 | 5.1% | 6.174 | 5.3% | 2.653 | 2.2% |

| AGA IgG | S # | Mean (EU/ml) | Total Imprecision | | Between days | | Within run (Repeatability) | |
|------------|-----|-----------------|-------------------|-------|---------------|-------|-------------------------------|------|
| | | | SD (EU/ml) | CV% | SD (EU/ml) | CV% | SD (EU/ml) | CV% |
| | 1 | 9.3 | 0.846 | 9.1% | 0.892 | 9.6% | 0.429 | 4.6% |
| | 2 | 15.4 | 1.108 | 7.2% | 1.131 | 7.4% | 0.316 | 1.9% |
| | 3 | 24.4 | 2.461 | 10.1% | 2.615 | 10.7% | 0.801 | 3.3% |
| | 4 | 37.1 | 4.429 | 11.9% | 4.362 | 11.6% | 0.696 | 2.1% |
| | 5 | 63.1 | 8.408 | 13.3% | 8.177 | 12.7% | 4.027 | 7.4% |
| | 6 | 127.9 | 11.132 | 8.7% | 11.288 | 8.7% | 5.649 | 4.7% |

Reproducibility

80 replicates of samples in the low negative range, near the cutoff, in the moderate positive range, and approximately +/-20% of the assay cutoffs for each AGA isotype were performed to determine qualitative reproducibility. All specimens produced 100% qualitative agreement, with the exception of one IgA sample with a value of 24.4 EU/ml (98% qualitative agreement).

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 was determined to be 1.8 EU/ml for IgA and 3.7 EU/ml for IgG.

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 assay was determined be 1.8 (LoD) – 160 EU/ml for IgA and 3.7(LoD) – 160 EU/ml for IgG. Results are summarized below.

| IgA | Test Range (EU/ml) | Slope (95% CI) | Y-intercept (95% CI) | R ² | % Recovery (Obtnd/Expctd) |
|-----|-----------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|------------------------------|
| | 1.2 to 41.6 | 1.03 (.959 to 1.109) | 0.4 (-1.4 to 2.2) | 0.995 | 95% to 110% |
| | 2.3 to 101.6 | 1.05 (.929 to 1.168) | 2.2 (-4.6 to 9.0) | 0.987 | 109% to 115% |
| | 4.7 to 273.4 | 0.95 (.887 to 1.014) | 3.0 (-7.8 to 13.8) | 0.996 | 93% to 114% |

EN

| IgG | Test Range (EU/ml) | Slope (95% CI) | Y-intercept (95% CI) | R ² | % Recovery (Obtnd/Expctd) |
|-----|--------------------|-------------------------|--------------------------|----------------|---------------------------|
| | 2.7 to 47.0 | 0.97 (.891 to 1.040) | 0.89 (-1.3 to 3.1) | 0.994 | 94% to 117% |
| | 12.8 to 116.8 | 0.95 (.957 to 1.046) | -0.24 (-7.5 to 7.0) | 0.991 | 90% to 96% |
| | 96.8 to 227.0 | 0.96 (.776 to 1.141) | -6.69 (-39.8 to 26.4) | 0.965 | 87% to 92% |

Interference

Interference was studied by mixing sera with known gliadin antibody levels for each isotype with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. No significant interference was demonstrated for the following substances at the levels indicated: Hemoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 µmol/L), Rheumatoid Factor (100 EU/ml), Triglycerides (37 mmol/L), and Cholesterol (13 mmol/L).

PT

1 x 1,75 ml **CONTROL-**

5 x 1,75 ml **CALIBRATOR|A|AGA-A**
CALIBRATOR|B|AGA-A
CALIBRATOR|C|AGA-A
CALIBRATOR|D|AGA-A
CALIBRATOR|E|AGA-A

5 x 1,75 ml **CALIBRATOR|A|AGA-G**
CALIBRATOR|B|AGA-G
CALIBRATOR|C|AGA-G
CALIBRATOR|D|AGA-G
CALIBRATOR|E|AGA-G

1 x 15 ml **IgA-CONJ|HRP**

1 x 15 ml **IgG-CONJ|HRP**

1 x 60 ml **DIL**

1 x 15 ml **SUBSTRATE|TMB**

1 x 15 ml **STOP|H2SO4**

2 x frascos **BUF|WASH**

1 x

Componentes Opcionais

1 x 60 ml **BUF|WASH**

positivo para anticorpos anti-gliadina IgG. A faixa de concentração prevista em UE/ml está impressa na etiqueta.

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

Conjunto de 5 Calibradores prontos a utilizar para **REF** 5117A. Calibrador A (tampa verde) 160 UE/ml, Calibrador B (tampa violeta) 80 UE/ml, Calibrador C (tampa azul) 40 UE/ml, Calibrador D (tampa amarela) 20 UE/ml, e Calibrador E (tampa laranja) 1 UE/ml. Derivado do soro humano contendo AGA IgA. As concentrações em UE/ml estão impressas nas etiquetas.

Conjunto de 5 Calibradores prontos a utilizar para **REF** 5117G. Calibrador A (tampa verde) 160 UE/ml, Calibrador B (tampa violeta) 80 UE/ml, Calibrador C (tampa azul) 40 UE/ml, Calibrador D (tampa amarela) 20 UE/ml, e Calibrador E (tampa laranja) 1 UE/ml. Derivado do soro humano contendo AGA IgG. As concentrações em UE/ml estão impressas nas etiquetas.

Conjugado HRP de cabra IgG anti-humano para **REF** 5117A. Pronto a utilizar, Código de cor rosa.

Conjugado HRP de cabra IgG anti-humano para **REF** 5117G. Pronto a utilizar. Código de cor rosa.

Diluinte de Soro. Pronto a utilizar. Código de cor azul.

Substrato enzimas TMB. Pronto a utilizar, **Proteger da luz.**

Solução de Paragem. Pronto a utilizar.

Tampão de lavagem de pó **Reconstituir para um litro cada.**

Folhas de Protocolo

Tampão de Lavagem líquido concentrado. **Reconstituir para um litro.**

permitindo que quaisquer anticorpos anti-gliadina presentes se liguem ao antigénio imobilizado. A amostra não ligada é lavada, sendo adicionado um conjugado enzimático anti IgA ou IgG anti-humano marcado a cada poço. Estes anticorpos conjugados com enzimas fixam-se especificamente à imunoglobulina humana da classe apropriada. Após lavar qualquer conjugado não ligado, o substrato enzimático específico (TMB) é então adicionado aos poços: Após interromper a reação enzimática, a intensidade da mudança de cor, que é proporcional à concentração de anticorpos, é lida por um espectrofotómetro a 450 nm. Os resultados são expressos em unidades ELISA por mililitro (UE/ml).

REAGENTES

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congele.** Os reagentes permanecerão estáveis até à data de validade, quando armazenados e manuseados conforme indicado.

Não utilize o reagente se estiver límpido ou se apresentar um precipitado. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20 a 25 °C) antes do uso.

Reconstitua o tampão de lavagem em 1 litro com água destilada ou desionizada. Quando conservado entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído permanecerá estável até à data de validade do kit.

As tiras de micropoços revestidos só devem ser usadas uma vez. As tiras de micropoços não utilizadas devem ser cuidadosamente novamente seladas na bolsa que contém os dessecativos, a fim de prevenir a condensação e armazenadas entre 2 a 8 °C.

Precauções

Todos os componentes de origem humana usados foram testados para HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram resultado negativo pelos testes exigidos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e as amostras dos doentes devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Siga as boas práticas de laboratório em relação à conservação, distribuição e eliminação destes materiais.²¹

A solução de paragem consiste numa solução de ácido sulfúrico diluído. O ácido sulfúrico (H₂SO₄) é venenoso e corrosivo. Não ingerir e evitar o contacto com a pele e olhos. Evitar a exposição a bases, metais ou outros compostos que possam reagir com os ácidos.

O Substrato Enzimático TMB contém um irritante que pode ser prejudicial se for inalado, ingerido ou absorvido pela pele. Não ingerir e evitar o contacto com a pele e olhos.

Para garantir resultados válidos deve seguir-se com rigor as instruções descritas neste folheto informativo do kit. Não trocar os componentes do kit por outros de origens diferentes. Respeite as normas laboratoriais em vigor para reduzir a possibilidade de contaminação microbiana ou cruzada dos reagentes durante o manuseamento. Não usar os componentes do kit após a data de validade indicada no rótulo.

Materiais fornecidos

ImmuLISA™ AGA IgA ELISA

[REF] 5117A

ImmuLISA™ AGA IgG ELISA

[REF] 5117G

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8

[MICROPLATE|AGA]

Microplaca com poços individuais separados. Revestida com antígeno de gliadina. Pronta a utilizar.

1 x 1,75 ml

[CONTROL|+|AGA-A]

Controlo Positivo (tampa vermelha) pronto a utilizar para **[REF]** 5117A. Contém soro humano positivo para anticorpos anti-gliadina IgA. A faixa de concentração prevista em UE/ml está impressa na etiqueta.

1 x 1,75 ml

[CONTROL|+|AGA-G]

Controlo Positivo (tampa vermelha) pronto a utilizar para **[REF]** 5117G. Contém soro humano



ImmuLISA™

AGA Enhanced ELISA

Έλεγχος ELISA για Αντισώματα Γλιαδίνης IgA ή IgG

[IVD] Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

CLIA Πολυπλοκότητα: Υψηλή

CDC Κωδικός Ταυτοποίησης Αναλύτη: 0528

CDC Κωδικός ταυτοποίησης Συστήματος Ελέγχου: 28513/28514

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

[REF] 5117A AGA IgA ELISA

96 Προσδιορισμοί

[REF] 5117G AGA IgG ELISA

96 Προσδιορισμοί

ΣΚΟΠΟΥΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Οι δοκιμασίες ενζυμικής ανοσοαπορρόφησης (ELISA) για την ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό αντιγλιαδινικών αντισωμάτων IgA ή IgG σε ανθρώπινο ορό ως βοήθημα στη διάγνωση ασθενών με κοιλιοκάκη και ερπητοειδή δερματίτιδα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Η εντεροπάθεια από ευαισθησία στη γλουτένη (GSE), δηλ. η κοιλιοκάκη και η ερπητοειδής δερματίτιδα, είναι μια συνήθης κλινικά ετερογενής γαστρεντερική διαταραχή με ευαισθησία στη γλουτένη, και μπορεί να παρουσιασθεί με μη κλασικά ή ελάχιστα συμπτώματα.¹ Υπάρχει κάποιο γενετικό συστατικό συνυφασμένο με την GSE το οποίο απεικονίζεται δείχνοντας, ότι περίπου 5-10% των συγγενών πρώτου βαθμού έχουν συμπτωματική ή ασυμπτωματική κοιλιοκάκη. Παιδιά με χαμηλό παράστημα και ασθενείς με ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη και άλλες αυτοάνοσες διαταραχές επίσης επιδεικνύουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν GSE. Συνιστάται αυστηρή αποφυγή της γλουτένης στη διατροφή για τον έλεγχο της δραστηριότητας της νόσου και την έγκαιρη διάγνωση σε αυτούς τους ασθενείς ενδέχεται να βελτιώσει την γενική τους πρόγνωση.²

Η εκδοθείσα βιβλιογραφία προτείνει τη χρήση ορολογικού ελέγχου για ασθενείς στους οποίους υπάρχει υποψία ότι έχουν GSE και την παρακολούθηση της διατροφικής συμμόρφωσης.³⁻⁶ Η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Παιδιατρικής Γαστρεντερολογίας και Διατροφής (ESPGAN) έχει συστήσει την συμπερίληψη διάφορων ορολογικών ελέγχων για τη μείωση του αριθμού των εντερικών βιοψιών που χρειάζονται για να γίνει η διάγνωση.⁷ Αυτές περιλαμβάνουν ελέγχους για αντισώματα έναντι γλιαδίνης (AGA), έναντι ρετικουλίνης (ARA) και έναντι ενδομυΐου (EMA). Από αυτά, τα AGA έχουν μελετηθεί περισσότερο.⁸⁻²⁰ Με τη χρήση της μεθόδου ELISA, τόσο τα AGA κατηγορίας IgA και IgG ανιχνεύονται σε ορούς ασθενών με GSE. Από αυτά, τα AGA κατηγορίας IgG φαίνονται πιο ευαίσθητα αλλά λιγότερο συγκεκριμένοι δείκτες της GSE από τα AGA κατηγορίας IgA. Τα AGA κατηγορίας IgA αφ' ετέρου είναι λιγότερο ευαίσθητα αλλά περισσότερο συγκεκριμένα για GSE.

ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Το αντιγόνο γλιαδίνης δεσμεύεται στα κοιλώματα μιας μικροπλάκας πολυστυρενίου και στη συνέχεια μπλοκάρει τις μη αντιδρώσες τοποθεσίες για να μειωθεί η μη συγκεκριμένη δέσμευση. Οι Έλεγχοι, οι βαθμονομητές και οι αραιωμένοι οροί των ασθενών προστίθενται

για να ξεχωρίσουν τα κοιλώματα, επιτρέποντας σε οιαδήποτε παρόντα αντισώματα γλιαδίνης να δεσμεύονται στο ακινητοποιημένο αντιγόνο. Το δείγμα που δεν δεσμεύεται αφαιρείται με την πλύση και ενζυμικής σήμανσης ανθρώπινη σύζευξη αντι-IgA ή -IgG προστίθεται σε κάθε κοιλότητα. Αυτά τα συζευγμένα με ένζυμο αντισώματα δεσμεύονται ειδικά στην ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη της αντίστοιχης τάξης. Η αδέσμευτη σύζευξη με ενζυμική σήμανση απομακρύνεται με την πλύση. Συγκεκριμένο υπόστρωμα ενζύμου (TMB) προστίθεται στη συνέχεια στις κοιλότητες. Μετά τη διακοπή της ενζυμικής αντίδρασης, η ακεραιότητα της χρωματικής αλλαγής, η οποία είναι ανάλογη με την πυκνότητα του αντισώματος, διαβάζεται με ένα φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αποθηκεύστε όλα τα αντιδραστήρια στους 2-8°C. **Μην καταψύχετε.** Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά έως την ημερομηνία λήξης όταν αποθηκεύονται και χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες.

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

Ανασυνθέστε το διάλυμα πλύσης στο 1 λίτρο με απεσταγμένο ή αποιοντισμένο 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 βυθισμάτων θα πρέπει να επανασφραγίζονται προσεκτικά στη σακούλα που περιέχει αποξηραντικές ουσίες ώστε να αποτρέπεται η συμπύκνωση και να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C.

Προφυλάξεις

Όλα τα προερχόμενα από τον άνθρωπο συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν έχουν ελεγχθεί για HBsAg, HCV, HIV-1 και 2 και HTLV-I και βρέθηκαν αρνητικά σύμφωνα με ελέγχους που απαιτούνται από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Ωστόσο, παράγωγα ανθρώπινου αίματος και δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά. Τηρείτε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για την αποθήκευση, χορήγηση και διάθεση των παραπάνω υλικών.²¹

Το Διάλυμα Παύσης είναι διάλυμα αραιωμένου θειικού οξέως. Το θειικό οξύ (H₂SO₄) είναι δηλητηριώδες και διαβρωτικό. Μην το φάτε και αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Αποφύγετε τη έκθεση σε βάσεις, μέταλλα ή άλλες ενώσεις που μπορεί να αντιδρούν με οξέα.

Το Υπόστρωμα Ενζύμου TMB περιέχει μια ερεθιστική ουσία που μπορεί να είναι επιβλαβής αν την εισπνεύσετε, την φάτε ή απορροφηθεί μέσω του δέρματος. Μην το φάτε και αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια.

Οι οδηγίες θα πρέπει να τηρούνται ακριβώς όπως εμφανίζονται στο ένθετο του παρόντος kit για να διασφαλιστούν έγκυρα αποτελέσματα. Μην ανταλλάσσετε στοιχεία του kit με στοιχεία από άλλες πηγές. Τηρήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιήσετε τη μικροβιακή και διασταυρούμενη μόλυνση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιείτε. Μην χρησιμοποιείτε στοιχεία του kit μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

Υλικά που παρασχέθηκαν

ImmuLisa™ AGA IgA ELISA

REF 5117A

ImmuLisa™ AGA IgG ELISA

REF 5117G

Τα kit περιέχουν επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.



ImmuLisa™

AGA Enhanced ELISA

ELISA para Anticorpos Anti-gliadina IgA ou IgG

IVD Para Utilização Diagnóstica *in vitro*

Complexidade CLIA: Elevada

Código de Identificação do Analito CDC: 0528

Código de Identificação do Sistema de Teste CDC: 28513/28514

FOLHETO DO PRODUTO

REF 5117A AGA IgA ELISA 96 Determinações

REF 5117G AGA IgG ELISA 96 Determinações

APLICAÇÃO

Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a detecção e semi-quantificação de anticorpos anti-gliadina IgA ou IgG em soro humano para ajudar no diagnóstico de pacientes com doença celíaca e dermatite herpetiforme.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A enteropatia sensível ao glúten (GSE), ou seja, a doença celíaca (DC) e a dermatite herpetiforme (DH), é um distúrbio gastrointestinal comum clinicamente heterogêneo com sensibilidade ao glúten, que pode apresentar sintomas não clássicos ou mínimos.¹ Existem alguns componentes genéricos associados à GSE, o que é demonstrado, revelando que aproximadamente 5-10% dos familiares em primeiro grau têm DC sintomática ou assintomática. As crianças de baixa estatura e os pacientes diabéticos insulino-dependentes e com outros distúrbios autoimunes demonstram igualmente uma grande probabilidade de vir a desenvolver a GSE. Recomenda-se evitar ao máximo uma dieta com glúten, a fim de controlar a atividade da doença, sendo que o diagnóstico precoce nesses pacientes poderá melhorar o seu prognóstico global.²

A literatura publicada sugere o uso de testes sorológicos para pacientes com suspeita de GSE e para a monitorização de conformidade dietética.³⁻⁶ A Sociedade Europeia de Gastrenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátricas (ESPGHAN) recomendou a inclusão de diversos testes sorológicos para reduzir o número de biópsias intestinais necessárias para a realização de um diagnóstico.⁷ Estes incluem testes para anticorpos anti-gliadina (AGA), anti-reticulina (ARA) e anti-endomísio (EMA). Destes, os AGA foram os mais estudados.⁸⁻²⁰ Utilizando o ELISA, são detetados AGA tanto da classe IgA como IgG em soro de pacientes com GSE. Destes, os AGA da classe IgG parecem ser indicadores mais sensíveis, embora menos específicos da GSE do que os AGA da classe IgA. Por outro lado, os AGA da classe IgA são menos sensíveis, embora sejam mais específicos para a GSE.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O antígeno gliadina é ligado aos poços de uma placa de micropoços de poliestireno, seguida do bloqueio dos locais não reagidos para reduzir a fixação não específica. Os controlos, os calibradores e o soro diluído do paciente são adicionados a poços separados,

Interferenza









L'interferenza è stata studiata mescolando siero con livelli noti di anticorpi gliadina per ogni isotipo con campioni di siero potenzialmente interferenti e studiando la deviazione dai risultati previsti. Non è stata dimostrata un'interferenza significativa per le seguenti sostanze ai livelli indicati: emoglobina (2 g/l), bilirubina (342 µmol/l), fattore reumatoide (100 UE/ml), trigliceridi (25 mmol/l) e colesterolo (13 mmol/L).

| | | |
|---------------------|--|---|
| 12 x 8 | MICROPLATE AGA | Μικροπλάκα με ατομικά βυθίσματα εκκίνησης (breakaway microwells). Επενδεδυμένημε αντιγόνο γλιαδίνης. Έτοιμη προς χρήση. |
| 1 x 1.75 ml | CONTROL+ AGA-A | Έτοιμος προς χρήση Θετικός Έλεγχος (Positive Control) (κόκκινο πώμα) για [REF] 5117A. Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα γλιαδίνης IgA. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε EU/ml αναγράφεται στην ετικέτα. |
| 1 x 1.75 ml | CONTROL+ AGA-G | Έτοιμος προς χρήση Θετικός Έλεγχος (Positive Control) (κόκκινο πώμα) για [REF] 5117G. Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα γλιαδίνης IgG. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε EU/ml αναγράφεται στην ετικέτα. |
| 1 x 1.75 ml | CONTROL- | Έτοιμος προς χρήση Αρνητικός Έλεγχος (Negative Control) (λευκό πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό. |
| 5 x 1.75 ml | CALIBRATOR A AGA-A CALIBRATOR B AGA-A CALIBRATOR C AGA-A CALIBRATOR D AGA-A CALIBRATOR E AGA-A | Έτοιμο προς χρήση σετ 5 Βαθμονομητών για [REF] 5117A. Βαθμονομητής Α (πράσινο πώμα) 160 EU/ml, Βαθμονομητής Β (μωβ πώμα) 80 EU/ml, Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 40 EU/ml, Βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 20 EU/ml και Βαθμονομητής Ε (πορτοκαλί πώμα) 1 EU/ml. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα AGA IgA. Συγκεντρώσεις σε EU/ml αναγράφονται στις ετικέτες. |
| 5 x 1.75 ml | CALIBRATOR A AGA-G CALIBRATOR B AGA-G CALIBRATOR C AGA-G CALIBRATOR D AGA-G CALIBRATOR E AGA-G | Έτοιμο προς χρήση σετ 5 Βαθμονομητών για [REF] 5117A. Βαθμονομητής Α (πράσινο πώμα) 160 EU/ml, Βαθμονομητής Β (μωβ πώμα) 80 EU/ml, Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 40 EU/ml, Βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 20 EU/ml και Βαθμονομητής Ε (πορτοκαλί πώμα) 1 EU/ml. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα AGA IgG. Συγκεντρώσεις σε EU/ml αναγράφονται στις ετικέτες. |
| 1 x 15 ml | IgA-CONJ HRP | Σύζευξη ορού ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης G από υπεροξειδάση από ραφανίδα για [REF] 5117A. Έτοιμη προς χρήση. Κωδικοποιημένο με ροζ χρώμα. |
| 1 x 15 ml | IgG-CONJ HRP | Σύζευξη ορού ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης G από υπεροξειδάση από ραφανίδα για [REF] 5117G. Έτοιμη προς χρήση. Κωδικοποιημένο με ροζ χρώμα. |
| 1 x 60 ml | DIL | Αραιωτικό ορού (Serum Diluent). Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένο με μπλε χρώμα. |
| 1 x 15 ml | SUBSTRATE TMB | Ενζυμο-υπόστρωμα τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB enzyme substrate). Έτοιμο προς χρήση. Προστατέψτε από το φως. |
| 1 x 15 ml | STOP H2SO4 | Διάλυμα παύσης (Stop Solution). Έτοιμο προς χρήση. |
| 2 x φιαλίδια 1 x | BUF WASH | Διάλυμα Πλύσης σε μορφή Σκόνης (Powder Wash Buffer). Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο έκαστο. Φύλλα Πρωτοκόλλου |

Προαιρετικά Συστατικά

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

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται σε ετικέτες

-  Αριθμός παρτίδας
-  Αριθμός καταλόγου
-  In vitro διαγνωστική χρήση
-  Χρήση έως
-  Θερμοκρασία αποθήκευσης
-  Διαβάστε οδηγίες πριν τη χρήση
-  Αριθμός δοκιμών
-  Κατασκευαστής

Υλικά Που Απαιτούνται Αλλά Δεν Παρέχονται

- Απιοντισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτο πλαστικό μπουκάλι για το αραιωμένο διάλυμα πλύσης
- Πιπέτες ικανές να απελευθερώνουν 5 μl έως 1.000 μl
- Ρύγχη πιπέτων (pipette tips) μιας χρήσεως
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες 12 x 75 mm και στηρίγματα δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομέτρης
- Απορροφητικές χάρτινες χειροπετσέτες
- Αναγνώστης μικροπλάκας ικανός για την ανάγνωση τιμών απορροφητικότητας στα 450 nm. Εάν είναι διαθέσιμος αναγνώστης μικροπλάκας διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να οριστεί στα 600-650 nm
- Αυτόματο πλυντήριο μικροπλάκας ικανό να διανέμει 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ 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 ελέγχονται εντός ενός έτους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Διαδικαστικές Σημειώσεις

- Διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος πριν ξεκινήσετε τη δοκιμασία.
- Αφήστε τα δείγματα ασθενών και τα αντιδραστήρια δοκιμασίας να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη της διαδικασίας δοκιμασίας. Βάζετε πίσω όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια που δεν χρησιμοποιήσατε στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση.
- Αφαιρείτε τις απαιτούμενες λωρίδες βυθισμάτων από τη σακούλα και προσεκτικά σφραγίζετε ξανά τη σακούλα για να αποφύγετε υγραποίηση στα μη χρησιμοποιηθέντα βυθίσματα. Βάζετε τη σακούλα πίσω στο ψυγείο αμέσως.

| AGA IgA | Imprecisione totale | | | Tra i giorni | | Nel ciclo (Riproducibilità) | |
|------------|---------------------|---------------|------|---------------|------|--------------------------------|------|
| | Mezzo (EU/ml) | SD (EU/ml) | CV% | SD (EU/ml) | CV% | SD (EU/ml) | CV% |
| S n. | | | | | | | |
| 1 | 10,4 | 0,536 | 5,2% | 0,559 | 5,4% | 0,251 | 2,4% |
| 2 | 15,8 | 0,725 | 4,6% | 0,766 | 4,8% | 0,281 | 1,8% |
| 3 | 24,5 | 1,872 | 7,6% | 1,949 | 8,0% | 1,266 | 5,1% |
| 4 | 45,9 | 1,700 | 3,7% | 1,680 | 3,7% | 1,269 | 2,7% |
| 5 | 84,4 | 2,485 | 2,9% | 2,591 | 3,1% | 1,291 | 1,5% |
| 6 | 116,3 | 5,932 | 5,1% | 6,174 | 5,3% | 2,653 | 2,2% |

| AGA IgG | Imprecisione totale | | | Tra i giorni | | Nel ciclo (Riproducibilità) | |
|------------|---------------------|---------------|-------|---------------|-------|--------------------------------|------|
| | Mezzo (EU/ml) | SD (EU/ml) | CV% | SD (EU/ml) | CV% | SD (EU/ml) | CV% |
| S n. | | | | | | | |
| 1 | 9,3 | 0,846 | 9,1% | 0,892 | 9,6% | 0,429 | 4,6% |
| 2 | 15,4 | 1,108 | 7,2% | 1,131 | 7,4% | 0,316 | 1,9% |
| 3 | 24,4 | 2,461 | 10,1% | 2,615 | 10,7% | 0,801 | 3,3% |
| 4 | 37,1 | 4,429 | 11,9% | 4,362 | 11,6% | 0,696 | 2,1% |
| 5 | 63,1 | 8,408 | 13,3% | 8,177 | 12,7% | 4,027 | 7,4% |
| 6 | 127,9 | 11,132 | 8,7% | 11,288 | 8,7% | 5,649 | 4,7% |

Riproducibilità

80 riproduzioni di campioni nell'intervallo negativo basso, vicino al limite, nell'intervallo positivo moderato e approssimativamente +/-20% dei limiti di dosaggio per ogni isotipo AGA sono stati eseguiti per determinare la riproducibilità qualitativa. Tutti i campioni hanno prodotto il 100% di accordo qualitativo, ad eccezione di un campione IgA con un valore di 24,4 EU/ml (98% di accordo qualitativo).

Limite di rilevazione

Il limite di rilevazione (LoD) è stato determinato in base a 60 riproduzioni del vuoto e 10 riproduzioni ognuno di 6 campioni (NHS) a basso livello. Il LoD è risultato essere 1,8 EU/ml per IgA e 3,7 EU/ml per IgG.

Linearità e ripresa

La linearità e la ripresa sono state testate diluendo campioni positivi nell'intervallo del dosaggio in diluizioni equidistanti e confrontando i risultati reali con quelli previsti. L'intervallo lineare del dosaggio è risultato essere 1,8 (LoD) – 160 EU/ml per IgA e 3,7(LoD) – 160 EU/ml per IgG. I risultati sono raccolti di seguito.

| IgA | Intervallo del test (EU/ml) | Pendenza (95% CI) | Segmento Y (95% CI) | R ² | % ripresa (Obtnd/Expctd) |
|-----|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|--------------------------|
| | da 1,2 a 41,6 | 1,03 (da 0,959 a 1,109) | 0,4 (da -1,4 a 2,2) | 0,995 | da 95% a 110% |
| | da 2,3 a 101,6 | 1,05 (da ,929 a 1,168) | 2,2 (da -4,6 a 9,0) | 0,987 | da 109% a 115% |
| | da 4,7 a 273,4 | 0,95 (da ,887 a 1,014) | 3,0 (da -7,8 a 13,8) | 0,996 | da 93% a 114% |
| IgG | Intervallo del test (EU/ml) | Pendenza (95% CI) | Segmento Y (95% CI) | R ² | % ripresa (Obtnd/Expctd) |
| | da 2,7 a 47,0 | 0,97 (da ,891 a 1,040) | 0,89 (da -1,3 a 3,1) | 0,994 | da 94% a 117% |
| | da 12,8 a 116,8 | 0,95 (da ,957 a 1,046) | -0,24 (da -7,5 a 7,0) | 0,991 | da 90% a 96% |
| | da 96,8 a 227,0 | 0,96 (da ,776 a 1,141) | -6,69 (da -39,8 a 26,4) | 0,965 | da 87% a 92% |

IT

A. ImmuLisa™ AGA ELISA vs. altri AGA ELISA:

| | | Altro AGA IgA Ab ELISA | | |
|---------------------------------------|--------|------------------------|------------------------|--------|
| | | Pos | Neg | Totale |
| IMMCO AGA IgA Ab ELISA | Pos | 87 | 24 | 111 |
| | Neg | 1 | 350 | 351 |
| | Totale | 88 | 374 | 462 |
| Accordo Pos | | 98,9% | (95% CI 92,9% - 99,9%) | |
| Accordo Neg | | 93,6% | (95% CI 90,5% - 95,8%) | |
| % accordo generale | | 94,6% | (95% CI 90,7% - 95,3%) | |

| | | Altra gliadina IgG Ab ELISA | | |
|---------------------------------------|--------|-----------------------------|------------------------|--------|
| | | Pos | Neg | Totale |
| IMMCO AGA IgG Ab ELISA | Pos | 251 | 6 | 257 |
| | Neg | 3 | 156 | 159 |
| | Totale | 254 | 162 | 416 |
| Accordo Pos | | 98,8% | (95% CI 96,3% - 99,7%) | |
| Accordo Neg | | 96,3% | (95% CI 91,8% - 98,5%) | |
| % accordo generale | | 97,8% | (95% CI 95,9% - 98,9%) | |

B. Reattività incrociata: Un totale di 160 sieri di individui con altri disordini autoimmuni potenzialmente con reattività incrociata sono stati selezionati per testare anticorpi gliadina usando il dosaggio ImmuLisa. I risultati compaiono di seguito.

| Malattia | n | Gliadina IgA | | Gliadina IgG | |
|-----------------------------|-----|--------------|-------|--------------|-------|
| | | n Pos | % Pos | n Pos | % Pos |
| Artrite reumatoide | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Tiroidite | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Lupus eritematoso sistemico | 30 | 2 | 6,7% | 3 | 10,0% |
| Vasculite | 30 | 0 | 0,0% | 1 | 3,3% |
| Sclerosi sistemica | 30 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| Colite ulcerosa | 15 | 0 | 0,0% | 1 | 6,7% |
| Morbo di Crohn | 15 | 1 | 6,7% | 2 | 13,3% |
| Totale | 180 | 5 | 2,8% | 7 | 3,9% |

Precisione

La precisione è stata testata con campioni positivi selezionati nell'intervallo del dosaggio. Cicli di dosaggio di 6 riproduzioni di ogni campione sono stati eseguiti in 13 giorni. La ripetibilità è stata determinata con 12 riproduzioni di ogni campione. I risultati sono mostrati di seguito.

EL

- Όλα τα διαλύματα των δειγμάτων του ασθενούς θα πρέπει να προετοιμάζονται πριν την έναρξη της δοκιμασίας.
- **Η τεχνική καλής πλύσης είναι πολύ σημαντική.** Αν η πλύση εκτελείται με το χέρι, η σωστή πλύση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας δυνατή ροή διαλύματος πλύσης με φιάλη πλύσης με ανοιχτό στόμιο σε ολόκληρη τη μικροπλάκα. **Συνιστάται αυτόματη συσκευή πλύσης μικροπλάκας.**
- Χρησιμοποιείτε πολυκάναλη πιπέτα ικανή να απελευθερώνει 8 ή 12 κοιλότητες ταυτόχρονα. Αυτό επιταχύνει τη διαδικασία και παρέχει χρόνους πιο ομοιόμορφης επώασης.
- Σε όλα τα βήματα, ο προσεκτικός έλεγχος χρονισμού είναι σημαντικός. Η έναρξη όλων των περιόδων επώασης γίνεται με την ολοκλήρωση της προσθήκης αντιδραστήριου.
- Προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων θα πρέπει να εκτελείται με τον ίδιο ρυθμό και την ίδια ακολουθία.

Μέθοδος Δοκιμής

Βήμα 1 Αφήνετε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 2 Τοποθετείτε επικέτα στο φύλλο πρωτοκόλλου για να υποδηλώσετε την τοποθέτηση δείγματος στις κοιλότητες. Αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική να εκτελείτε τα δείγματα εις διπλούν.

Βήμα 3 Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο Βαθμονομητή Δ (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα).

ή

Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε Βαθμονομητές Α έως Ε, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διάταξη δείγματος.

| | 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 | |

Βήμα 4 Προετοιμάζετε διάλυμα **1:101** από τα δείγματα ασθενών αναμειγνύοντας **5 μl** των ορών των ασθενών με **500 ul** Ορού Αραίωσης.

Βήμα 5 Αφαιρείτε τα απαιτούμενα βυθίσματα από το σάκο και βάζετε πίσω τις λωρίδες που δεν έχετε χρησιμοποιήσει στη σφραγισμένη σακούλα στο ψυγείο. Τοποθετείτε ασφαλώς τα βυθίσματα στην επιπλέον βάση που παρέχεται.

Βήμα 6 Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** τους Έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές, τους Θετικούς και Αρνητικούς ελέγχους και τα αραιωμένα δείγματα ασθενών (**1:101**) στα κατάλληλα βυθίσματα σύμφωνα με το φύλλο πρωτοκόλλου.

Σημείωση: Συμπεριλαμβάνετε μία κοιλότητα που περιέχει **100 μl** Ορού Αραίωσης ως κενό αντιδραστήριο. Μηδενίζετε την συσκευή ανάγνωσης ELISA έναντι του κενού αντιδραστήριου.

Βήμα 7 Επιδράστε για **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 8 Πλένετε **4 φορές** με διάλυμα πλύσης. Για πλύσιμο με το χέρι, γεμίζετε κάθε βύθισμα με ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης. Πετάξτε το υγρό αναστρέφοντας και κτυπώντας ελαφρά ώστε να βγουν τα περιεχόμενα κάθε κοιλότητας ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κοιλότητα. Για να κάνετε αποτύπωση στο τέλος της τελευταίας πλύσης, αναστρέψτε τις λωρίδες και κτυπήστε τοις κοιλότητες έντονα πάνω σε απορροφητικές χάρτινες χειροπετσέτες. Για αυτόματες συσκευές πλυσίματος, προγραμματίστε την συσκευή πλύσης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Βήμα 9 Βάζετε με την πιπέτα **100 μl** της σύζευξης σε βυθίσματα.

Βήμα 10 Επωάζετε για **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 11 Πλένετε όλα τα βυθίσματα, όπως περιγράφεται στο Βήμα 8.

Βήμα 12 Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** Ενζυμικού Υποστρώματος σε κάθε βύθισμα με την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για τη Σύζευξη.

Βήμα 13 Επωάζετε για **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 14 Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** Διαλύματος Παύσης σε κάθε βύθισμα χρησιμοποιώντας την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για την προσθήκη του Ενζυμικού Υποστρώματος. Διαβάζετε τις τιμές απορροφητικότητας εντός 30 λεπτών από την προσθήκη του Διαλύματος Παύσης.

Βήμα 15 Διαβάστε την απορροφητικότητα κάθε βυθίσματος σε **450 nm** χρησιμοποιώντας μονού ή στα 450/630 nm χρησιμοποιώντας διπλού μήκους κύματος συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας έναντι του σεντ κενού αντιδραστήριου σε μηδενική απορροφητικότητα.

Ποιοτικός Έλεγχος

Ο Βαθμονομητής, ο Θετικός και ο Αρνητικός Έλεγχος και ένα κενό αντιδραστήριο πρέπει να εκτελούνται με κάθε δοκιμασία για την εξακρίβωση της ακεραιότητας και ακρίβειας της δοκιμασίας. Η ένδειξη απορροφητικότητας του κενού αντιδραστήριου θα πρέπει να είναι μικρότερη του 0,3. Ο Βαθμονομητής Α θα πρέπει να έχει ένδειξη απορροφητικότητας όχι μικρότερη του 0,1, άλλως η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί. Ο Αρνητικός Έλεγχος πρέπει να είναι μικρότερος από 10 EU/ml. Εάν η δοκιμασία διεξάγεται εις διπλούν, ο μέσος όρος των δύο ενδείξεων θα πρέπει να λαμβάνεται για τον προσδιορισμό EU/ml. Κατά την εκτέλεση των ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή Δ πρέπει να είναι μεγαλύτερη από εκείνη του Αρνητικού Ελέγχου και μικρότερη από την απορροφητικότητα του Θετικού Ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς ο Θετικός Έλεγχος πρέπει να δίνει τιμές εντός του φάσματος που δηλώνεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι πυκνότητες των δειγμάτων των ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις παρακάτω μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απορ. του Δείγματος Δοκιμασίας

----- X EU/ml Βαθμονομητή Δ = EU/ml Δείγμα Δοκιμασίας

Απορ. Βαθμονομητή Δ

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. Τα ποιοτικά θετικά αποτελέσματα θα πρέπει να επιβεβαιώνονται με ημι-ποσοτική δοκιμασία που εκτελείται για να προσδιορίσει μονάδες και αξιολογεί

LIMITI DELLA PROCEDURA

Questo test non deve essere eseguito su campioni fortemente emolizzati, microbiologicamente contaminate o lipemici. Questa metodica deve essere usata per testare solo campioni di siero umano.

I risultati ottenuti servono solo come supporto nella diagnosi e non devono essere interpretati come diagnostici. In pazienti CD con IgA insufficiente, l'IgA-AGA può essere negativo.

VALORI PREVISTI

I valori previsti in una popolazione normale sono negativi. Tuttavia, è stato determinato che alcuni individui apparentemente sani, asintomatici possono risultare positivi agli anticorpi anti-gliadina IgA o IgG.

Sull'ImmuLISA™ AGA ELISA sono stati testate delle serie di campioni clinici. Di seguito sono riportati i risultati che dimostrano l'incidenza nelle popolazioni per questo studio.

| Malattia | n | Gliadina IgA | | Gliadina IgG | |
|---------------------------------------|-----|--------------|-------|--------------|-------|
| | | n Pos | % Pos | n Pos | % Pos |
| Malattia celiaca | 306 | 133 | 43,5% | 191 | 62,4% |
| Malattia celiaca IgA insufficiente | 64 | 0 | 0,0% | 63 | 98,4% |
| Malattia celiaca pediatrica | 123 | 31 | 25,2% | 70 | 56,9% |
| Dermatite erpetiforme | 30 | 11 | 36,7% | 16 | 53,3% |
| Artrite reumatoide | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Tiroidite | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Lupus eritematoso sistemico | 30 | 2 | 6,7% | 3 | 10,0% |
| Vasculite | 30 | 0 | 0,0% | 1 | 3,3% |
| Sclerosi sistemica | 30 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| Colite ulcerosa | 15 | 0 | 0,0% | 1 | 6,7% |
| Morbo di Crohn | 15 | 1 | 6,7% | 2 | 13,3% |
| Siero umano normale pediatrico | 130 | 0 | 0,0% | 4 | 3,1% |
| Siero umano normale adulto | 139 | 7 | 5,0% | 6 | 4,3% |
| NHS totale | 269 | 7 | 2,6% | 10 | 3,7% |
| Controllo totale NHS e delle malattie | 449 | 12 | 2,7% | 17 | 3,8% |

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

L'utilità dell'ImmuLISA™ Gliadin Antibody ELISA è stata valutata testando pazienti con malattia celiaca assieme a controlli della malattia e siero umano "normale". Questi campioni sono stati anche testati su kit di test disponibili in commercio. Nel metodo del confronto sono stati considerati solo campioni nell'intervallo lineare della serie. Questi risultati sono riepilogati di seguito.

densità ottica del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore dell'assorbanza del controllo positivo. Per le determinazioni semi-quantitative il controllo positivo deve fornire valori nell'intervallo indicato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni dei pazienti possono essere determinate mediante due metodi:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

Ass. del campione del test

----- X Unità di calibratore D = Unità del campione del test

Ass. del calibratore D

Si consiglia di riportare i risultati qualitative in "positivi" o "negativi." I risultati dei campioni maggiori di o uguali al Calibratore D sono considerati positivi. I risultati positivi qualitativi devono essere confermati con un dosaggio semi-quantitativo eseguito per determinare unità e valutare i risultati a confronto con intervalli di riferimento applicabili come indicato in **Interpretazione**.

2. DETERMINAZIONE SEMI-QUANTITATIVA

Tracciare la capacità di assorbimento dei calibratori da A a E contro la loro concentrazione rispettiva su una carta da grafico lineare-lineare. Tracciare le concentrazioni EU/ml sull'asse X contro la capacità di assorbimento sull'asse Y e disegnare la curva adatta migliore. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva in base ai valori di assorbimento corrispondenti. Oppure, una curva con quattro parametri può essere usata per tracciare la curva standard.

Si consiglia di dichiarare i risultati semi-quantitativi "positivi," "negativi" o "indeterminati" con valori unità EU/ml. Risultati indeterminati/limiti devono essere testati di nuovo e valutati con altri metodi di laboratorio, come indicato in **Limiti della procedura**.

Interpretazione

I valori illustrati sono stati determinati analizzando 64 donatori di sangue normali e campioni di controllo della malattia. Il limite è stato stabilito usando questi soggetti + 3SD ed è stato loro assegnato un valore arbitrario di 20 EU/ml. Le informazioni seguenti servono solo come guida per l'interpretazione dei risultati di laboratorio. Ogni laboratorio deve convalidare i valori del test per le proprie condizioni.

| Valore gliadina Ab | Interpretazione |
|--------------------|------------------------|
| <20 EU/ml | Negativo |
| 20-25 EU/ml | Indeterminato (Limite) |
| >25 EU/ml | Positivo |

Calibratore

I calibratori pronti per l'uso sono presenti per fornire semi-quantizzazione e devono essere usati ad ogni ciclo. I campioni dei pazienti contenenti elevati livelli di anticorpi possono fornire valori di assorbimento maggiori del Calibratore A. Per determinare valori semi-quantitativi accurati, questi campioni devono essere ulteriormente diluiti in modo da cadere nell'intervallo della curva del calibratore quando sono nuovamente testati. Per determinare i valori EU/ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

τα αποτελέσματα σε σύγκριση με εφαρμοστέα εύρη αναφοράς όπως υποδεικνύεται στην **Ερμηνεία**.

2. HMI-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Αποτυπώστε την απορροφητικότητα των Βαθμονομητών Α έως Ε έναντι των αντίστοιχων συγκεντρώσεων σε χαρτί γραφημάτων γραμμικού αρχείου καταγραφής (linear-log graph paper). Αποτυπώστε τις συγκεντρώσεις σε U/ml στον Χ-άξονα έναντι της απορροφητικότητας στον Υ-άξονα και σχεδιάστε μια καμπύλη προσαρμογής από σημείο σε σημείο. Καθορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενών από την καμπύλη σύμφωνα με τις αντίστοιχες τιμές απορροφητικότητας. Εναλλακτικά, μια καμπύλη τεσσάρων παραμέτρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτύπωση της πρότυπης καμπύλης.

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, όπως δηλώνεται στους **Περιορισμούς Διαδικασίας**.

Ερμηνεία

Οι τιμές ερμηνείας προσδιορίστηκαν με δοκιμή 64 απλών δοτών αίματος και δείγματα ελέγχου νόσου. Ο μέσος όρος αυτών των υποκειμένων συν 3SD καθιερώθηκε ως το έσχατο όριο της δοκιμασίας και καθόρισε την αυθαίρετη τιμή των 20 EU/ml. Οι ακόλουθες πληροφορίες εξυπηρετούν μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθορίζει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

| Τιμή Αντισώματος Γλιαδίνης | Ερμηνεία |
|----------------------------|------------------------|
| <20 EU/ml | Αρνητικό |
| 20-25 EU/ml | Απροσδιόριστο (Οριακό) |
| >25 EU/ml | Θετικό |

Βαθμονομητής

Οι Έτοιμοι προς Χρήση Βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για να παρέχουν ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε εκτέλεση. Δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων μπορούν να δώσουν τιμές απορροφητικότητας μεγαλύτερες από εκείνη του Βαθμονομητή Α. Για τον προσδιορισμό ακριβών ημι-ποσοτικών τιμών, αυτά τα δείγματα θα πρέπει να αραιώνονται περαιτέρω ώστε να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης του βαθμονομητή όταν επανεξετάζονται. Για τον προσδιορισμό τιμών EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που αποκτήθηκαν με τον διαλύτη.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η παρούσα δοκιμασία δεν θα πρέπει να εκτελείται σε αιμολυμένα, βακτηριδιακά επιμολυσμένα ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο δειγμάτων ανθρώπινου ορού μόνον.

Τα αποτελέσματα που επιτυγχάνονται εξυπηρετούν μόνον ως βοήθημα στη διάγνωση και δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται ως διαγνωστικά. Σε ασθενείς με κοιλιοκάκη με ανεπάρκεια IgA το IgA-AGA μπορεί να είναι αρνητικό.

ANAMENOMENES TIMES

Οι αναμενόμενες τιμές σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρνητικές. Ωστόσο, έχει προσδιορισθεί ότι κάποια προφανώς υγιή, ασυμπτωτικά άτομα μπορεί να βρεθούν θετικά για αντισώματα έναντι γλιαδίνης IgA ή IgG.

Σετ κλινικών δειγμάτων δοκιμάστηκαν στα Αποτελέσματα της Μεθόδου ImmuLisa™ AGA ELISA. Αποτελέσματα που επιδεικνύουν συχνότητα εμφάνισης στους πληθυσμούς για την παρούσα μελέτη παρέχονται παρακάτω.

| Πάθηση | n | IgA Γλιαδίνης | | IgG Γλιαδίνης | |
|---|-----|---------------|-------|---------------|-------|
| | | n Θετ | % Θετ | n Θετ | % Θετ |
| Κοιλιοκάκη | 306 | 133 | 43,5% | 191 | 62,4% |
| Κοιλιοκάκη με Ανεπάρκεια IgA | 64 | 0 | 0,0% | 63 | 98,4% |
| Κοιλιοκάκη Παιδικής Ηλικίας | 123 | 31 | 25,2% | 70 | 56,9% |
| Ερπητοειδής Δερματίτιδα | 30 | 11 | 36,7% | 16 | 53,3% |
| Ρευματοειδής Αρθρίτιδα | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Θυρεοειδίτιδα | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) | 30 | 2 | 6,7% | 3 | 10,0% |
| Αγγειίτιδα | 30 | 0 | 0,0% | 1 | 3,3% |
| Συστημική σκλήρυνση | 30 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| Ελκώδης κολίτιδα | 15 | 0 | 0,0% | 1 | 6,7% |
| Νόσος του Κρον | 15 | 1 | 6,7% | 2 | 13,3% |
| Φυσιολογικοί Ανθρώπινοι Οροί Παιδιών | 130 | 0 | 0,0% | 4 | 3,1% |
| Φυσιολογικοί Ανθρώπινοι Οροί Ενηλίκων | 139 | 7 | 5,0% | 6 | 4,3% |
| Σύνολο Φυσιολογικών Ανθρώπινων Ορών | 269 | 7 | 2,6% | 10 | 3,7% |
| Σύνολο Φυσιολογικών Ανθρώπινων Ορών και Έλεγχος Πάθησης | 449 | 12 | 2,7% | 17 | 3,8% |

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα της ImmuLisa™ Αντισώματος Γλιαδίνης ELISA αξιολογήθηκε με δοκιμή ασθενών με νόσο Κοιλιοκάκης μαζί με ελέγχους νόσων και “φυσιολογικούς” ανθρώπινους ορούς. Αυτά τα δείγματα δοκιμάστηκαν επίσης σε εμπορικά διαθέσιμα kit. Μόνον δείγματα στο γραμμικό φάσμα της δοκιμασίας συμπεριελήφθησαν στην σύγκριση της μεθόδου. Αυτά τα αποτελέσματα συνοψίζονται κατωτέρω.

A. ImmuLisa™ AGA ELISAs έναντι άλλων AGA ELISA:

| | | Άλλο AGA IgA Ab ELISA | | |
|---------------------------------------|----------|-----------------------|----------|------------------------|
| | | Θετικό | Αρνητικό | Σύνολο |
| IMMCO AGA IgA Ab ELISA | Θετικό | 87 | 24 | 111 |
| | Αρνητικό | 1 | 350 | 351 |
| | Σύνολο | 88 | 374 | 462 |
| Συμφωνία Θετικού Ποσοστού | | | 98,9% | (95% CI 92,9% - 99,9%) |
| Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού | | | 93,6% | (95% CI 90,5% - 95,8%) |
| Συμφωνία Γενικού Ποσοστού | | | 94,6% | (95% CI 90,7% - 95,3%) |

| Qualitativa | | | Semi-quantitativa | | | | |
|-------------|-------|-----|-------------------|---|-------|----|------|
| A | Blank | S5 | Ecc. | A | Blank | S1 | Ecc. |
| 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 |

- Fase 4** Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **500 µl** di diluente del siero.
- Fase 5** Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo. Sistemare in modo sicuro i pozzetti nel supporto extra fornito di corredo.
- Fase 6** Pipettare **100 µl** di Calibratori pronti all'uso, di Controllo Positivo e Negativo e di campioni del paziente (**1:101**) negli appositi pozzetti come indicato nello schema riportato sopra.
- Nota:** Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco.
- Fase 7** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Eliminare il liquido capovolgendo e sbattendo i contenuti da ciascun pozzetto o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e battere vigorosamente i pozzetti su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatico, programmare il dispositivo secondo le istruzioni del produttore.
- Fase 9** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 10** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 11** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 8.
- Fase 12** Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 13** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 14** Pipettare **100 µl** di Soluzione di Stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere i valori di assorbanza entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di Stop.
- Fase 15** Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **450 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (450/630 nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

Controllo di qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere $<0,3$. Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1,0, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore <10 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le unità si deve prendere la media delle due letture. Quando si eseguono determinazioni qualitative, la

IT

- Puntali monouso per pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Contaminuti
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 450 nm Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

In 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 consiglia di testare campione congelati entro un anno.

PROCEDURA

Note sulla procedura

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Prima dell'inizio del test portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti. Immediatamente dopo l'uso, rimettere in frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
- Togliere le strisce necessarie dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati Trasferire immediatamente la busta in frigo.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- **Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva.** Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga su tutta la micropiastro. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastro.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 o 12 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e il tempo di incubazione più uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta dei reagenti.
- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti dovrebbe essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.

Metodo del test

- Fase 1** Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.
- Fase 2** Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. È buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Fase 3** Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Calibratore D (*tappo giallo*).
oppure
Per una **determinazione semi-quantitativa** usare Calibratori da A a E come indicato nel layout campione di seguito.

EL

Άλλο IgG Ab Γλιαδίνης ELISA

| | Θετικό | Αρνητικό | Σύνολο |
|-----------------|--------|----------|--------|
| IMMCO | 251 | 6 | 257 |
| AGA IgG | 3 | 156 | 159 |
| Ab ELISA | 254 | 162 | 416 |

| | | |
|-----------------------------|-------|------------------------|
| Συμφωνία Θετικού Ποσοστού | 98,8% | (95% CI 96,3% - 99,7%) |
| Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού | 96,3% | (95% CI 91,8% - 98,5%) |
| Συμφωνία Γενικού Ποσοστού | 97,8% | (95% CI 95,9% - 98,9%) |

B. Διασταυρωτή Αντιδραστικότητα: Ένα σύνολο από 160 δείγματα ορού με πιθανή διασταυρούμενη αντίδραση από άτομα με άλλες αυτόνοσες διαταραχές επελέγησαν για να δοκιμασθούν για αντισώματα γλιαδίνης χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία ImmuLISA™. Αυτά τα αποτελέσματα συνοψίζονται κατωτέρω.

| Πάθηση | n | IgA Γλιαδίνης | | IgG Γλιαδίνης | |
|---------------------------------------|-----|---------------|-------|---------------|-------|
| | | n Θετ | % Θετ | n Θετ | % Θετ |
| Ρευματοειδής Αρθρίτιδα | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Θυρεοειδίτιδα | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) | 30 | 2 | 6,7% | 3 | 10,0% |
| Αγγειίτιδα | 30 | 0 | 0,0% | 1 | 3,3% |
| Συστημική σκλήρυνση | 30 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| Ελκώδης κολίτιδα | 15 | 0 | 0,0% | 1 | 6,7% |
| Νόσος του Κρον | 15 | 1 | 6,7% | 2 | 13,3% |
| Σύνολο | 180 | 5 | 2,8% | 7 | 3,9% |

Ακρίβεια

Η ακρίβεια δοκιμάστηκε με πολλαπλά δείγματα που επιλέχθηκαν από όλο το φάσμα της δοκιμασίας. Πραγματοποιήθηκαν 6 πανομοιότυπες εκτελέσεις από κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν σε 13 ημέρες. Η επαναληψιμότητα προσδιορίστηκε με την εκτέλεση 12 πανομοιότυπων από κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω.

| AGA IgA | Μέσος όρος (EU/ml) | Ολική Ανακρίβεια | | Μεταξύ ημερών | | Εντός προσδιορισμού (Επαναληψιμότητα) | | |
|---------------|--------------------|------------------|-------|---------------|-------|---------------------------------------|-------|------|
| | | SD (EU/ml) | CV% | SD (EU/ml) | CV% | SD (EU/ml) | CV% | |
| Αρ. δείγματος | 1 | 10,4 | 0,536 | 5,2% | 0,559 | 5,4% | 0,251 | 2,4% |
| | 2 | 15,8 | 0,725 | 4,6% | 0,766 | 4,8% | 0,281 | 1,8% |
| | 3 | 24,5 | 1,872 | 7,6% | 1,949 | 8,0% | 1,266 | 5,1% |
| | 4 | 45,9 | 1,700 | 3,7% | 1,680 | 3,7% | 1,269 | 2,7% |
| | 5 | 84,4 | 2,485 | 2,9% | 2,591 | 3,1% | 1,291 | 1,5% |
| | 6 | 116,3 | 5,932 | 5,1% | 6,174 | 5,3% | 2,653 | 2,2% |

| ΑΓΑ IgG | Ολική Ανακρίβεια | | | Εντός προσδιορισμού (Επαναληψιμότητα) | | | |
|------------|----------------------------------|---------------|-------|--|-------|---------------|------|
| | Μέσος όρος Αρ. δείγματα | SD (EU/ml) | CV% | SD (EU/ml) | CV% | SD (EU/ml) | CV% |
| 1 | 9,3 | 0,846 | 9,1% | 0,892 | 9,6% | 0,429 | 4,6% |
| 2 | 15,4 | 1,108 | 7,2% | 1,131 | 7,4% | 0,316 | 1,9% |
| 3 | 24,4 | 2,461 | 10,1% | 2,615 | 10,7% | 0,801 | 3,3% |
| 4 | 37,1 | 4,429 | 11,9% | 4,362 | 11,6% | 0,696 | 2,1% |
| 5 | 63,1 | 8,408 | 13,3% | 8,177 | 12,7% | 4,027 | 7,4% |
| 6 | 127,9 | 11,132 | 8,7% | 11,288 | 8,7% | 5,649 | 4,7% |

Αναπαραγωγιμότητα

80 πανομοιότυπες δοκιμασίες δειγμάτων στο χαμηλό αρνητικό εύρος, κοντά στο σημείο διαχωρισμού, στο μέτριο θετικό εύρος και περίπου +/-20% των σημείων διαχωρισμού της δοκιμασίας για κάθε ισότυπο AGA εκτελέστηκαν για να προσδιορίσουν ποιοτική αναπαραγωγιμότητα. Όλα τα δείγματα παρήγαγαν 100% ποιοτική συμφωνία, με την εξαίρεση ενός δείγματος IgA με τιμή 24,4 EU/ml (98% ποιοτική συμφωνία).

Όριο Ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (LoD) καθορίστηκε επί τη βάση 60 πανομοιότυπων κενού και 10 πανομοιότυπων καθένα από 6 δείγματα χαμηλού επιπέδου (NHS). Το όριο ανίχνευσης (LoD) καθορίστηκε να είναι 1,8 EU/ml για IgA και 3,7 EU/ml για IgG.

Γραμμικότητα και Ανάκαμψη

Η γραμμικότητα και η ανάκαμψη δοκιμάστηκαν αραιώνοντας θετικά δείγματα σε όλο το εύρος της δοκιμασίας σε ισαπέχουσες αραιώσεις και συγκρίνοντας πραγματικές έναντι αναμενόμενων τιμών. Το γραμμικό εύρος της δοκιμασίας καθορίστηκε να είναι 1,8 (όριο ανίχνευσης) – 160 EU/ml για IgA και 3,7 (όριο ανίχνευσης) – 160 EU/ml για IgG. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω.

| IgA | Εύρος Δοκιμής (EU/ml) | Κλίση (95% CI) | Σημείο τομής Y (95% CI) | R ² | % Ανάκαμψης (Αποκτηθέν/Αναμενόμενο) |
|-----|--------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------|--|
| | 1,2 έως 41,6 | 1,03 (0,959 έως 1,109) | 0,4 (-1,4 έως 2,2) | 0,995 | 95% έως 110% |
| | 2,3 έως 101,6 | 1,05 (0,929 έως 1,168) | 2,2 (-4,6 έως 9,0) | 0,987 | 109% έως 115% |
| | 4,7 έως 273,4 | 0,95 (0,887 έως 1,014) | 3,0 (-7,8 έως 13,8) | 0,996 | 93% έως 114% |

| IgG | Εύρος Δοκιμής (EU/ml) | Κλίση (95% CI) | Σημείο τομής Y (95% CI) | R ² | % Ανάκαμψης (Αποκτηθέν/Αναμενόμενο) |
|-----|--------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------|--|
| | 2,7 έως 47,0 | 0,97 (0,891 έως 1,040) | 0,89 (-1,3 έως 3,1) | 0,994 | 94% έως 117% |
| | 12,8 έως 116,8 | 0,95 (0,957 έως 1,046) | -0,24 (-7,5 έως 7,0) | 0,991 | 90% έως 96% |
| | 96,8 έως 227,0 | 0,96 (0,776 έως 1,141) | -6,69 (-39,8 έως 26,4) | 0,965 | 87% έως 92% |

Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε με την ανάμειξη ορών με γνωστά επίπεδα αντισώματος γλαδίνης για κάθε ισότυπο με δείγματα ορού πιθανώς παρεμβαλλόμενα και με την μελέτη απόκλισης από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Καμία σημαντική παρέμβαση δεν εκδηλώθηκε για τις ακόλουθες ουσίες στα επίπεδα που δηλώνονται: Αιμοσφαιρίνη (2 g/L), Χολερυθρίνη (342 μmol/L), Ρευματοειδής Παράγοντας (100 EU/ml), Τριγλυκερίδια (37 mmol/L), και Χοληστερόλη (13 mmol/L).

1 x 1,75 ml **CONTROL-**

5 x 1,75 ml **CALIBRATOR|A|AGA-A**

CALIBRATOR|B|AGA-A

CALIBRATOR|C|AGA-A

CALIBRATOR|D|AGA-A

CALIBRATOR|E|AGA-A

5 x 1,75 ml **CALIBRATOR|A|AGA-G**

CALIBRATOR|B|AGA-G

CALIBRATOR|C|AGA-G

CALIBRATOR|D|AGA-G

CALIBRATOR|E|AGA-G

1 x 15 ml **IgA-CONJ|HRP**

1 x 15 ml **IgG-CONJ|HRP**

1 x 60 ml **DIL**

1 x 15 ml **SUBSTRATE|TMB**

1 x 15 ml **STOP|H2SO4**

2 x fiale **BUF|WASH**

1 x

Componenti facoltativi

1 x 60 ml **BUF|WASH**


Simboli usati sulle etichette


LOT Numero di lotto


REF Numero catalogo

IVD Per uso diagnostico in vitro

 Uso da parte di

 Temperatura di conservazione

 Leggere le istruzioni per l'uso

 Numero di test

 Produttore

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua deionizzata o distillata
- Boccetta comprimibile per contenere il tampone di lavaggio diluito
- Pipette con capacità di erogazione da 5 µl a 1000 µl

Controllo negativo pronto per l'uso (*tappo bianco*). Contiene siero umano.

Set pronto per l'uso di 5 Calibratori per **REF** 5117A. Calibratore A (tappo verde) 160 EU/ml, Calibratore B (tappo viola) 80 EU/ml, Calibratore C (tappo blu) 40 EU/ml, Calibratore D (tappo giallo) 20 EU/ml e Calibratore E (tappo arancione) 1 EU/ml. Derivato da siero umano contenente AGA IgA. Le concentrazioni in EU/ml sono stampate sull'etichetta.

Set pronto per l'uso di 5 Calibratori per **REF** 5117G. Calibratore A (tappo verde) 160 EU/ml, Calibratore B (tappo viola) 80 EU/ml, Calibratore C (tappo blu) 40 EU/ml, Calibratore D (tappo giallo) 20 EU/ml e Calibratore E (tappo arancione) 1 EU/ml. Derivato da siero umano contenente AGA IgG. Le concentrazioni in EU/ml sono stampate sull'etichetta.

Coniugato IgG anti-umano di capra HRP per **REF** 5117A. Pronto per l'uso. Colore rosa.

Coniugato IgG anti-umano di capra HRP per **REF** 5117G. Pronto per l'uso. Colore rosa.

Diluyente siero. Pronto per l'uso. Colore blu.

Substrato enzimatico TMB. Pronto per l'uso. **Proteggere dalla luce.**

Soluzione di Stop. Pronto per l'uso.

Liquido concentrato Wash Buffer. **Ricostituire a un litro ciascuno.**

Fogli protocollo

Tampone di lavaggio concentrato liquido. **Ricostituire a un litro.**

all'immunoglobina umana della classe appropriata. Dopo aver lavato via qualsiasi coniugato non legato, il substrato enzimatico specifico (pNPP) viene poi aggiunto ai pozzetti. Dopo aver interrotto la reazione enzimatica, l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 450 nm. I risultati sono espressi in unità ELISA per millilitro (EU/ml).

REAGENTI

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.** I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e manipolati come indicato.

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

Le strisce con i pozzetti sono monouso. Riporre le strisce con i pozzetti inutilizzate nella busta di confezionamento dove sono presenti dissecanti e sigillare per minimizzare l'esposizione a vapore acqueo e conservarle a 2-8°C.

Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana utilizzati sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 e HTLV-I e sono risultati negativi in base ai test richiesti dalla FDA. Gli emoderivati umani e i campioni dei pazienti vanno tuttavia considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali.²¹

La soluzione di Stop è una soluzione diluita di acido solforico. L'acido solforico (H₂SO₄) è tossico e corrosivo. Non ingerire ed evitare il contatto con cute e occhi. Evitare l'esposizione a basi, metalli o altri composti che potrebbero reagire con acidi.

Il substrato enzimatico TMB contiene un irritante che potrebbe essere nocivo se inalato, ingerito o assorbito tramite la cute. Non ingerire ed evitare il contatto con cute e occhi.

Per ottenere risultati validi, le istruzioni devono essere osservate esattamente come compagno in questo foglietto 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. Non usare i componenti del kit oltre la data di scadenza indicata sulle etichette.

Materiali forniti

ImmulinTM AGA IgA ELISA

REF 5117A

ImmulinTM AGA IgG ELISA

REF 5117G

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 96 determinazioni.

| | | |
|--------------------|------------------------|---|
| 12 x 8 | MICROPLATE AGA | Micropiastra con micropozzetti singoli di separazione. Rivestiti con antigene gliadina. Pronto per l'uso. |
| 1 x 1,75 ml | CONTROL + AGA-A | Controllo positivo pronto per l'uso (tappo rosso) per REF 5117A. Contiene siero umano positivo per anticorpi IgA gliadina. L'intervallo di concentrazione previsto in EU/ml è stampato sull'etichetta. |
| 1 x 1,75 ml | CONTROL + AGA-G | Controllo positivo pronto per l'uso (tappo rosso) per REF 5117G. Contiene siero umano positivo per anticorpi IgG gliadina. L'intervallo di concentrazione previsto in EU/ml è stampato sull'etichetta. |



ImmulinTM

AGA aumentó ELISA

ELISA para detectar anticuerpo IgA o IgG anti gliadina

IVD Para uso de diagnóstico *in vitro*

Complejidad de enmiendas sobre mejoras de laboratorios clínicos (CLIA, por sus siglas en inglés): alta

Código del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés) de identificación de analito: 0528
Código del CDC de identificación del sistema de prueba: 28513/28514

INSERCIÓN DEL PRODUCTO

REF 5117A ELISA para detectar AGA IgA 96 determinaciones

REF 5117G ELISA para detectar AGA IgG 96 determinaciones

USO DESEADO

Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) para la detección y semi-cuantización de los anticuerpos anti-gliadina IgA o IgG en suero humano para ayudar a diagnosticar pacientes con celiaquía y dermatitis herpetiforme.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La enteropatía sensible al gluten (ESG), es decir enfermedad celíaca (EC) y dermatitis herpetiforme (DH), es un desorden gastrointestinal heterogéneo clínicamente común con sensibilidad al gluten y puede manifestar síntomas no clásicos o mínimos.¹ Existe algún componente genético relacionado con ESG que se representa demostrando que aproximadamente entre el 5 y 10% de los familiares de primer grado tienen EC sintomática o asintomática. Los niños de baja estatura y los pacientes con diabetes insulino dependiente y con otros desórdenes autoinmunes también demuestran una mayor probabilidad de desarrollar ESG. Se recomienda evitar estrictamente el gluten en la dieta para controlar la actividad de la enfermedad y el diagnóstico precoz en dichos pacientes puede mejorar su pronóstico general.²

Literatura publicada sugiere el uso de pruebas serológicas en pacientes con sospecha de ESG y el control del cumplimiento dietario.³⁻⁶ La Sociedad europea de gastroenterología y nutrición pediátrica (ESPGAN, por sus siglas en inglés) recomienda incluir varias pruebas serológicas para reducir la cantidad de biopsias intestinales necesarias para realizar el diagnóstico.⁷ Estos incluyen pruebas de anticuerpos anti-gliadina (AGA), anti-reticulina (ARA) y anti-endomisio (EMA). Entre estos, el que más se estudia es AGA.⁸⁻²⁰ Usando ELISA, ambas clases de AGA IgA e IgG se detectan en el suero de pacientes con ESG. De estos, la clase de AGA IgG parece un indicador de ESG más sensible, pero menos específico que la clase de AGA IgA. La clase de AGA IgA, por otro lado, es menos sensible, pero más específica para ESG.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El antígeno gliadina está ligado a las cubetas de una placa de microcubetas de polietileno seguida del bloqueo de sitios sin reaccionar para reducir los sitios de unión no específica.

Controles, calibradores y suero diluido del paciente se agregan en cubetas separadas, permitiendo que cualquier anticuerpo anti gliadina presente se ligue al antígeno inmovilizado. La muestra desligada se quita lavando y una enzima etiquetada conjugada de anticuerpos IgA o IgG se agrega a cada cubeta. Estos anticuerpos conjugados con enzimas se ligan específicamente a la inmunoglobulina humana de la clase adecuada. Después de quitar lavando cualquier conjugado desligado, el sustrato específico de la enzima (TMB) se agrega a las cubetas. Luego de detener la reacción enzimática, la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración del anticuerpo, se lee con un espectrofotómetro a 450 nm. Los resultados se expresan en unidades ELISA por mililitro (EU/ml.).

REACTIVOS

Conserve todos los reactivos entre 2° y 8 °C. **No los congele.** Los reactivos permanecen estables hasta la fecha de vencimiento cuando se conservan y manejan como se indica.

No use el reactivo si no está transparente o si está precipitado. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de usarse.

Reconstituya la solución reguladora a 1 litro con agua destilada o desionizada. Cuando se conserva entre 2° y 8 °C, la solución reguladora reconstituida es estable hasta la fecha de vencimiento que figura en el envase.

Las bandas recubiertas de microcubetas son para usarse sólo una vez. Las bandas de microcubetas que no se usaron deben volver a sellarse en la bolsa que contiene los desecativos para evitar la condensación y guardarse entre 2° y 8 °C.

Precauciones

Todos los componentes derivados de humanos que se usaron fueron probados para HbsAg, HCV-1 y 2 y HTLV-I y tuvieron resultado negativo en las pruebas requeridas por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, los derivados de sangre humana y las muestras de los pacientes deben considerarse potencialmente infecciosos. Cumpla con las buenas prácticas de laboratorio en almacenamiento, preparado y disposición de estos materiales.²¹

La solución de corte es una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico (H₂SO₄) es tóxico y corrosivo. No lo ingiera y evite el contacto con la piel y los ojos. Evite exponerlo a soportes, metales u otros componentes que puedan reaccionar con ácidos.

El sustrato de enzima TMB contiene un irritante que puede ser nocivo si se lo inhala, ingiere o absorbe por la piel. No lo ingiera y evite el contacto con la piel y los ojos.

Las instrucciones deben cumplirse exactamente como aparecen en este folleto para asegurar resultados válidos. No intercambie los componentes del envase con aquellos de otras fuentes. Cumpla con las buenas prácticas de laboratorio para minimizar la contaminación microbiana y cruzada de reactivos al manipularlos. No use los componentes del envase después de la fecha de vencimiento que figura en las etiquetas.

Materiales proporcionados

ELISA para detectar AGA IgA ImmuLisa™

REF 5117A

ELISA para detector AGA IgG ImmuLisa™

REF 5117G

Los envases contienen reactivos suficientes para realizar 96 determinaciones.

12 x 8

MICROPLATE|AGA

Microbandeja con microcubetas desprendidas individuales. Recubierta con antígeno gliadina. Preparada para usar.

1 x 1,75 ml.

CONTROL+|AGA-A

Preparado para usar control positivo (tapa roja) para REF 5117A. Contiene suero humano positivo para anticuerpos IgA anti gliadina. Los valores de concentración esperados en EU/ml.



ImmuLisa™

AGA Enhanced ELISA

Gliadin IgA or IgG Antibody ELISA

IVD Per uso diagnostico *in vitro*

Complettà CLIA: Elevata

Codice di identificazione CDC Analyte: 0528

Codice di identificazione del sistema di test CDC: 28513/28514

FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

REF 5117A AGA IgA ELISA 96 determinazioni

REF 5117G AGA IgG ELISA 96 determinazioni

USO PREVISTO

Dosaggi immunoassorbenti enzimatici (ELISA) per la rilevazione e la semi-quantizzazione di anticorpi anti-gliadina IgA o IgG nel siero umano come aiuto nella diagnosi di pazienti con celiachia e dermatite erpetiforme.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

L'enteropatia glutine-sensibile (GSE), cioè la celiachia (CD) e la dermatite erpetiforme (DH), è un comune disordine gastrointestinale clinicamente eterogeneo con sensibilità al glutine e può mostrarsi con sintomi non classici o minimi.¹ C'è una componente genetica associata al GSE che è illustrata dimostrando che circa il 5-10% di parenti di primo grado presentano CD sintomatica o asintomatica. I bambini di bassa statura e pazienti con diabete dipendente da insulina e altri disordini autoimmuni dimostrano anche una maggiore probabilità di sviluppo del GSE. Si consiglia una severa dieta priva di glutine per controllare l'attività della malattia e la diagnosi precoce in questi pazienti può migliorare la prognosi generale.²

Letteratura pubblicata suggerisce l'uso di test sierologici per pazienti sospetti di GSE e per monitorare il rispetto della dieta.³⁻⁶ La Società Europea di Gastroenterologia, Epatologia e Nutrizione Pediatrica (ESPGAN) ha consigliato l'inclusione di vari test sierologici per ridurre il numero di biopsie intestinali necessarie per fare una diagnosi.⁷ Rientrano test per anticorpi anti-gliadina (AGA), anti-reticolina (ARA) e anti-endomisio (EMA). Tra questi sono stati studiati maggiormente gli AGA.⁸⁻²⁰ Usando ELISA, entrambi gli AGA classe IgA e IgG AGA sono rilevati in siero di pazienti con GSE. Di questi, gli AGA classe IgG sembrano indicatori di GSE più sensibili ma meno specifici rispetto agli AGA classe IgA. D'altro canto gli AGA classe IgA sono meno sensibili ma più specifici per GSE.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

L'antigene gliadina è legato ai pozzetti di una piastra di micropozzetti in polistirene bloccando i siti che non reagiscono per ridurre il legame non specifico. Controlli, calibratori e siero del paziente diluito sono aggiunti a pozzetti separati consentendo agli anticorpi gliadina presenti di legarsi all'antigene immobilizzato. Il campione non legato viene lavato via e un coniugato IgA e IgG anti-umano marcato con un enzima è aggiunto ad ogni pozzetto. Questi anticorpi coniugati con l'enzima si legano in modo specifico

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 (sang humain normal). La LdD pour IgA était de 1,8 EU/ml. La LdD pour IgG était de 3,7 EU/ml.

Linéarité et récupération

La Linéarité et récupération ont été testées en diluant des échantillons positifs à travers la gamme d'analyse en dilutions équidistantes et en comparant les résultats actuels aux résultats attendus. La gamme linéaire des analyses a été déterminée de 1,8 (LdD) – 160 EU/ml pour IgA et 3,7 (LdD) – 160 EU/ml pour IgG. Les résultats sont résumés ci-dessous :









| IgA | Gamme de test (EU/ml) | Pente (95 % d'IC) | Segment sur l'axe y (95 % D'IC) | R ² | % de récupération (obtenu/attendu) |
|-----|-----------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------|------------------------------------|
| | de 1,2 à 41,6 | 1,03 (de 0,959 à 1,109) | 0,4 (de -1,4 à 2,2) | 0,995 | de 95 à 110 % |
| | de 2,3 à 101,6 | 1,05 (de 0,929 à 1,168) | 2,2 (de -4,6 à 9,0) | 0,987 | de 109 à 115 % |
| | de 4,7 à 273,4 | 0,95 (de 0,887 à 1,014) | 3,0 (de -7,8 à 13,8) | 0,996 | de 93 à 114 % |
| IgG | Gamme de test (EU/ml) | Pente (95 % d'IC) | Segment sur l'axe y (95 % D'IC) | R ² | % de récupération (obtenu/attendu) |
| | de 2,7 à 47,0 | 0,97 (de 0,891 à 1,040) | 0,89 (de -1,3 à 3,1) | 0,994 | de 94 à 117 % |
| | de 12,8 à 116,8 | 0,95 (de 0,957 à 1,046) | -0,24 (de -7,5 à 7,0) | 0,991 | de 90 à 96 % |
| | de 96,8 à 227,0 | 0,96 (de 0,776 à 1,141) | -6,69 (de -39,8 à 26,4) | 0,965 | de 87 à 92 % |

Interférence

L'interférence a été étudiée en mélangeant des sérums sanguins avec des niveaux d'anticorps anti-gliadine connus pour chaque isotype avec des échantillons de sérum interférant potentiellement et en étudiant la déviation par rapport aux résultats attendus. Aucune interférence importante n'a été démontrée pour les substances suivantes aux niveaux indiqués : Hémoglobine (2 g/L), Bilirubine (342 µmol/L), facteur rhumatoïde (100 EU/ml), triglycérides (37 mmol/L) et cholestérol (13 mmol/L).

| | | |
|-------------------------------|---|--|
| 1 x 1,75 ml. | CONTROL+ AGA-G | están impresos en la etiqueta. Preparado para usar control positivo (tapa roja) para [REF] 5117G. Contiene suero humano positivo para anticuerpos IgG anti gliadina. Los valores de concentración esperados en EU/ml. están impresos en la etiqueta. |
| 1 x 1,75 ml. | CONTROL- | Preparado para usar control negativo (tapa blanca). Contiene suero humano. |
| 5 x 1,75 ml. | CALIBRATOR A AGA-A CALIBRATOR B AGA-A CALIBRATOR C AGA-A CALIBRATOR D AGA-A CALIBRATOR E AGA-A | Preparado para usar juego de 5 calibradores para [REF] 5117A. Calibrador A (tapa verde) 160 EU/ml., calibrador B (tapa violeta) 80 EU/ml., calibrador C (tapa azul) 40 EU/ml., calibrador D (tapa amarilla) 20 EU/ml. y calibrador E (tapa anaranjada) 1 EU/ml. Derivado de suero humano que contiene AGA IgA. Las concentraciones en EU/ml. están impresos en las etiquetas. |
| 5 x 1,75 ml. | CALIBRATOR A AGA-G CALIBRATOR B AGA-G CALIBRATOR C AGA-G CALIBRATOR D AGA-G CALIBRATOR E AGA-G | Preparado para usar juego de 5 calibradores para [REF] 5117G. Calibrador A (tapa verde) 160 EU/ml., calibrador B (tapa violeta) 80 EU/ml., calibrador C (tapa azul) 40 EU/ml., calibrador D (tapa amarilla) 20 EU/ml. y calibrador E (tapa anaranjada) 1 EU/ml. Derivado de suero humano que contiene AGA IgG. Las concentraciones en EU/ml. están impresas en las etiquetas. |
| 1 x 15 ml. | IgA-CONJ HRP | Conjugado de anticuerpos IgG con HRP (horseradish peroxidase, peroxidasa del rábano) caprino para [REF] 5117A. Preparada para usar. Color rosa codificado. |
| 1 x 15 ml. | IgG-CONJ HRP | Conjugado de anticuerpos IgG con HRP caprino para [REF] 5117G. Preparada para usar. Color rosa codificado. |
| 1 x 60 ml. | DIL | Diluyente de suero. Preparada para usar. Color azul codificado. |
| 1 x 15 ml. | SUBSTRATE TMB | Substrato de enzima TMB. Preparada para usar. Proteger de la luz. |
| 1 x 15 ml. | STOP H2SO4 | Solución de corte. Preparada para usar. |
| 2 x frasco | BUF WASH | Solución reguladora de polvo. Reconstituye a un litro cada uno. |
| 1 x | | Hojas de protocolo |
| Componentes opcionales | | |
| 1 x 60 ml. | BUF WASH | Solución reguladora concentrada en líquido. Reconstituye a un litro. |

Símbolos usados en las etiquetas

| | |
|--|-------------------------------------|
|  | Número de lote |
|  | Número de catálogo |
|  | Uso para diagnóstico in vitro |
|  | Usado por |
|  | Temperatura de conservación |
|  | Lea las instrucciones antes de usar |
|  | Cantidad de pruebas |
|  | Fabricante |

Materiales requeridos, pero no provistos

- Agua desionizada o destilada
- Botella para apretar para sostener la solución reguladora diluida
- Pipetas con capacidad de distribuir entre 5 µl y 1000 µl
- Puntas de pipetas descartables
- Tubos de ensayo limpios de 12 x 75 mm. y estante para tubo de ensayo
- Reloj automático
- Toallas de papel absorbente
- Lector de microbandeja con capacidad de leer valores de absorbencia a 450 nm. Si se encuentra disponible el lector de microbandeja con longitud de onda doble, el filtro de referencia debe ajustarse a 600-650 nm.
- Lavador automático de microbandeja con capacidad para preparar 200 µl.

RECOLECCIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS

En este procedimiento sólo se deben usar muestras de suero. Las muestras bruscamente hemolizadas, lipémicas o contaminadas microbially pueden interferir con el desempeño de la prueba y no se deben usar. Conserve las muestras entre 2° y 8 °C durante no más de una semana. Para conservarlas por más tiempo, las muestras de suero deben congelarse. Evite congelar y descongelar las muestras varias veces. Se recomienda que las muestras congeladas se usen dentro del periodo de un año.

PROCEDIMIENTO**Notas relativas al procedimiento**

- Lea con atención las instrucciones del producto antes de comenzar el ensayo.
- Equilibre las muestras del paciente y los reactivos de prueba a temperatura ambiente antes de comenzar con el procedimiento de prueba. Las muestras y los reactivos no usados deben volver a colocarse en la heladera inmediatamente después de usarlos.
- Quite de la bolsa las bandas necesarias de las microcubetas y vuelva a sellar la bolsa con cuidado para evitar la condensación en las cubetas no usadas. Vuelva a colocar inmediatamente las bolsas en la heladera.
- Todas las diluciones de las muestras del paciente se deben preparar antes de comenzar con el ensayo.
- **La técnica de buen lavado es fundamental.** Si realiza el lavado manualmente, el lavado adecuado se logra dirigiendo un fuerte chorro de solución reguladora con una botella de lavado de boca ancha por toda la microbandeja. **Se recomienda usar un lavador de microbandejas automático.**

B. Réactivité croisée : Un total de 160 spécimens à réaction potentiellement croisée d'individus avec d'autres troubles auto-immunitaires ont été sélectionnés pour tester les anticorps anti-gliadine à l'aide d'une analyse Immulisa™. Les résultats sont présentés ci-dessous.

| Maladie | n | Anti-gliadine IgA | | Anti-gliadine IgG | |
|-------------------------------|-----|-------------------|-------|-------------------|--------|
| | | n Pos | % Pos | n Pos | % Pos |
| Arthrite rhumatoïdale | 30 | 1 | 3,3 % | 0 | 0,0 % |
| Thyroïdite | 30 | 1 | 3,3 % | 0 | 0,0 % |
| Lupus érythémateux systémique | 30 | 2 | 6,7 % | 3 | 10,0 % |
| Vasculite | 30 | 0 | 0,0 % | 1 | 3,3 % |
| Sclérose systémique | 30 | 0 | 0,0 % | 0 | 0,0 % |
| Rectocolite hémorragique | 15 | 0 | 0,0 % | 1 | 6,7 % |
| Maladie de Crohn | 15 | 1 | 6,7 % | 2 | 13,3 % |
| Total | 180 | 5 | 2,8 % | 7 | 3,9 % |

Précision

La précision a été testée avec de multiples spécimens sélectionnés à travers la gamme de tests. Des tests ont été effectués reproduisant 6 fois chaque échantillon sur 13 jours. Un test supplémentaire de 12 dupliqués a été effectué pour déterminer la répétabilité. Les résultats sont affichés ci-dessous :

| AGA IgA | S n° | Moyenne (EU/ml) | Total d'imprécision | | Entre les jours | | Au cours du test (répétabilité) | |
|------------|------|--------------------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|------------------------------------|--------|
| | | | Écart type (EU/ml) | % C.V. | Écart type (EU/ml) | % C.V. | Écart type (EU/ml) | % C.V. |
| | 1 | 10,4 | 0,536 | 5,2 % | 0,559 | 5,4 % | 0,251 | 2,4 % |
| | 2 | 15,8 | 0,725 | 4,6 % | 0,766 | 4,8 % | 0,281 | 1,8 % |
| | 3 | 24,5 | 1,872 | 7,6 % | 1,949 | 8,0 % | 1,266 | 5,1 % |
| | 4 | 45,9 | 1,700 | 3,7 % | 1,680 | 3,7 % | 1,269 | 2,7 % |
| | 5 | 84,4 | 2,485 | 2,9 % | 2,591 | 3,1 % | 1,291 | 1,5 % |
| | 6 | 116,3 | 5,932 | 5,1 % | 6,174 | 5,3 % | 2,653 | 2,2 % |

| AGA IgG | S n° | Moyenne (EU/ml) | Total d'imprécision | | Entre les jours | | Au cours du test (répétabilité) | |
|------------|------|--------------------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|------------------------------------|--------|
| | | | Écart type (EU/ml) | % C.V. | Écart type (EU/ml) | % C.V. | Écart type (EU/ml) | % C.V. |
| | 1 | 9,3 | 0,846 | 9,1 % | 0,892 | 9,6 % | 0,429 | 4,6 % |
| | 2 | 15,4 | 1,108 | 7,2 % | 1,131 | 7,4 % | 0,316 | 1,9 % |
| | 3 | 24,4 | 2,461 | 10,1 % | 2,615 | 10,7 % | 0,801 | 3,3 % |
| | 4 | 37,1 | 4,429 | 11,9 % | 4,362 | 11,6 % | 0,696 | 2,1 % |
| | 5 | 63,1 | 8,408 | 13,3 % | 8,177 | 12,7 % | 4,027 | 7,4 % |
| | 6 | 127,9 | 11,132 | 8,7 % | 11,288 | 8,7 % | 5,649 | 4,7 % |

Reproductibilité

80 dupliqués d'échantillons dans la gamme négative basse, près du point de coupure, dans la gamme positive modérée et environ ±20 % du point de coupure de l'analyse pour chaque isotype AGA furent effectués afin de déterminer la reproductibilité qualitative. Tous les spécimens produiront 100 % d'accord qualitatif, à l'exception d'un échantillon IgA avec une valeur de 24,4 EU/ml (98 % d'accord qualitatif).

| Maladie | n | Anti-gliadine IgA | | Anti-gliadine IgG | |
|--|-----|-------------------|--------|-------------------|--------|
| | | n Pos | % Pos | n Pos | % Pos |
| Maladie cœliaque | 306 | 133 | 43,5 % | 191 | 62,4 % |
| Maladie cœliaque déficient en IgA | 64 | 0 | 0,0 % | 63 | 98,4 % |
| Maladie cœliaque pédiatrique | 123 | 31 | 25,2 % | 70 | 56,9 % |
| Dermatite herpétiforme | 30 | 11 | 36,7 % | 16 | 53,3 % |
| Arthrite rhumatoïdale | 30 | 1 | 3,3 % | 0 | 0,0 % |
| Thyroïdite | 30 | 1 | 3,3 % | 0 | 0,0 % |
| Lupus érythémateux systémique | 30 | 2 | 6,7 % | 3 | 10,0 % |
| Vasculite | 30 | 0 | 0,0 % | 1 | 3,3 % |
| Sclérose systémique | 30 | 0 | 0,0 % | 0 | 0,0 % |
| Rectocolite hémorragique | 15 | 0 | 0,0 % | 1 | 6,7 % |
| Maladie de Crohn | 15 | 1 | 6,7 % | 2 | 13,3 % |
| Sang humain pédiatrique normal | 130 | 0 | 0,0 % | 4 | 3,1 % |
| Sang humain adulte normal | 139 | 7 | 5,0 % | 6 | 4,3 % |
| Total sang humain normal | 269 | 7 | 2,6 % | 10 | 3,7 % |
| Total sang humain normal et résolution de la maladie | 449 | 12 | 2,7 % | 17 | 3,8 % |

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

L'utilité du dépistage de l'anticorps anti-gliadine Immulisa™ a été évaluée en testant des échantillons sanguins bien caractérisés de patients souffrant de la maladie cœliaque à des échantillons sanguins humains « normaux » et des résolutions de maladie. Ces échantillons ont aussi été testés sur des kits de dépistage disponibles dans le commerce. Seuls les échantillons dans la gamme linéaire de l'essai ont été inclus dans la méthode de comparaison. Ces résultats sont résumés ci-dessous.

A. AGA ELISAs Immulisa™ par comparaison à d'autres AGA ELISAs :

| | | Autre AGA IgA Ab ELISA | | |
|---------------------------------------|-------|------------------------|-----------------------------|-------|
| | | Pos | Nég | Total |
| IMMCO AGA IgA Ab ELISA | Pos | 87 | 24 | 111 |
| | Nég | 1 | 350 | 351 |
| | Total | 88 | 374 | 462 |
| Accord pos | | 98,9 % | (95 % D'IC 92,9 % - 99,9 %) | |
| Accord nég | | 93,6 % | (95 % D'IC 90,5 % - 95,8 %) | |
| % accord global | | 94,6 % | (95 % D'IC 90,7 % - 95,3 %) | |

| | | Autre Gliadine IgG Ab ELISA | | |
|---------------------------------------|-------|-----------------------------|-----------------------------|-------|
| | | Pos | Nég | Total |
| IMMCO AGA IgG Ab ELISA | Pos | 251 | 6 | 257 |
| | Nég | 3 | 156 | 159 |
| | Total | 254 | 162 | 416 |
| Accord pos | | 98,8 % | (95 % D'IC 96,3 % - 99,7 %) | |
| Accord nég | | 96,3 % | (95 % D'IC 91,8 % - 98,5 %) | |
| % accord global | | 97,8 % | (95 % D'IC 95,9 % - 98,9 %) | |

- Use una pipeta multicanal con capacidad de distribuir 8 ó 12 cubetas simultáneamente. Esto acelera el proceso y proporciona tiempos de incubación más uniformes.
- En todos los pasos es importante el control cuidadoso del tiempo. El comienzo de todos los períodos de incubación comienza cuando se termina de agregar el reactivo.
- La adición de todas las muestras y los reactivos se debe realizar en la misma proporción y con la misma secuencia.

Método de prueba

Paso 1 Equilibre todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.

Paso 2 Rotule la hoja de protocolo para indicar la ubicación de la muestra en las cubetas. Una buena práctica de laboratorio es llevar las muestras por duplicado.

Paso 3 Para una **determinación cualitativa** use sólo el calibrador D (*frasco con tapa amarilla*).

o

Para una **determinación semi-cuantitativa** use desde los calibradores A hasta los calibradores E según se representa a continuación en la distribución de muestras.

| Cualitativa | | | | Semi-cuantitativa | | | |
|-------------|--------|-----|------|-------------------|--------|----|------|
| A | Blanco | S5 | Etc. | A | Blanco | 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 |

Paso 4 Prepare una dilución de las muestras del paciente **1:101** mezclando **5 µl** del suero del paciente con **500 µl** de diluyente de suero.

Paso 5 Quite de la bolsa las microcubetas requeridas y vuelva a colocar las bandas no usadas en la bolsa sellada dentro de la heladera. Coloque firmemente las microcubetas en el receptáculo extra provisto.

Paso 6 Coloque con una pipeta **100 µl** de calibradores preparados para usar, controles positivo y negativo y muestras del paciente diluidas (**1:101**) en las microcubetas adecuadas según la hoja de protocolo.

Nota: Incluya una cubeta que contenga **100 µl** de diluyente de suero como un blanco de reactivo. Reduzca a cero el lector ELISA contra el blanco de reactivo.

Paso 7 Incube **30 minutos** (± 5 min.) a temperatura ambiente.

Paso 8 Lave **4x** con solución reguladora. Para lavado manual, llene cada microcubeta con solución reguladora reconstituida. Descarte el fluido invirtiendo y golpeando ligeramente cada cubeta o aspirando el líquido de cada cubeta. Para secar al finalizar el último lavado, invierta las bandas y seque vigorosamente las cubetas con toallas de papel absorbente. Para lavadoras automáticas, programe la lavadora de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Paso 9 Coloque con una pipeta **100 µl** de conjugado en las microcubetas.

- Paso 10** Incube **30 minutos** (\pm 5 min.) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave todas las microcubetas según se indica en el Paso 8.
- Paso 12** Coloque con una pipeta **100 μ l** de substrato de enzima en cada microcubeta en el mismo orden y el mismo tiempo que para el conjugado.
- Paso 13** Incube **30 minutos** (\pm 5 min.) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Coloque con una pipeta **100 μ l** de solución de corte en cada microcubeta empleando el mismo orden y el mismo tiempo que para la adición del substrato de enzima. Lea los valores de absorbencia dentro de los 30 minutos de agregar la solución de corte.
- Paso 15** Lea la absorbencia de cada microcubeta a **450 nm** si usa un lector de microbandeja con longitud de onda simple, o a 450/630 nm si usa uno doble contra un blanco de reactivo ajustado a absorbencia cero.

Control de calidad

Los calibradores, los controles positivo y negativo y un blanco de reactivo se deben llevar con cada ensayo para verificar la integridad y precisión de la prueba. La lectura de absorbencia de cada blanco de reactivo debe ser $<0,3$. El calibrador A debe tener una lectura de absorbencia de no menos de 1,0; de lo contrario, se deberá repetir la prueba. El control negativo debe ser <10 EU/ml. Si la prueba se lleva por duplicado, se debe tomar el promedio de las dos lecturas para determinar las unidades. Cuando desarrolla 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 determinaciones semi-cuantitativas, el control positivo debe dar valores que se encuentren dentro del rango establecido en el frasco.

RESULTADOS

Cálculos

Las concentraciones de las muestras del paciente se pueden determinar por cualquiera de los dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. de la muestra de prueba

----- X Unidades del calibrador D = Unidades de la muestra de prueba

Abs. del calibrador D

Se recomienda que los resultados cualitativos se informen como "positivos" o "negativos". Los resultados de muestras mayores que o iguales al calibrador D se consideran positivos. Los resultados cualitativos positivos se deben confirmar con un ensayo semi-cuantitativo que se lleva para determinar las unidades y calcular los resultados en comparación con los valores de referencia aplicables según se indica en Interpretación.

2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTITATIVA

Trace la absorbencia del calibrador A por E contra sus respectivas concentraciones en papel logarítmico. Trace las concentraciones en EU/ml. en el eje X contra la absorbencia en el eje Y y dibuje un ajuste de curva en punto. Determine las concentraciones de las muestras del paciente a partir de la curva de acuerdo con los valores de absorbencia correspondientes. Alternativamente, una curva de cuatro parámetros se puede usar para trazar la curva estándar.

Se recomienda que los resultados semi-cuantitativos se informen como "positivos", "negativos", o "indeterminados" con los valores de la unidad EU/ml. Las pruebas con

2. DÉTERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Tracer l'absorbance des calibreurs 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 de rapporter les résultats semi-quantitatifs comme « positif », « négatif » ou « indéterminé » avec des valeurs unitaires EU/ml. Les résultats indéterminés/limites doivent être retestés et évalués avec d'autres méthodes d'analyse, comme indiqué dans les **Limites de la Procédure**.

Interprétation

Les valeurs d'interprétation ont été déterminées par le test de 64 spécimens de donneurs de sang normaux ne souffrant pas de la maladie. La moyenne des sujets normaux plus 3 écart-type a été établie comme le point de coupure de l'analyse et a reçu une valeur arbitraire de 20 EU/ml. Les informations suivantes ne sont fournies qu'à titre de guide pour l'interprétation des résultats de laboratoire. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

| Valeur Ab 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

Ce test ne doit pas être effectué sur des échantillons grossièrement hémolysés, contaminés par des microbes ou lipémiques. Cette méthode ne doit être utilisée que pour le dépistage des échantillons de sang humain.

Les résultats des tests servent d'aide au diagnostic et ne doivent pas être interprétés comme diagnostic en eux-mêmes. Chez les patients atteints de MC déficient en IgA, les AGA IgA peuvent être négatifs.

VALEURS ATTENDUES

Les valeurs attendues dans une population normale sont négatives. Toutefois, il a été déterminé que certains individus apparemment sains et asymptomatiques peuvent donner des résultats positifs aux anticorps anti-gliadine IgA ou IgG.

Des jeux d'échantillons cliniques ont été testés sur des ELISA AGA ImmuLisa™ Les résultats démontrant l'incidence sur les populations de cette étude sont fournis ci-dessous.

- 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** Verser **100 µl** à la pipette 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** Verser **100 µl** à la pipette 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** Verser **100 µl** à la pipette 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.

Contrôle de la qualité

Les calibreurs, 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 calibreur A ne doit pas avoir un résultat d'absorbance inférieur à 1,0, sinon le test doit être répété. La résolution négative doit être < 10 EU/ml. Si le test est effectué en dupliqué, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer les unités. Lors de l'exécution des déterminations qualitatives, la densité optique du Calibreur 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

----- X unités de calibreur D = unités échantillon témoin

Abs. de calibreur D

Il est recommandé de rapporter les résultats qualitatifs comme « positif » ou « négatif ». Les échantillons donnant des résultats supérieurs ou égaux au Calibreur D sont considérés comme positifs. Les résultats positifs doivent être confirmés par une analyse semi-quantitative pour déterminer les unités et évaluer les résultats en comparaison aux gammes de référence applicables comme indiqué dans l'Interpretation.

resultados indeterminados o límite deben realizarse nuevamente y evaluarse con otros métodos de laboratorio, según se indica en **Restricciones del procedimiento**.

Interpretación

Los valores de interpretación se determinaron probando 64 dadores normales de sangre y muestras de control de la enfermedad. El promedio de estos sujetos más 3SD se estableció como el punto de corte del ensayo y se asignó un valor arbitrario de 20 EU/ml. La siguiente información sirve sólo como guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio debe determinar sus propios valores normales.

| Valor ab de gliadina | Interpretación |
|----------------------|------------------------|
| <20 EU/ml. | Negativo |
| 20-25 EU/ml. | Indeterminado (límite) |
| >25 EU/ml. | Positivo |

Calibrador

Los calibreadores preparados para usar están incluidos para proporcionar semi-cuantización y se deben usar con cada serie. Las muestras de pacientes que contienen altos niveles de anticuerpos pueden dar valores de absorbencia mayores que los del calibreador A. Para determinar valores semi-cuantitativos precisos, dichas muestras luego se deben diluir para que ingresen dentro de los valores de la curva del calibreador cuando se realiza la prueba nuevamente. Para determinar los valores EU/ml., multiplique las unidades obtenidas por el valor de dilución.

RESTRICCIONES DEL PROCEDIMIENTO

No se debe realizar esta prueba en muestras bruscamente hemolizadas, contaminadas microbially o lipémicas. Este método se debe usar sólo para probar muestras de suero humano.

Los resultados obtenidos sirven sólo como una ayuda en el diagnóstico y no deben interpretarse como diagnósticos en sí. En pacientes con EC con insuficiente IgA, AGA IgA puede ser negativo.

VALORES ESPERADOS

Los valores esperados en una población normal son negativos. Sin embargo, se determina que algunos individuos asintomáticos, aparentemente sanos pueden tener resultado positivo a los anticuerpos antigliadina IgA o IgG.

Se probaron grupos de muestras clínicas con ELISA para detectar AGA Immulisa™. A continuación se proporcionan los resultados que demuestran incidencia en la población para este estudio.

| Enfermedad | n | IgA anti gliadina | | IgG anti gliadina | |
|--|-----|-------------------|-------|-------------------|-------|
| | | n Pos | % Pos | n Pos | % Pos |
| Enfermedad celíaca | 306 | 133 | 43,5% | 191 | 62,4% |
| Enfermedad celíaca con insuficientes IgA | 64 | 0 | 0,0% | 63 | 98,4% |
| Enfermedad celíaca pediátrica | 123 | 31 | 25,2% | 70 | 56,9% |
| Dermatitis herpetiforme | 30 | 11 | 36,7% | 16 | 53,3% |
| Artritis reumatoide | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Tiroiditis | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Lupus eritematoso sistémico | 30 | 2 | 6,7% | 3 | 10,0% |
| Vasculitis | 30 | 0 | 0,0% | 1 | 3,3% |
| Esclerosis sistémica | 30 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| Colitis ulcerosa | 15 | 0 | 0,0% | 1 | 6,7% |
| Enfermedad de Crohn | 15 | 1 | 6,7% | 2 | 13,3% |
| Suero humano normal pediátrico | 130 | 0 | 0,0% | 4 | 3,1% |
| Suero humano normal en adultos | 139 | 7 | 5,0% | 6 | 4,3% |
| Total de suero humano normal (NHS, por sus siglas en inglés) | 269 | 7 | 2,6% | 10 | 3,7% |
| Total de NHS y control de la enfermedad | 449 | 12 | 2,7% | 17 | 3,8% |

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

La utilidad de ELISA para detectar anticuerpo anti gliadina ImmuLisa™ se evaluó realizando pruebas a pacientes con enfermedad celíaca durante los controles de la enfermedad y el suero humano "normal". Estas muestras también se probaron en equipos de pruebas disponibles comercialmente. Sólo muestras en el rango lineal del ensayo se incluyeron en la comparación del método. Estos resultados se resumen a continuación.

A. ELISA para detectar AGA ImmuLisa™ vs. otros ELISA para detectar AGA:

| | | Otros ELISA AGA Ab IgG | | |
|------------------|-------|------------------------|------------------------|-------|
| | | Pos | Neg | Total |
| ELISA AGA Ab IgA | Pos | 87 | 24 | 111 |
| | Neg | 1 | 350 | 351 |
| IMMCO | Total | 88 | 374 | 462 |
| Acuerdo Pos | | 98,9% | (95% CI 92,9% - 99,9%) | |
| Acuerdo Neg | | 93,6% | (95% CI 90,5% - 95,8%) | |
| Acuerdo total% | | 94,6% | (95% CI 90,7% - 95,3%) | |

- **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 (*fiolle 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.

| Qualitative | | | | Semi-quantitative | | | |
|-------------|-----------------|-----|------|-------------------|-----------------|----|------|
| A | Vide | S5 | Etc. | A | Vide | S1 | Etc. |
| B | Résolution nég. | S6 | | B | Résolution nég. | S2 | |
| C | Résolution pos. | S7 | | C | Résolution pos. | 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 |

- 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** Verser **100 µl** à la pipette de 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.

Symboles utilisés sur les étiquettes

| | |
|--|---|
|  | Numéro de lot |
|  | Numéro de catalogue |
|  | Utilisation avec diagnostic in vitro |
|  | À utiliser avant le |
|  | Température de stockage |
|  | Lire les instructions avant utilisation |
|  | Nombre de tests |
|  | Fabricant |

Matériaux nécessaires mais non fournis

- de l'eau déminéralisée ou distillée
- une pissette en plastique pour contenir le tampon de lavage dilué
- des pipettes capables de distribuer entre 5 µl et 1 000 µl
- des têtes de pipettes jetables
- des tubes à essai propres de 12 x 75 mm et portoir
- un compte-minutes
- des serviettes en papier absorbantes
- un lecteur de microplaques capable de lire les valeurs d'absorption à 450 nm. Si un lecteur de microplaques à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être configuré à 600-650 nm.
- un laveur automatique de microplaques capable de distribuer 200 µl

COLLECTE ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

Seuls les échantillons de sang doivent être utilisés dans cette procédure. Les spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou contaminés par des microbes peuvent interférer avec la performance du test et ils ne doivent pas être utilisés. Stocker les spécimens entre 2 et 8 °C et pas plus d'une semaine. Pour un stockage plus long, les échantillons de sang doivent être congelés. Éviter les congélations et décongélations répétées des échantillons. Il est recommandé que les échantillons congelés soient testés dans l'année.

PROCÉDURE**Notes de procédure**

- Lire attentivement l'encart du produit 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. 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.
- Toutes les dilutions des échantillons des patients doivent être préparées avant de commencer l'analyse.

Otros ELISA gliadina Ab IgG

| | | | | |
|---|-------|----------------|------------------------------|-------|
| | | Pos | Neg | Total |
| ELISA AGA Ab IgG IMMCO | Pos | 251 | 6 | 257 |
| | Neg | 3 | 156 | 159 |
| | Total | 254 | 162 | 416 |
| | | Acuerdo Pos | 98,8% (95% CI 96,3% - 99,7%) | |
| | | Acuerdo Neg | 96,3% (95% CI 91,8% - 98,5%) | |
| | | Acuerdo total% | 97,8% (95% CI 95,9% - 98,9%) | |

B. Reactividad cruzada: Un total de 160 sueros de individuos con otros desórdenes autoinmunes de reacción cruzada potencial se seleccionaron para probarlos para los anticuerpos anti gliadina usando el ensayo Immulisa™. Los resultados aparecen a continuación.

| Enfermedad | n | IgA anti gliadina | | IgG anti gliadina | |
|-----------------------------|----------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| | | n Pos | % Pos | n Pos | % Pos |
| Artritis reumatoide | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Tiroiditis | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% |
| Lupus eritematoso sistémico | 30 | 2 | 6,7% | 3 | 10,0% |
| Vasculitis | 30 | 0 | 0,0% | 1 | 3,3% |
| Esclerosis sistémica | 30 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| Colitis ulcerosa | 15 | 0 | 0,0% | 1 | 6,7% |
| Enfermedad de Crohn | 15 | 1 | 6,7% | 2 | 13,3% |
| Total | 180 | 5 | 2,8% | 7 | 3,9% |

Precisión

La precisión se probó con muestras positivas seleccionadas en todo el rango del ensayo. Series de ensayo de 6 reproducciones exactas de cada muestra se realizaron en 13 días. La repetitividad se determinó con 12 reproducciones de cada muestra. Los resultados se muestran a continuación.

| AGA IgA | S N° | Imprecisión total | | | Entre días | | Dentro de la serie (Repetitividad) | |
|--------------------|-------------|------------------------------|------------------------|------------|------------------------|------------|---|------------|
| | | Promedio (EU/ml.) | SD (EU/ml.) | CV% | SD (EU/ml.) | CV% | SD (EU/ml.) | CV% |
| | 1 | 10,4 | 0,536 | 5,2% | 0,559 | 5,4% | 0,251 | 2,4% |
| | 2 | 15,8 | 0,725 | 4,6% | 0,766 | 4,8% | 0,281 | 1,8% |
| | 3 | 24,5 | 1,872 | 7,6% | 1,949 | 8,0% | 1,266 | 5,1% |
| | 4 | 45,9 | 1,700 | 3,7% | 1,680 | 3,7% | 1,269 | 2,7% |
| | 5 | 84,4 | 2,485 | 2,9% | 2,591 | 3,1% | 1,291 | 1,5% |
| | 6 | 116,3 | 5,932 | 5,1% | 6,174 | 5,3% | 2,653 | 2,2% |

| AGA IgG | S N° | Imprecisión total | | | Entre días | | Dentro de la serie (Repetitividad) | |
|--------------------|-------------|------------------------------|------------------------|------------|------------------------|------------|---|------------|
| | | Promedio (EU/ml.) | SD (EU/ml.) | CV% | SD (EU/ml.) | CV% | SD (EU/ml.) | CV% |
| | 1 | 9,3 | 0,846 | 9,1% | 0,892 | 9,6% | 0,429 | 4,6% |
| | 2 | 15,4 | 1,108 | 7,2% | 1,131 | 7,4% | 0,316 | 1,9% |
| | 3 | 24,4 | 2,461 | 10,1% | 2,615 | 10,7% | 0,801 | 3,3% |
| | 4 | 37,1 | 4,429 | 11,9% | 4,362 | 11,6% | 0,696 | 2,1% |
| | 5 | 63,1 | 8,408 | 13,3% | 8,177 | 12,7% | 4,027 | 7,4% |

6 127,9 11,132 8,7% 11,288 8,7% 5,649 4,7%

Reproducibilidad

80 reproducciones de muestras dentro de los valores negativos bajos, cerca del punto de corte, dentro de los valores positivos moderados y aproximadamente +/-20% de los valores de corte del ensayo para cada isotipo AGA se realizaron para determinar la reproducibilidad cualitativa. Todas las muestras produjeron un acuerdo cualitativo del 100%, excepto una muestra de IgA con un valor de 24,4 EU/ml. (98% de acuerdo cualitativo).

Límite de detección

El límite de detección (LoD, por sus siglas en inglés) se determinó basándose en 60 repeticiones del blanco y 10 repeticiones cada una de 6 muestras de bajo nivel (NHS). El valor LoD se determinó a 1,8 EU/ml. para IgA y 3,7 EU/ml. para IgG.

Linealidad y recuperación

Linealidad y recuperación se probaron diluyendo muestras positivas dentro de los valores del ensayo en diluciones equidistantes y comparando los resultados reales con los esperados. El valor lineal del ensayo se determina en 1,8 (LoD) – 160 EU/ml. para IgA y 3,7(LoD) – 160 EU/ml. para IgG. Los resultados se resumen a continuación.

| IgA | Valores de la prueba (EU/ml.) | Inclinación (95% CI) | Intercep Y (95% CI) | R ² | Recuperación % (Obtnd/Esprd) |
|-----|-------------------------------|-------------------------|----------------------|----------------|------------------------------|
| | 1,2 a 41,6 | 1,03 (0,959 a 1,109) | 0,4 (-1,4 a 2,2) | 0,995 | 95% a 110% |
| | 2,3 a 101,6 | 1,05 (0,929 a 1,168) | 2,2 (-4,6 a 9,0) | 0,987 | 109% a 115% |
| | 4,7 a 273,4 | 0,95 (0,887 a 1,014) | 3,0 (-7,8 a 13,8) | 0,996 | 93% a 114% |

| IgG | Valores de la prueba (EU/ml.) | Inclinación (95% CI) | Intercep Y (95% CI) | R ² | Recuperación% (Obtnd/Esprd) |
|-----|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|-----------------------------|
| | 2,7 a 47,0 | 0,97 (0,891 a 1,040) | 0,89 (-1,3 a 3,1) | 0,994 | 94% a 117% |
| | 12,8 a 116,8 | 0,95 (0,957 a 1,046) | -0,24 (-7,5 a 7,0) | 0,991 | 90% a 96% |
| | 96,8 a 227,0 | 0,96 (0,776 a 1,141) | -6,69 (-39,8 a 26,4) | 0,965 | 87% a 92% |

Interferencia

Interferencia se estudió mezclando suero con niveles conocidos de anticuerpo anti gliadina para cada isotipo con muestras de suero potencialmente interviniente y estudiando la desviación de los resultados esperados. No se demostró una interferencia significativa para las siguientes sustancias a los niveles indicados: Hemoglobina (2 g/L), bilirrubina (342 µmol/L), factor reumatoide (100 EU/ml), triglicéridos (37 mmol/L) y colesterol (13 mmol/L).

12 x 8 MICROPLATE|AGA

Microplaque avec micropuits détachables individuels. Enduits d'antigène gliadine. Prêt à l'emploi.

1 x 1,75 ml CONTROL+|AGA-A

Prêt à l'emploi. Résolution positive (capuchon rouge) pour REF 5117A. Contient du sang humain positif pour les anticorps anti-gliadine IgA. La gamme de concentration attendue en EU/ml est imprimée sur l'étiquette.

1 x 1,75 ml CONTROL+|AGA-G

Prêt à l'emploi. Résolution positive (capuchon rouge) pour REF 5117G. Contient du sang humain positif pour les anticorps anti-gliadine IgG. La gamme de concentration attendue en EU/ml est imprimée sur l'étiquette.

1 x 1,75 ml CONTROL-

Prêt à l'emploi. **Contrôle négatif** (capuchon blanc). Contient du sang humain.

5 x 1,75 ml CALIBRATOR|A|AGA-A

Jeu de 5 calibreurs prêts à l'emploi pour REF 5117A. Calibreur A (capuchon vert) 160 EU/ml, Calibreur B (capuchon violet) 80 EU/ml, Calibreur C (capuchon bleu) 40 EU/ml, Calibreur D (capuchon jaune) 20 EU/ml et Calibreur E (capuchon orange) 1 EU/ml. Dérivé de sérum humain contenant des AGA IgA. Les concentrations en EU/ml sont imprimées sur les étiquettes.

CALIBRATOR|B|AGA-A

CALIBRATOR|C|AGA-A

CALIBRATOR|D|AGA-A

CALIBRATOR|E|AGA-A

5 x 1,75 ml CALIBRATOR|A|AGA-G

Jeu de 5 calibreurs prêts à l'emploi pour REF 5117G. Calibreur A (capuchon vert) 160 EU/ml, Calibreur B (capuchon violet) 80 EU/ml, Calibreur C (capuchon bleu) 40 EU/ml, Calibreur D (capuchon jaune) 20 EU/ml et Calibreur E (capuchon orange) 1 EU/ml. Dérivé de sérum humain contenant des AGA IgG. Les concentrations en EU/ml sont imprimées sur les étiquettes.

CALIBRATOR|B|AGA-G

CALIBRATOR|C|AGA-G

CALIBRATOR|D|AGA-G

CALIBRATOR|E|AGA-G

1 x 15 ml IgA-CONJ|HRP

Conjugué anticorps de chèvre anti-IgG humaines pour REF 5117A. Prêt à l'emploi. Couleur de codage rose.

1 x 15 ml IgG-CONJ|HRP

Conjugué anticorps de chèvre anti-IgG humaines pour REF 5117G. Prêt à l'emploi. Couleur de codage rose.

1 x 60 ml DIL

Diluant pour sérum. Prêt à l'emploi. Couleur de codage bleu.

1 x 15 ml SUBSTRATE|TMB

Substrat d'enzyme : TMB. Prêt à l'emploi. **Protéger de la lumière.**

1 x 15 ml STOP|H2SO4

Solution d'arrêt. Prêt à l'emploi.

2 x fioles BUF|WASH

Tampon de lavage en poudre **À reconstituer à 1 litre chacun.**

1 x

Feuilles de protocole

Composants en option

1 x 60 ml BUF|WASH

Tampon de lavage à forte concentration de liquide. **À reconstituer à 1 litre.**

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Les anticorps anti-gliadine sont liés dans les puits d'une plaque de micropuits en polystyrène suivi par le blocage des sites n'ayant pas réagi afin de réduire les liaisons non spécifiques. Les résolutions, les calibreurs et les échantillons sanguins dilués du patient sont ajoutés dans des puits séparés, permettant à tout anticorps anti-gliadine présent de se lier à l'antigène immobilisé. Les échantillons non liés sont lavés et une enzyme étiquetée conjuguée IgA ou IgG anti-humain est ajoutée à chaque puits. Ces anticorps en conjugué dans l'enzyme se lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine de la classe appropriée. Après le lavage de tout conjugué non lié, le substrat d'enzyme spécifique (TMB) est alors ajouté aux puits. Après l'arrêt de la réaction enzymatique, l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnelle à la concentration en anti-corps, est lue par un spectromètre à 450 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA par millimètre (EU/ml).

RÉACTIFS

Stocker tous les réactifs entre 2 et 8 °C. **Ne pas congeler.** Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration lorsque stockés et manipulés comme indiqué.

Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être ramenés à température ambiante (entre 20 et 25 °C) avant utilisation.

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

Les bandes de micropuits enduits sont à usage unique. Les bandes de micropuits non utilisées doivent être rescellées avec précaution dans le sachet contenant les dessiccateurs afin d'empêcher la condensation et stockées entre 2 et 8 °C.

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 du sang humain et les échantillons des patients doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire en matière de stockage, de distribution et d'élimination de ces matériaux.²¹

La solution d'arrêt est une solution d'acide sulfurique dilué. L'acide sulfurique (H₂SO₄) est toxique et corrosif. Ne pas ingérer et éviter le contact avec la peau et les yeux. Éviter l'exposition aux bases, aux métaux ou à d'autres composés qui peuvent réagir avec des acides.

Le substrat d'enzyme TMB contient un irritant qui peut être néfaste si inhalé, ingéré ou absorbé par la peau. Ne pas ingérer et éviter le contact avec la peau et les yeux.

Les instructions doivent être suivies à la lettre comme elles sont présentées dans l'encart du kit pour assurer des résultats valides. Ne pas échanger les composants du kit avec ceux d'autres sources. Respecter les bonnes pratiques de laboratoire pour minimiser la contamination microbienne et croisée des réactifs lors de la manipulation. Ne pas utiliser les composants du kit au-delà de la date d'expiration inscrite sur les étiquettes.

Matériaux fournis

ImmuLisa™ AGA IgA ELISA

REF 5117A

ImmuLisa™ AGA IgG ELISA

REF 5117G

Les kits contiennent suffisamment de réactifs pour effectuer 96 mesures.



ImmuLisa™

AGA Enhanced ELISA

Gliadin IgA oder IgG Antikörper ELISA

IVD Für in Vitro Diagnosezwecke

CLIA-Komplexität: Hoch

CDC-Analyt-Identifikationscode: 0528

CDC-Testsystem-Identifikationscode: 28513/28514

BEIPACKTEXT

REF 5117A AGA IgA ELISA 96 Bestimmungen

REF 5117G AGA IgG ELISA 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelte Immunadsorptionstests (ELISA) zur Erkennung und Semiquantifizierung von IgA oder IgG Antigliadin-Antikörpern im Humanserum zur Unterstützung bei der Diagnose von Patienten mit Zöliakie und Dermatitis herpetiformis.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die glutensensitive Enteropathie (GSE), d. h., Zöliakie (CD) und Dermatitis herpetiformis (DH), ist eine gewöhnliche klinisch heterogene Magen-Darm-Störung mit Empfindlichkeit gegenüber Gluten. Sie kann sich mit nicht klassischen oder minimalen Symptomen zeigen.¹ Es gibt eine genetische Komponente, die mit GSE verbunden ist, was sich dadurch zeigt, dass ungefähr 5-10 % der Angehörigen ersten Grades symptomatische oder asymptomatische CD aufweisen. Kinder mit Kleinwuchs und Patienten mit insulinabhängiger Zuckerkrankheit und anderen Autoimmunerkrankungen zeigen auch eine größere Wahrscheinlichkeit auf, GSE zu entwickeln. Die strikte Vermeidung von Gluten bei der Ernährung wird empfohlen, um die Krankheitsaktivität zu kontrollieren. Eine frühe Diagnose bei solchen Patienten kann deren gesamte Prognose verbessern.²

Die veröffentlichte Literatur schlägt für Patienten, bei denen GSE vermutet wird, die Verwendung serologischer Tests und die Überwachung der Einhaltung der Diät vor.³⁻⁶ Die Europäische Gesellschaft für pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung (ESPGAN) empfahl die Einbindung von verschiedenen serologischen Prüfungen, um die Anzahl der erforderlichen intestinalen Biopsien zur Erstellung einer Diagnose zu vermindern.⁷ Diese umfassen Tests auf Anti-Gliadin- (AGA), Anti-Retikulin- (ARA) und antiendomysiale (EMA) Antikörper. AGA wurde unter diesen am meisten studiert.⁸⁻²⁰ Mit Hilfe von ELISA werden sowohl IgA als auch IgG Klassen AGA in Seren von Patienten mit GSE nachgewiesen. IgG Klasse AGA scheinen empfindlichere aber weniger spezifische Indikatoren von GSE als IgA Klassen AGA zu sein. IgA Klasse AGA sind andererseits weniger empfindlich, aber spezifischer für GSE.

GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS

Gliadin-Antigen wird mit den Vertiefungen einer Polystyrol-Mikrotiterplatte gebunden gefolgt von der Blockade der unreaktierten Stellen, um das nichtspezifische Binden zu reduzieren. Kontrollen, Kalibratoren und verdünnte Patientenserum werden in separate Vertiefungen

hinzugefügt und ermöglichen irgendwelchen vorhandenen Gliadin-Antikörpern sich an das immobilisierte Antigen zu binden. Die ungebundene Probe wird abgewaschen und ein enzymmarkiertes anti-menschliches IgA oder IgG Konjugat wird zu jeder Vertiefung hinzugefügt. Diese Enzym konjugierten Antikörper binden sich spezifisch mit dem menschlichen Immunglobulin der entsprechenden Klasse. Nach dem Abwaschen jedes ungebundenen Konjugats wird dann spezifisches Enzymsubstrat (TMB) zu den Vertiefungen hinzugefügt. Nach dem Stoppen der enzymatischen Reaktion wird die Intensität des Farbwechsels, der zur Konzentration an Antikörpern proportional ist, durch ein Spektralphotometer bei 450 nm abgelesen. Die Resultate sind in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) ausgedrückt.

REAGENZIEEN

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 das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.

Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar.

Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind zur einmaligen Anwendung bestimmt. Ungebrauchte Mikrotiterstreifen sollten im Trocknungsmittel enthaltenden Beutel sorgfältig wieder versiegelt werden, um Kondensation zu verhindern, und bei 2-8 °C gelagert werden.

Vorsichtsmaßnahmen

Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten als potenziell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis.²¹

Die Stopplösung ist eine verdünnte Schwefelsäurelösung. Schwefelsäure (H₂SO₄) ist giftig und ätzend. Nicht einnehmen und den Kontakt mit der Haut und den Augen vermeiden. Vermeiden Sie die Exposition gegenüber Basen, Metallen oder anderen Verbindungen, die mit Säuren reagieren können.

TMB-Enzymsubstrat enthält einen Reizstoff, der schädlich sein kann, wenn er eingeatmet, aufgenommen oder durch die Haut absorbiert wird. Nicht einnehmen und den Kontakt mit der Haut und den Augen vermeiden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kit-Komponenten nicht mit denjenigen von anderen Quellen aus. Befolgen Sie die Regeln der Guten Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatum verwenden.

Mitgelieferte Materialien

ImmuLisa™ AGA IgA ELISA

REF 5117A

ImmuLisa™ AGA IgG ELISA

REF 5117G

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen.



ImmuLisa™

ELISA amélioré aux anticorps anti-gliadines

Anticorps IgA ou IgG anti-gliadine ELISA

IVD Pour utilisation avec diagnostic *in vitro*

Complexité CLIA : Élevée

Code d'identification d'analyse du CDC : 0528

Code d'identification du système de test du CDC : 28513/28514

ENCART DE PRODUIT

| | | | |
|-----|-------|---------------|------------|
| REF | 5117A | AGA IgA ELISA | 96 mesures |
| REF | 5117G | AGA IgG ELISA | 96 mesures |

APPLICATION

Immunoessais associés aux enzymes (ELISA) pour la détection et la semi-quantification des anticorps anti-gliadines IgA ou IgG dans le sang afin d'aider au diagnostic des patients souffrant de la maladie cœliaque et de dermatite herpétiforme.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

L'entéropathie sensible au gluten (ESG), c'est-à-dire la maladie cœliaque (MC) et la dermatite herpétiforme (DH), est une maladie gastrointestinale hétérogène clinique courante avec une sensibilité au gluten qui peut présenter des symptômes non classiques ou minimum.¹ Il existe une certaine composante génétique associée à l'ESG qui est illustrée en montrant qu'environ 5 à 10 % des relations de parents du premier degré sont atteintes de MC symptomatique ou asymptomatique. Les enfants de petite taille et les patients atteints de diabète dépendant d'insuline et autres maladies autoimmunes font preuve aussi d'une plus grande probabilité de développer l'ESG. Un régime strictement sans gluten est recommandé pour contrôler l'activité de la maladie et le diagnostic précoce de tels patients peut améliorer leur pronostic global.²

La littérature publiée suggère l'utilisation de tests sérologiques pour les patients qui sont suspectés de souffrir d'ESG et pour surveiller le respect du régime alimentaire.³⁻⁶ La Société européenne de gastro-entérologie, hépatologie et nutrition pédiatriques (ESPGHAN) a recommandé l'inclusion de divers tests sérologiques afin de réduire le nombre de biopsies intestinales nécessaires à la génération de diagnostics.⁷ Ces tests comprennent des tests pour les anticorps anti-gliadine (AGA), anti-réticuline (ARA) et anti-endomysium (EMA). Parmi ceux-ci, les AGA ont été les plus étudiés.⁸⁻²⁰ En utilisant ELISA, les AGA à la fois des classes IgA et IgG sont détectés dans le sang des patients souffrant d'ESG. Parmi ces dernières, les AGA de la classe IgG semblent être plus sensibles mais des indicateurs moins spécifiques de l'ESG que les AGA de la classe IgA. Par contraste, les AGA de la classe IgA sont moins sensibles mais plus spécifiques pour l'ESG.

DE

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde basierend auf 60 Replikaten der Leerprobe und 10 Replikaten von je 6 Proben auf niedriger Stufe (NHS) bestimmt. LoD wurde bestimmt zu 1,8 EU/ml für IgA und 3,7 EU/ml für IgG.

Linearität und Rückgewinnung

Die Linearität und Rückgewinnung wurde mittels Verdünnen positiver Proben im ganzen Prüfungsbereich in abstandsgleichen Verdünnungen und dem Vergleichen tatsächlicher Resultate gegenüber erwarteten Resultaten geprüft. Der lineare Bereich der Prüfung wurde bestimmt zu 1,8 (LoD) - 160 EU/ml für IgA und 3,7(LoD) – 160 EU/ml für IgG. Die Resultate sind nachstehend zusammengefasst.

| IgA | Prüfbereich (EU/ml) | Anstieg (95% CI) | Y-Achsenabschnitt (95 % CI) | R ² | % Rückgewinnung (Erhalt./Erw.) |
|-----|---------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------|--------------------------------|
| | 1,2 bis 41,6 | 1,03 (0,959 bis 1,109) | 0,4 (-1,4 bis 2,2) | 0,995 | 95 bis 110% |
| | 2,3 bis 101,6 | 1,05 (0,929 bis 1,168) | 2,2 (-4,6 bis 9,0) | 0,987 | 109 bis 115% |
| | 4,7 bis 273,4 | 0,95 (0,887 bis 1,014) | 3,0 (-7,8 bis 13,8) | 0,996 | 93 bis 114% |
| IgG | Prüfbereich (EU/ml) | Anstieg (95% CI) | Y-Achsenabschnitt (95 % CI) | R ² | % Rückgewinnung (Erhalt./Erw.) |
| | 2,7 bis 47,0 | 0,97 (0,891 bis 1,040) | 0,89 (-1,3 bis 3,1) | 0,994 | 94 bis 117% |
| | 12,8 bis 116,8 | 0,95 (0,957 bis 1,046) | -0,24 (-7,5 bis 7,0) | 0,991 | 90 bis 96% |
| | 96,8 bis 227,0 | 0,96 (0,776 bis 1,141) | -6,69 (-39,8 bis 26,4) | 0,965 | 87 bis 92% |









Interferenz

Interferenz wurde durch Mischen von Seren mit bekannten Gliadin-Antikörper-Spiegeln für jeden Isotyp mit sich potenziell gegenseitig beeinflussenden Serumproben und der Abweichung von erwarteten Resultaten studiert. Keine bedeutende Interferenz wurde für die folgenden Substanzen bei den angezeigten Spiegeln demonstriert: Hämoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 µmol/L), Rheumafaktor (100 EU/ml), Triglyceride (37 mmol/L) und Cholesterin (13 mmol/L).

DE

| | | |
|------------------------------|---|---|
| 12 x 8 | MICROPLATE AGA | Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, Beschichtet mit Gliadin-Antigen. Gebrauchsfertig. |
| 1 x 1,75 ml | CONTROL+ AGA-A | Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (rote Kappe) für REF 5117A. Enthält Humanserum positiv für Gliadin IgA Antikörper. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt. |
| 1 x 1,75 ml | CONTROL+ AGA-G | Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (rote Kappe) für REF 5117G. Enthält Humanserum positiv für Gliadin IgG Antikörper. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt. |
| 1 x 1,75 ml | CONTROL- | Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (weiße Kappe) . Enthält Humanserum. |
| 5 x 1,75 ml | CALIBRATOR A AGA-A CALIBRATOR B AGA-A CALIBRATOR C AGA-A CALIBRATOR D AGA-A CALIBRATOR E AGA-A | Gebrauchsfertiger Satz von 5 Kalibratoren für REF 5117A. Kalibrator A (grüne Kappe) 160 EU/ml, Kalibrator B (violette Kappe) 80 EU/ml, Kalibrator C (blaue Kappe) 40 EU/ml, Kalibrator D (gelbe Kappe) 20 EU/ml und Kalibrator E (orangefarbene Kappe) 1 EU/ml. Abgeleitet von Humanserum, das AGA IgA enthält. Konzentrationen in EU/ml sind auf den Etiketten aufgedruckt. |
| 5 x 1,75 ml | CALIBRATOR A AGA-G CALIBRATOR B AGA-G CALIBRATOR C AGA-G CALIBRATOR D AGA-G CALIBRATOR E AGA-G | Gebrauchsfertiger Satz von 5 Kalibratoren für REF 5117G. Kalibrator A (grüne Kappe) 160 EU/ml, Kalibrator B (violette Kappe) 80 EU/ml, Kalibrator C (blaue Kappe) 40 EU/ml, Kalibrator D (gelbe Kappe) 20 EU/ml und Kalibrator E (orangefarbene Kappe) 1 EU/ml. Abgeleitet von Humanserum, das AGA IgG enthält. Konzentrationen in EU/ml sind auf den Etiketten aufgedruckt. |
| 1 x 15 ml | IgA-CONJ HRP | HRP-Ziege anti-menschliches IgG-Konjugat für REF 5117A. Gebrauchsfertig. Farbkennzeichnung rosa. |
| 1 x 15 ml | IgG-CONJ HRP | HRP Ziege anti-menschliches IgG-Konjugat für REF 5117G. Gebrauchsfertig. Farbkennzeichnung rosa. |
| 1 x 60 ml | DIL | Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig. Farbkennzeichnung blau. |
| 1 x 15 ml | SUBSTRATE TMB | TMB-Enzymsubstrat. Gebrauchsfertig. Vor Licht schützen. |
| 1 x 15 ml | STOP H2SO4 | Stopplösung. Gebrauchsfertig. |
| 2 x Phiole | BUF WASH | Pulver Waschpuffer. Auf jeweils einen Liter rekonstituieren. |
| 1 x | | Protokollblätter |
| Optionale Komponenten | | |
| 1 x 60 ml | BUF WASH | Flüssiger konzentrierter Waschpuffer. Auf jeweils einen Liter rekonstituieren |

Auf den Etiketten verwendete Symbole

| | |
|---|--------------------------|
|  | Chargennummer |
|  | Bestellnummer |
|  | In-vitro-Diagnostikum |
|  | Verwendbar bis |
|  | Lagerungstemperatur |
|  | Gebrauchsanleitung lesen |
|  | Anzahl an Tests |
|  | Hersteller |

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 450 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

PROBENTNAHME UND HANDLING

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben. Es wird empfohlen, eingefrorene Proben innerhalb eines Jahres zu prüfen.

VERFAHREN**Hinweise zum Verfahren**

- Lesen Sie die Produktbeilage vor dem Beginn der Untersuchung sorgfältig durch.
- Warten Sie vor Beginn des Testverfahrens, bis die Serumproben und Testreagenzien Raumtemperatur erreicht haben. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.
- **Eine gute Waschtechnik ist entscheidend.** Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer

B. Kreuzreaktivität: Insgesamt 160 Seren von Personen mit anderen potenziell kreuzreaktiven Autoimmunerkrankungen wurden ausgewählt, um sie auf Gliadin-Antikörper unter Verwendung von ImmuLisa™ zu testen. Die Resultate sind nachstehend aufgeführt.

| Krankheit | n | Gliadin IgA | | Gliadin IgG | |
|----------------------------------|-----|-------------|-------|-------------|--------|
| | | n Pos | % Pos | n Pos | % Pos |
| Rheumatoidarthritis | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0 % |
| Thyroiditis | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0 % |
| Systemischer Lupus erythematodes | 30 | 2 | 6,7 % | 3 | 10,0 % |
| Vasculitis | 30 | 0 | 0,0 % | 1 | 3,3% |
| Systemische Sklerose | 30 | 0 | 0,0 % | 0 | 0,0 % |
| Colitis ulcerosa | 15 | 0 | 0,0 % | 1 | 6,7 % |
| Morbus Crohn | 15 | 1 | 6,7 % | 2 | 13,3% |
| Gesamt | 180 | 5 | 2,8% | 7 | 3,9 % |

Präzision

Die Präzision wurde mit 6 aus dem gesamten Bereich der Prüfung ausgewählten positiven Proben getestet. Testläufe von 6 Replikaten jeder Probe wurden in 13 Tagen durchgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde mit 12 Replikaten jeder Probe bestimmt. Die Resultate sind nachstehend aufgeführt.

| AGA | | Gesamt- ungenauigkeit | | | | Innerhalb des Ablaufs | |
|-----|------------|--------------------------|-------|-------|-------|--------------------------|-------|
| IgA | Mittelwert | SD | CV % | SD | CV % | (Wiederholbarkeit) | |
| S # | EU/ml | EU/ml | | EU/ml | | EU/ml | CV % |
| 1 | 10,4 | 0,536 | 5,2 % | 0,559 | 5,4 % | 0,251 | 2,4% |
| 2 | 15,8 | 0,725 | 4,6 % | 0,766 | 4,8 % | 0,281 | 1,8% |
| 3 | 24,5 | 1,872 | 7,6 % | 1,949 | 8,0 % | 1,266 | 5,1 % |
| 4 | 45,9 | 1,700 | 3,7 % | 1,680 | 3,7 % | 1,269 | 2,7 % |
| 5 | 84,4 | 2,485 | 2,9 % | 2,591 | 3,1 % | 1,291 | 1,5% |
| 6 | 116,3 | 5,932 | 5,1 % | 6,174 | 5,3 % | 2,653 | 2,2 % |

| AGA | | Gesamt- ungenauigkeit | | | | Innerhalb des Ablaufs | |
|-----|------------|--------------------------|--------|--------|-------|--------------------------|-------|
| IgG | Mittelwert | SD | CV % | SD | CV % | (Wiederholbarkeit) | |
| S # | EU/ml | EU/ml | | EU/ml | | EU/ml | CV % |
| 1 | 9,3 | 0,846 | 9,1 % | 0,892 | 9,6 % | 0,429 | 4,6% |
| 2 | 15,4 | 1,108 | 7,2 % | 1,131 | 7,4 % | 0,316 | 1,9% |
| 3 | 24,4 | 2,461 | 10,1 % | 2,615 | 10,7% | 0,801 | 3,3% |
| 4 | 37,1 | 4,429 | 11,9 % | 4,362 | 11,6% | 0,696 | 2,1 % |
| 5 | 63,1 | 8,408 | 13,3 % | 8,177 | 12,7% | 4,027 | 7,4 % |
| 6 | 127,9 | 11,132 | 8,7 % | 11,288 | 8,7 % | 5,649 | 4,7% |

Reproduzierbarkeit

80 Replikate von Proben im niedrigen negativen Bereich, in der Nähe vom Cutoff, im moderaten positiven Bereich und ungefähr +/-20 % des Prüfungs-Cutoffs für jeden AGA-Isotyp wurden ausgeführt, um die qualitative Reproduzierbarkeit zu bestimmen. Alle Proben erbrachten 100 % qualitative Übereinstimmung, mit Ausnahme von einer IgA-Probe mit einem Wert von 24,4 EU/ml (98 % qualitative Übereinstimmung).

| Krankheit | n | Gliadin IgA | | Gliadin IgG | |
|-------------------------------------|-----|-------------|-------|-------------|--------|
| | | n Pos | % Pos | n Pos | % Pos |
| Zöliakie | 306 | 133 | 43,5% | 191 | 62,4% |
| IGA-defiziente Zöliakie | 64 | 0 | 0,0 % | 63 | 98,4% |
| Pädiatrische Zöliakie | 123 | 31 | 25,2% | 70 | 56,9% |
| Dermatitis herpetiformis | 30 | 11 | 36,7% | 16 | 53,3% |
| Rheumatoidarthritis | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0 % |
| Thyroiditis | 30 | 1 | 3,3% | 0 | 0,0 % |
| Systemischer Lupus erythematodes | 30 | 2 | 6,7 % | 3 | 10,0 % |
| Vasculitis | 30 | 0 | 0,0 % | 1 | 3,3% |
| Systemische Sklerose | 30 | 0 | 0,0 % | 0 | 0,0 % |
| Colitis ulcerosa | 15 | 0 | 0,0 % | 1 | 6,7 % |
| Morbus Crohn | 15 | 1 | 6,7 % | 2 | 13,3% |
| Pädiatrische normale Humansenen | 130 | 0 | 0,0 % | 4 | 3,1 % |
| Normale Humansenen von Erwachsenen. | 139 | 7 | 5,0 % | 6 | 4,3 % |
| Gesamt NHS | 269 | 7 | 2,6% | 10 | 3,7 % |
| Gesamt NHS und Krankheitskontrolle | 449 | 12 | 2,7 % | 17 | 3,8 % |

LEISTUNGSMERKMALE

Die Nützlichkeit des Immulisa™ Gliadin-Antikörper-ELISA wurde beim Prüfen von Zöliakie-Patienten neben Krankheitskontrollen und „normalen“ Humansenen bewertet. Diese Proben wurden auch bei handelsüblichen Test-Kits getestet. Nur Proben im linearen Bereich der Prüfung wurden in den Methodenvergleich eingeschlossen. Die Ergebnisse sind nachstehend zusammengefasst.

A. Immulisa™ AGA ELISAs geg. anderen AGA ELISAs:

| | | Andere AGA IgA Ab ELISA | | |
|------------------------------|--------|-------------------------|------------------------|--------|
| | | Pos | Neg | Gesamt |
| IMMCO AGA IgA Ab ELISA | Pos | 87 | 24 | 111 |
| | Neg | 1 | 350 | 351 |
| | Gesamt | 88 | 374 | 462 |
| Pos. Übereinstimmung | | 98,9% | (95% CI 92,9% - 99,9%) | |
| Neg. Übereinstimmung | | 93,6% | (95% CI 90,5% - 95,8%) | |
| Gesamte %-Übereinstimmung | | 94,6% | (95% CI 90,7% - 95,3%) | |

| | | Andere Gliadin IgG Ab ELISA | | |
|------------------------------|--------|-----------------------------|------------------------|--------|
| | | Pos | Neg | Gesamt |
| IMMCO AGA IgG Ab ELISA | Pos | 251 | 6 | 257 |
| | Neg | 3 | 156 | 159 |
| | Gesamt | 254 | 162 | 416 |
| Pos. Übereinstimmung | | 98,8% | (95% CI 96,3% - 99,7%) | |
| Neg. Übereinstimmung | | 96,3% | (95% CI 91,8% - 98,5%) | |
| Gesamte %-Übereinstimmung | | 97,8% | (95% CI 95,9% - 98,9%) | |

breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschpuffer über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**

- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 oder 12 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.

Testmethode

Schritt 1 Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.

Schritt 2 Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.

Schritt 3 Verwenden Sie für eine **qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen Kalibrator D (*Fläschchen mit gelber Kappe*).

oder

Verwenden Sie für eine **Semi-Quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis E, wie in der Probenanordnung unten gezeigt.

| Qualitativ | | | | Semiquantitativ | | | |
|------------|------------|-----|------|-----------------|------------|----|------|
| A | Leerprobe | S5 | usw. | A | Leerprobe | S1 | usw. |
| B | -Kontrolle | S6 | | B | -Kontrolle | 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 |

Schritt 4 Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit **500 µl** Probenverdünner vermischen.

Schritt 5 Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank. Setzen Sie die Vertiefungen sicher in den mitgelieferten Halter ein.

Schritt 6 Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben (**1:101**) in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.

Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null.

Schritt 7 Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

Schritt 8 Waschen Sie **4x** mit Waschpuffer. Wenn Sie manuell waschen, füllen Sie jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem

Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

Schritt 9 Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.

Schritt 10 Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

Schritt 11 Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 8 beschrieben.

Schritt 12 Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.

Schritt 13 Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

Schritt 14 Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie die Extinktionswerte innerhalb von 30 Minuten nach Hinzufügen der Stopplösung ab.

Schritt 15 Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **450 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 450/630 nm.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte <0,3 sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <10 EU/ml sein. Wenn der Test als zweifache Ausführung durchgeführt wird, sollte der Mittelwert der zwei Messdaten aufgenommen werden, um die Einheiten zu bestimmen. Beim Durchführen von Qualitativen Bestimmungen muss die optische Dichte von Kalibrator D größer sein als die der Negativkontrolle und kleiner als die Absorption der Positivkontrolle. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

RESULTATE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

$$\frac{\text{Ext. der Testprobe}}{\text{Ext. von Kalibrator D}} \times \text{Einheiten von Kalibrator D} = \text{Einheiten von Prüfprobe}$$

Es wird empfohlen, dass qualitative Ergebnisse, als „positiv“ oder „negativ“ berichtet werden. Probenergebnisse größer oder gleich Kalibrator D werden als positiv betrachtet. Qualitative positive Ergebnisse sollten mit einem semiquantitativen Prüfungsablauf bestätigt werden, um Einheiten zu bestimmen und die Ergebnisse im Vergleich mit anwendbaren Referenzbereichen, wie sie unter **Interpretation** angegeben sind, zu bewerten.

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis E gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte. Alternativ kann eine Vier-Parameter-Kurve verwendet werden, um die Standardkurve aufzunehmen.

Es wird empfohlen, dass semiquantitative Resultate als „positiv“, „negativ“, oder „unbestimmt“ mit EU/ml Einheitswerten berichtet werden. Unbestimmte/Grenz-Resultate sollten erneut getestet und zusammen mit anderen Labormethoden, wie in **begrenzungen des verfahrens** angezeigt, bewertet werden.

Interpretation

Die Interpretationswerte wurden durch Prüfen von 64 normalen Blutspendern und Krankheitsbekämpfungspben bestimmt. Der Mittelwert dieser Probanden plus 3 SD wurde als der Prüfungs-Cutoff ermittelt und einem beliebigen Wert von 20 EU/ml zugeordnet. Die folgende Information dient nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborresultate. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte bestimmen.

| Gliadin Ab Wert | Interpretation |
|-----------------|---------------------------|
| <20 EU/ml | Negativ |
| 20-25 EU/ml | Unbestimmt (Grenzbereich) |
| >25 EU/ml | Positiv |

Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben, die hohe Antikörperspiegel enthalten, können größere Extinktionswerte ergeben als die von Kalibrator A. Um genaue semiquantitative Werte festzulegen, sollte man solche Proben weiter verdünnen, damit sie sich innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve befinden, wenn erneut getestet wird. Um die EU/ml-Werte zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Dieser Test sollte nicht an stark hämolysierten, mikrobiologisch verunreinigten oder lipämischen Proben durchgeführt werden. Diese Methode sollte nur verwendet werden, um menschliche Serumproben zu testen.

Die erhaltenen Ergebnisse dienen nur als Hilfsmittel bei der Diagnose und sollten nicht allein als diagnostisch gedeutet werden. Bei CD-Patienten mit IgA-Mangel kann IgA AGA negativ sein.

ERWARTETE WERTE

Die erwarteten Werte bei einer normalen Population sind negativ. Es wurde jedoch bestimmt, dass einige allem Anschein nach gesunde, asymptomatische Personen positiv auf IgA oder IgG Antig-Gliadin-Antikörper testen können.

Sätze klinischer Proben wurden auf ImmuLisa™ AGA-ELISAs geprüft. Resultate, welche die Inzidenz in den Populationen für diese Studie demonstrieren, sind nachstehend aufgeführt.