



Anti-Gliadin Antibody (AGA) ELISA

IVD

CLIA Complexity: High
 CDC Analyte Identification Code: 0528
 CDC Test System Identification Code: 28513/28514

PRODUCT INSERT

REF 1117A IgA-AGA ELISA 96 Determinations

REF 1117G IgG-AGA ELISA 96 Determinations

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and semi-quantitation of IgG- or IgA-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 heterogeneous gastrointestinal disorder with sensitivity to gluten, and can exhibit with non-classic or minimal symptoms¹. 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 prognosis².

Published literature suggests the use of serological testing for patients suspected of GSE and to monitor dietary compliance³⁻⁶. 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 diagnosis⁷. These include tests for anti-gliadin (AGA), anti-reticulin (ARA) and anti-endomysial (EMA) antibodies. Of these, AGA have been studied the most⁸⁻²⁰. 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.

PRINCIPALS OF THE 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 IgG or IgA conjugate is added to each well. These enzyme conjugated antibodies bind specifically to the human immunoglobulin of the appropriate class. After washing away any unbound conjugate, specific enzyme substrate (pNPP) 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 405 nm. Results are expressed in ELISA units per milliliter (EU/ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

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

Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials²¹. **WARNING** - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup.

EN

Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to en-sure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc.

Use good laboratory techniques to minimize microbial and chemical contamination. Do not use after expiration date.

Materials provided

ImmuLisa™ IgA-AGA ELISA **REF** 1117A

ImmuLisa™ IgG-AGA ELISA **REF** 1117G









12 x 8	MICROPLATE AGA	Microplate with individual breakaway microwells coated with gliadin antigen.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A AGA * †	Ready to use Calibrator A (<i>green cap</i>). Human serum containing antibodies to gliadin.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B AGA * †	Ready to use Calibrator B (<i>violet cap</i>). Human serum containing antibodies to gliadin.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C AGA * †	Ready to use Calibrator C (<i>blue cap</i>). Human serum containing antibodies to gliadin.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D AGA * †	Ready to use Calibrator D (<i>yellow cap</i>). Human serum containing antibodies to gliadin.
1 x 1.5 ml	CONTROL + AGA * †	Ready to use Positive Control (<i>red cap</i>). Contains human serum positive for AGA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - * †	Ready to use Negative Control (<i>white cap</i>). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS * †	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL *	Ready to use Serum Diluent . Color coded blue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light.
1 x 12 ml	STOP	Ready to use Stop Solution .
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.

* Contains < 0.1% NaN₃

† **REF** 1117A contains IgA-AGA calibrators, controls and IgA conjugate

REF 1117G contains IgG-AGA calibrators, controls and IgG conjugate

Symbols used on labels:

-  Lot number
-  Catalog number
-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions for use
-  In vitro diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

Materials Required But Not Provided

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

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

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

PROCEDURE**Procedural Notes**

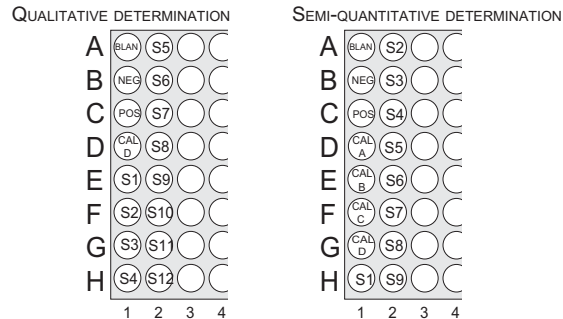
- Before starting the assay read these instructions carefully.
- Bring all reagents and samples to room temperature (20-26°C) for 30 minutes. Return materials to refrigerator immediately after use.
- Prepare all dilutions of the patient specimens before starting the test.
- **Immediately return unused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

Assay procedure

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

EN

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



4. **Prepare a 1:51** dilution of the patient specimen by mixing 10 μ l of the patient specimen with **0.5 ml** of Serum Diluent.
5. Add **100 μ l** of Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient specimens to the appropriate microwells indicated on the protocol record.
Note: Include one well with **100 μ l** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank. The absorbance of this well should not be greater than 0.3.
6. Incubate **30 minutes** (\pm 5 minutes) at room temperature on a level surface.
7. Wash step: Thoroughly aspirate the contents of each well. Add 200-300 μ l of the **reconstituted** wash buffer to all wells then aspirate. Repeat this sequence thrice more for a total of four washes. Invert the plate and tap it on absorbent material to remove any residual fluid after the last wash. Do not dry wells completely.
8. Add 100 μ l of the Conjugate to each well.
9. Incubate the wells for **30 minutes** (\pm 5 min) at room temperature.
10. Wash step: Repeat step 7.
11. Add 100 μ l of Enzyme Substrate to each well.
12. Incubate the wells for **30 minutes** (\pm 5 min) at room temperature.
13. Add 100 μ l of Stop Solution to each well. Maintain the same sequence and timing of Stop Solution addition as was used for the Enzyme Substrate. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm within one hour of stopping the reaction.
14. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm using a single or dual wave-length 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 <20 EU/ml. If the test is run in duplicate, take the mean of the two readings to determine the EU/ml. 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.

EN

RESULTS

Calculations

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

1. QUALITATIVE DETERMINATION

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

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.

Calibrator

The calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each test. Patient specimens containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such specimens should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor. See sample standard curves (Figure 1) at the end of this document.

Interpretation

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

AGA-IgG Value		Interpretation
Child	Adult	
<28 EU/ml	<20 EU/ml	Neg (-)
>28 EU/ml	>20 EU/ml	Pos (+)
AGA-IgA Value		Interpretation
Child	Adult	
<23 EU/ml	<20 EU/ml	Neg (-)
>23 EU/ml	>20 EU/ml	Pos (+)

LIMITATIONS OF THE 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 (<20 EU/ml for adults and <23-28 EU/ml for children). However, it has been determined that some apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive for IgA or IgG anti-gliadin antibodies. **See Figure 2.**

Clinical Studies

The sensitivity and specificity of the IgG- and IgA-AGA tests were determined by testing patients with active CD (children=38), patients with DH (adults=10), patients with thyroid disorders (adults=200), patients with *pemphigus*

EN

and *pemphigoid* (adults=69), patients with other gastrointestinal disorders and 202 normal blood donors (children=113 and adults=89). Results from this study appear in Table 1 at the end of this document.

Using the ImmuLisa™ IgG and IgA anti-gliadin antibody test kits, the following incidences of AGA in normals, in patients with CD, and in other disease states were observed. IgA class AGA are specific for CD with a sensitivity of 90%. IgG-AGA, on the other hand are sensitive indicators of CD. See Table 2.

The algorithm in Table 3 serves as a guide in the interpretation of serological testing for CD.

Some investigators have taken the approach in Figure 3 to establish the diagnosis of CD using serological methods.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Results obtained with the ImmuLisa™ IgG and IgA-AGA test were compared with the ImmuGlo™ anti-endomysial antibody (EMA) kit for diagnosing CD. The comparison included a total of 186 subjects. Included in the study were 34 patients on a gluten containing diet and 32 patients on gluten-free diet with a biopsy-confirmed diagnosis of CD as per ESPGAN criteria. **Results appear in Tables 4 and 5 at the end of this document.**

Precision:

Samples with known concentrations of AGA were assayed in 10 replicates over a period of two weeks. Intra-and inter-assay coefficient of variation (CV) appear in **Tables 6 and 7.**

Recovery

Samples with known AGA concentrations were mixed with appropriate dilutions of another positive sample with known amounts of AGA. Anti-gliadin antibody levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery calculated. The results appear in **Table 8.**



IMMCO
DIAGNOSTICS

Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά της γλιαδίνης (AGA)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1117A Μέθοδος A για αντισώματα gA κατά της γλιαδίνης (A A) 96 Προσδιορισμοί
REF 1117G Μέθοδος A για αντισώματα g κατά της γλιαδίνης (A A) 96 Προσδιορισμοί

Μια έμμεση έμμεση ενζυμική ανοσοπροσροφητική προσδιοριστική (ELISA) για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων IgG ή IgA κατά της γλιαδίνης σε ορό ανθρώπου, ως βοήθημα για τη διάγνωση ασθενών με οίλιο άη και ερπητοειδή δερματίτιδα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η ευαισθητή στη γλουτένη εντεροπάθεια (gluten sensitive enteropathy - GSE), δηλαδή η οίλιο άη (KK) και η ερπητοειδής δερματίτιδα (DH), είναι μια κοινή, κλινικά ανοσογενής γαστρεντερική διαταραχή με ευαισθησία στη γλουτένη, η οποία μπορεί να εκδηλωθεί με η τυπικά ή με ελάχιστα συμπτώματα¹. Η GSE σχετίζεται με κάποιο γενετικό στοιχείο, όπως υποδηλώνει το γεγονός ότι περίπου 5-10% των συγγενών πρώτου βαθμού παρουσιάζουν KK με συμπτώματα ή χωρίς. Παιδιά με χαμηλό ανάστημα και ασθενείς με ινσουλινοεξαρτημένο σακχαρώδη διαβήτη και άλλες αυτοάνοσες διαταραχές με φανίζουν επίσης μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης GSE. Συνιστάται ο αυστηρός αποκλεισμός της γλουτένης από τη διαίτα για τον έλεγχο της δραστηριότητας της νόσου, ενώ η έγκαιρη διάγνωση σε αυτούς τους ασθενείς ενδέχεται να βελτιώσει τη συνολική πρόγνωση².

Η δημοσίευση βιβλιογραφία συνιστά τη χρήση ορολογικών εξετάσεων για ασθενείς που πιθανόν να πάσχουν από GSE, καθώς και την παρακολούθηση της συμμόρφωσης της διαίτας τους³⁻⁶. Η Ευρωπαϊκή Εταιρία Παιδιατρικής Γαστρεντερολογίας και Διατροφής (ESPGAN) έχει προτείνει τη συμπερίληψη διαφόρων ορολογικών εξετάσεων, ώστε να ελεγχθεί ο αριθμός των βιοψιών εντέρου που απαιτούνται για τη διάγνωση⁷. Σε αυτές περιλαμβάνονται εξετάσεις για αντισώματα κατά της γλιαδίνης (AGA) και κατά της ρεπικουλίνης (ARA), καθώς και για αντι-ενδοκυμικά αντισώματα (EMA). Από αυτά, τα αντισώματα AGA έχουν ελεγχθεί περισσότερο⁸⁻²⁰. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ELISA, έχουν ανιχνευθεί σε ορούς ασθενών με GSE αντισώματα AGA τόσο της τάξης IgA όσο και της τάξης IgG. Από αυτά, τα αντισώματα AGA τάξης IgG φαίνεται πως αποτελούν περισσότερο ευαίσθητους αλλά λιγότερο ειδικούς δείκτες της GSE, σε σχέση με τα αντισώματα AGA τάξης IgA. Από την άλλη, τα αντισώματα AGA τάξης IgA είναι λιγότερο ευαίσθητοι αλλά περισσότερο ειδικοί δείκτες της GSE.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Το αντιγόνο της γλιαδίνης δεσφύεται στις κυψελίδες ενός πλακιδίου μικροκυψελίδων από πολυστυρένιο και, στη συνέχεια, τα σωματίδια που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται, ώστε να ελεγχθεί η ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και οι αραιώσεις ορού των ασθενών προστίθενται σε ξεχωριστές κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των αντισωμάτων κατά της γλιαδίνης στο καθήλωνο αντιγόνο. Το δείγμα που δεσφύθηκε εκπλένεται και προστίθεται σε κάθε κυψελίδα ένα σήμα ένζυμο συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG ή IgA. Αυτά τα συζευγμένα ένζυμο αντισώματα δεσφύονται ειδικά στην ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη της αντίστοιχης τάξης. Αφού εκπλυθούν τα τυχόν μη δεσφύμενα συζευκτικά αντισώματα, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (pNPP). Μετά τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης, η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, μετράται με ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.** Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζηλα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Οι επικαλυπόμενες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

EL

Προφυλάξεις

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έκχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών²¹. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από όλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc.

Να χρησιμοποιείτε τις ορθές εργαστηριακές τεχνικές προκειμένου να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος κροβιακής και χημικής όλυνσης. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgA κατά της γλιαδίνης (AGA) ImmuLisa™ [REF](#) 1117A

Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgG κατά της γλιαδίνης (AGA) ImmuLisa™ [REF](#) 1117G

12 x 8	MICROPLATE AGA	Πλακίδιο ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμένων με αντιγόνο γλιαδίνης.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A AGA * †	Έτοιμος προς χρήση Βαθμόνητης Α (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της γλιαδίνης.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B AGA * †	Έτοιμος προς χρήση Βαθμόνητης Β (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της γλιαδίνης.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C AGA * †	Έτοιμος προς χρήση Βαθμόνητης C (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της γλιαδίνης.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D AGA * †	Έτοιμος προς χρήση Βαθμόνητης D (ίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της γλιαδίνης.
1 x 1.5 ml	CONTROL + AGA * †	Έτοιμος προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (όμοιο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για αντισώματα AGA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Έτοιμος προς χρήση διάλυμα αρνητικού ελέγχου (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	Έτοιμος προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS * †	Έτοιμος προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	DIL *	Έτοιμος προς χρήση αραιωτικό διάλυμα ορού . Χρώματος μπλε.

EL

1 x 12 ml **SUBSTRATE** *

Έτοιμο προς χρήση **ενζυμικό υπόστρωμα**. Περιέχει ρ-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). **Να προστατεύεται από το φως.**

1 x 12 ml **STOP**

Έτοιμο προς χρήση **διάλυμα τερματισμού**.

2 x **BUF WASH**

Σκόνη **ρυθιστικού διαλύματος έκπλυσης**. Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

* Περιέχει < 0,1% NaN₃


† **REF** Το kit 1117A περιλαμβάνει IgA-AGA βαθμονομητές, διαλύματα ελέγχου και συζευκτικό αντίσωμα κατά της IgA

REF Το kit 1117G περιλαμβάνει IgG-AGA βαθμονομητές, διαλύματα ελέγχου και συζευκτικό αντίσωμα κατά της IgG

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT Αριθμός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου

 Η εροληνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

IVD In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 l έως 1000 l

Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών

Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων

Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό

Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθιστεί στα 600-650 nm.

Εύκαπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθιστικό διάλυμα

Χρονοετρητής

Απορροφητικό χαρτί

Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 l

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιόλυση, λιπαρική ή χρωματική αιόλυση, ή δείγματα ολυσθέντα σε ικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για πιο ακροχρόνια φύλαξη, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις της διαδικασίας

Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά αυτές τις οδηγίες.

Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-26°C) επί 30 λεπτά. Επιστρέψτε τα υλικά στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.

Προετοιμάστε όλες τις αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών προτού ξεκινήσετε την ανάλυση.

- **Επιστρέψτε αμέσως τυχόν η χρησιμοποιημένες ταινίες στη θήκη και τα αποξηραντικά και σφραγίστε την ασφαλώς, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η έκθεση σε υδρατμούς.**

Στάδιο έκπλυσης: είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής. **Συνιστάται η χρήση μιας αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**

Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό, επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.

Η προσεκτική τήρηση των χρόνων είναι σημαντική. Οι περίοδοι επώασης ξεκινούν μετά τη χορήγηση των αντιδραστηρίων.

Διαδικασία της μεθόδου

1. **ΟΛΑ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΦΤΑΣΟΥΝ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ (20-26°C) ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.**
2. Σηκάνετε το αρχείο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στο πλακίδιο. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.
3. **Ποιοτικός προσδιορισμός:** χρησιμοποιήστε μόνο το Βαθμόνοητή D.
Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός: χρησιμοποιήστε τους Βαθμόνοητές A – D, όπως φαίνεται στο παρακάτω παράδειγμα.

Ποιοτικός προσδιορισμός

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

Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός

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

4. **Προετοιμάστε μια αραιώση** του δείγματος ασθενούς σε αναλογία **1:51**, αναγνύοντας 10 μ l του δείγματος ασθενούς και 0,5 μ l του αραιωτικού διαλύματος ορού.
5. Προσθέστε **100 μ l** Βαθμόνοητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενούς στις κατάλληλες μικροκυψελίδες που υποδεικνύονται στο αρχείο του πρωτοκόλλου.
Σημείωση: Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μ l** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριο. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA και το τυφλό αντιδραστήριο. Η απορρόφηση αυτής της κυψελίδας δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,3.
6. Επωάστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου, επάνω σε μια επίπεδη επιφάνεια.
7. Στάδιο έκπλυσης: Αναροφήστε σχολαστικά το περιεχόμενο κάθε κυψελίδας. Προσθέστε 200-300 μ l του **αναασυσταθέντος** ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και έπειτα αναροφήστε το. Επαναλάβετε αυτή την ακολουθία ενεργειών άλλες τρεις φορές, ώστε να πραγματοποιηθεί ένα σύνολο τεσσάρων εκπλύσεων. Ανατρέψτε το πλακίδιο και κτυπήστε το ελαφρά επάνω σε ένα απορροφητικό υλικό ώστε να αποκρυνθεί τυχόν υπολειπόμενο υγρό από την τελευταία έκπλυση. Μην αποξηραίνετε πλήρως τις κυψελίδες.
8. Προσθέστε 100 μ l συζευκτικού αντισώματος σε κάθε κυψελίδα.

EL

9. Επωάστε τις κυψελίδες επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμότητα δωματίου.
10. Στάδιο έκπλυσης: επαναλάβετε το στάδιο 7.
11. Προσθέστε 100 μ l ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα.
12. Επωάστε τις κυψελίδες επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμότητα δωματίου.
13. Προσθέστε 100 μ l διαλύματος τετραπύρρυνου σε κάθε κυψελίδα. Διατηρήστε την ίδια σειρά και τους ίδιους χρόνους στην προσθήκη διαλύματος τετραπύρρυνου, όπως και στην προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου. Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος 405 nm, εντός μιας ώρας από τον τετραπύρρυνό της αντίδρασης.
14. Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος 405 nm, χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριο προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η έτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι $<0,3$. Ο βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή <20 EU/ml. Εάν η εξέταση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημιποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν εύκολα από τις εξής δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απόσπασμα εξεταζόμενου δείγματος

----- X EU/ l του Βαθμονομητή D = EU/ l του εξεταζόμενου δείγματος

Απόσπασμα του Βαθμονομητή D

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών A έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί γράμμικου άξονα. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε EU/ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης τους.

Βαθμονομητής

Οι βαθμονομητές συλλεγονται περίπου βάνονται για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή A. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημιποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονομησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν επί το συντελεστή αραιώσεως. Δείτε τις τυπικές καμπύλες δειγμάτων (Εικόνα 1) στο τέλος αυτού του εντύπου.

EL

Ερ ηνεία

Οι παρακάτω πληροφορίες παρέχονται όνως ως οδηγός για την ερ ηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

	Τι ή AGA-IgG	Ερ ηνεία
Παιδιά	Ενήλικες	
<28 EU/ml	<20 EU/ml	Αρνητικό (-)
>28 EU/ml	>20 EU/ml	Θετικό (+)

	Τι ή AGA-IgA	Ερ ηνεία
Παιδιά	Ενήλικες	
<23 EU/ml	<20 EU/ml	Αρνητικό (-)
>23 EU/ml	>20 EU/ml	Θετικό (+)

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση αυτή δεν θα πρέπει να εκτελείται σε δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιόλυση, σε ολυσμένο ή από κρόβια ή λιπαρά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για την εξέταση δειγμάτων ορού ανθρώπου. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται υποβοηθούν μόνο τη διάγνωση και δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται από όσους τους ως διαγνωστικά. Σε ασθενείς με ΚΚ που εμφανίζουν ανεπάρκεια σε IgA, ο προσδιορισμός αντισωμάτων IgA-AGA ενδέχεται να είναι αρνητικός.

Ανα ενό ενες τιμές

Οι ανα ενό ενες τιμές σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρνητικές (<20 EU/ml για ενήλικες και <23-28 EU/ml για παιδιά). Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι ορισμένα φαινοενικά υγιή, ασυμπτωματικά άτομα, ενδέχεται να βρεθούν θετικά για αντισώματα IgA ή IgG κατά της γλιαδίνης. **Βλ. εικόνα 2.**

Κλινικές ελέτες

Η ευαισθησία και η ειδικότητα των αναλύσεων αντισωμάτων IgG- και IgA-AGA προσδιορίστηκαν με την εξέταση ασθενών με ενεργή ΚΚ (παιδιά=38), ασθενών με ερπητοειδή δερματίτιδα (ενήλικες=10), ασθενών με θυροειδικές διαταραχές (ενήλικες=200), ασθενών με πέμφιγα και πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (ενήλικες=69), ασθενών με άλλες γαστρεντερικές διαταραχές και 202 φυσιολογικών αιμοδοτών (παιδιά=113 και ενήλικες=89). Τα αποτελέσματα από αυτή τηλέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 στο τέλος αυτού του εντύπου.

Χρησιμοποιώντας τα κιτ αναλύσεων αντισωμάτων IgG και IgA κατά της γλιαδίνης Immulisa™, παρατηρήθηκαν οι παρακάτω συχνότητες εμφάνισης αντισωμάτων AGA σε φυσιολογικά άτομα, σε ασθενείς με ΚΚ, καθώς και σε άλλες νόσους. Τα αντισώματα AGA τάξης IgA είναι ειδικά για τη ΚΚ, με ευαισθησία ίση με 90%. Από την άλλη, τα αντισώματα IgG-AGA αποτελούν ευαίσθητους δείκτες της ΚΚ. Βλ. τον Πίνακα 2.

Ο αλγόριθμος στον Πίνακα 3 αποτελεί έναν οδηγό για την ερ ηνεία των ορολογικών εξετάσεων για την ΚΚ.

Ορισμένοι ερευνητές έχουν ακολουθήσει την προσέγγιση που παρουσιάζεται στην εικόνα 3 προκειμένου να εδραιώσουν την διάγνωση της ΚΚ χρησιμοποιώντας ορολογικές μεθόδους.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αντισωμάτων IgG και IgA-AGA Immulisa™ συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα του κιτ αντι-ενδοκυκικών αντισωμάτων (EMA) Immuglo™ για τη διάγνωση της ΚΚ. Η σύγκριση συμπεριέλαβε ένα σύνολο 186 ασθενών. Στηλέτη είχαν συμπεριληφθεί 34 ασθενείς σε δίαιτα που περιείχε γλουτένη και 32 ασθενείς σε δίαιτα ελεύθερη γλουτένης, με επιβεβαιωμένη από βιοψία διάγνωση ΚΚ σύμφωνα με τα κριτήρια της ESPGAN. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 και 5 στο τέλος αυτού του εντύπου.

Ακρίβεια:

Δείγματα γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων AGA αναλύθηκαν σε 10 αντίγραφα σε μία περίοδο δύο

EL

εβδομάδων. Οι συντελεστές ποικιλότητας (CV) εντός σειράς και μεταξύ σειρών παρουσιάζονται στους **Πίνακες 6 και 7**.

Ανάκτηση:

Δείγματα γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων AGA αναίχθηκαν σε κατάλληλες αραιώσεις ενός άλλου θετικού δείγματος που περιείχε γνωστές ποσότητες αντισωμάτων AGA. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα αντισωμάτων κατά της γλιαδίνης στα αναίχθέντα δείγματα και από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η επί τοις εκατό ανάκτηση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους **Πίνακες 8**.



Ensayo ELISA para detección de anticuerpos antigliadina (AGA)

IVD

PROSPECTO

REF 1117A ELISA para AGA IgA 96 an-lisis

REF 1117G ELISA para AGA IgG 96 an lisis

USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección y semicuantificación de anticuerpos antigliadina IgG o IgA en suero humano, como ayuda en el diagnóstico de la *enfermedad celíaca* y la *dermatitis herpetiforme*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La enteropatía sensible al gluten (ESG), por ejemplo la *enfermedad celíaca* (EC) y la *dermatitis herpetiforme* (DH), es una patología clínica gastrointestinal heterogénea con sensibilidad al gluten que puede presentarse sin síntomas o síntomas muy reducidos¹. Hay algún componente genético asociado a la ESG, como demuestra el hecho de que alrededor del 5-10% de los familiares de primer grado presentan EC sintomática o asintomática. Los niños de talla escasa y los pacientes con diabetes insulino dependiente y otros trastornos autoinmunes tienen mayores posibilidades de padecer ESG. La condición de estos pacientes, así como la prognosis de la enfermedad, mejoran notablemente sometidos a una severa dieta sin gluten².

La literatura publicada aconseja utilizar análisis serológicos en aquellos pacientes en que se sospeche una ESG, como también para controlar si cumplen con la dieta³⁻⁶. La Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (ESPGAN) recomienda que se incluyan varios análisis serológicos para reducir el número de biopsias intestinales necesarias para formular un diagnóstico⁷. Esos análisis comprenden detección de anticuerpos antigliadina (AGA), antireticulina (ARA) y antiendomisiales (EMA). De estos, el más estudiado es el de AGA⁸⁻²⁰. Mediante el método ELISA, en el suero de pacientes con ESG se detectan tanto los AGA de clase IgA como de clase IgG. Los AGA de clase IgG parecen ser indicadores de ESG más sensibles aunque menos específicos que los de clase IgA. Por el contrario, los AGA de clase IgA son menos sensibles pero más específicos para ESG.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El antígeno gliadina se une a los pocillos de una placa de micropocillos de poliestireno; a continuación se bloquean los puntos que no han reaccionado para reducir las uniones no específicas. Se añaden los controles, calibradores y suero diluido de los pacientes en pocillos separados, permitiendo que los anticuerpos antigliadina presentes se unan al antígeno inmovilizado. Las muestras no unidas se eliminan mediante lavado y en cada pocillo se añade un conjugado de IgG e IgA antihumana marcado con un enzima. Estos anticuerpos conjugados con enzima se ligan específicamente a la inmunoglobulina humana de la clase respectiva. Después de eliminar por lavado todo el conjugado que no se hubiera unido, se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP). Una vez detenida la reacción enzimática, la intensidad del color cambia de manera proporcional a la concentración de anticuerpos y se lee con espectrofotómetro a 405 nm. Los resultados se expresan en unidades ELISA por mililitro (EU/ml).

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.** No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C). Conservado a 2-8°C, el tiempo de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tiempo de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

Precauciones

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos,

los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales²¹. ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN₃) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

Para asegurar la calidad del producto, manipule el producto de acuerdo a las instrucciones en este prospecto. No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc.

Respete las buenas prácticas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

Material suministrado

ELISA para IgA-AGA ImmuLisa™ **REF** 1117A

ELISA para IgG-AGA ImmuLisa™ **REF** 1117G

12 x 8	MICROPLATE AGA	Microplaca con micropocillos individuales separables recubiertos con antígeno gliadina.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A AGA * †	Calibrador A listo para usar (<i>tapa verde</i>). Suero humano con anticuerpos antigliadina.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B AGA * †	Calibrador B listo para usar (<i>tapa morada</i>). Suero humano con anticuerpos antigliadina.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C AGA * †	Calibrador C listo para usar (<i>tapa azul</i>). Suero humano con anticuerpos antigliadina.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D AGA * †	Calibrador D listo para usar (<i>tapa amarilla</i>). Suero humano con anticuerpos antigliadina.
1 x 1.5 ml	CONTROL + AGA * †	Control positivo listo para usar (<i>tapa roja</i>). Contiene suero humano positivo a AGA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Control negativo listo para usar (<i>tapa blanca</i>). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS * †	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de suero listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático listo para usar. Contiene pNPP. Protéjase de la luz.
1 x 12 ml	STOP	Solución Stop lista para usar.
2 x	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro.


* Contiene < 0.1% NaN₃

† **REF** 1117A contiene calibradores ACA IgA, controles y conjugado de IgA

REF 1117G contiene calibradores ACA IgG, controles y conjugado de IgG


ES


Símbolos utilizados en las etiquetas:

 N.º mero de lote

 N.º mero de catálogo

 Fecha de caducidad

 Temperatura de conservación

 Lea las instrucciones de uso

 Para diagnóstico *in vitro*

 Fabricante

 N.º mero de análisis

Materiales necesarios no suministrados

Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl

- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Agua desionizada o destilada
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido
- Temporizador
- Papel absorbente

Laador automático de microplacas con capacidad de 200 µl

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interfieren en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO

Advertencias preliminares

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente (20-26°C) por 30 minutos. Vuelva a poner los materiales en la nevera inmediatamente después de su uso.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.

Guarde inmediatamente en el sobre con sustancias desecantes las tiras que no utilice; cierre herméticamente para reducir al mínimo la exposición al vapor de agua.

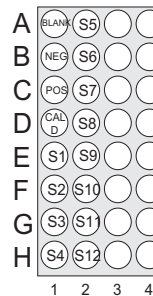
- Fase de lavado: la buena técnica es crucial. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.

ES

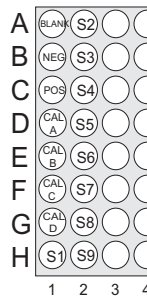
Procedimiento del ensayo

1. **LOS REACTIVOS DEBEN ESTAR A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26 C) ANTES DE DAR COMIENZO AL ENSAYO.**
2. Se ale en la hoja de protocolo la colocaci n de la muestra en la microplaca. Es buena pr ctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.
3. **Determinaci n cualitativa:** use nicamente el Calibrador D. **Determinaci n semi cuantitativa:** use los Calibradores A - D como se muestra en el ejemplo siguiente.

DETERMINACI N CUANTITATIVA



DETERMINACI N SEMI CUANTITATIVA



4. Prepare una diluci n de **1:51** de la muestra del paciente, mezclando **10 l** de la muestra del paciente con **0,5 ml** de diluyente de suero.
5. A cada **100 l** de calibradores, controles positivo y negativo y muestras diluidas del paciente en los respectivos pocillos indicados en la hoja de protocolo.
Nota: Incluya un pocillo con **100 l** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo. La absorbancia de este pocillo no debe ser superior a 0,3.
6. Incube **30 minutos** (± 5 minutos) a temperatura ambiente sobre una superficie plana.
7. Fase de lavado: aspire totalmente el contenido de cada pocillo. A cada 200-300 l de tamp n de lavado reconstituido en todos los pocillos y aspire. Repita el procedimiento tres veces m s hasta completar cuatro lavados. Despu s del ltimo lavado, invierta la placa y sacuda sobre material absorbente para eliminar todo residuo de lquido. No seque completamente los pocillos.
8. A cada 100 l de conjugado a cada pocillo.
9. Incube los pocillos durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
10. Fase de lavado: repita el punto 7.
11. A cada 100 l de substrato enzim tico a cada pocillo.
12. Incube los pocillos durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
13. A aada 100 l de soluci n Stop a cada pocillo. Mantenga la misma secuencia de tiempos de soluci n Stop utilizados para el substrato enzim tico. Lea la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405nm en el plazo de una hora despu s de haber detenido la reacci n.
14. Lea la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405nm mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble compar ndolo con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

CONTROL DE CALIDAD

En cada ensayo es necesario procesar Calibradores, controles Positivo y Negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisi n del an lisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deber a ser $<0,3$. La lectura de absorbancia del Calibrador A no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario ser a necesario repetir el an lisis. El control negativo debe ser <20 EU/ml. Si el an lisis se efectúa por duplicado, se tomar a la media de

ambas lecturas para determinar las EU/ml. Cuando se efectúan determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

RESULTADOS

Cálculo

Las concentraciones en la muestra del paciente se pueden determinar mediante dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. de muestra analizada

$$X \text{ EU/ml de Calibrador D} = \text{EU/ml muestra analizada}$$

Abs. de Calibrador D

2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los Calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en EU/ml en el eje X en relación a la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.

Calibrador

Los calibradores proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del Calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución. Véase un modelo de curvas estándar en la figura 1 al final de este documento.

Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales.

Valor AGA-IgG		Interpretación
Ni os	Adultos	
<28 EU/ml	<20 EU/ml	Neg (-)
>28 EU/ml	>20 EU/ml	Pos (+)
Valor AGA-IgA		Interpretación
Ni os	Adultos	
<23 EU/ml	<20 EU/ml	Neg (-)
>23 EU/ml	>20 EU/ml	Pos (+)

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Este ensayo no debe efectuarse en muestras muy hemolizadas, contaminadas por microbios o lipémicas. Este método debe utilizarse únicamente para analizar muestras de suero humano. Los resultados obtenidos son sólo una ayuda en el diagnóstico y no deben interpretarse como un diagnóstico por sí solos. Los pacientes celíacos con deficiencia de IgA pueden resultar negativos a los AGA de clase IgA.

Valores esperados

Los valores esperados en una población normal son negativos (<20 EU/ml en los adultos y <23-28 EU/ml en los ni os). Sin embargo, se ha demostrado que algunos individuos aparentemente sanos y asintomáticos pueden resultar positivos a los anticuerpos anti gliadina de clase IgA o IgG. Véase la figura 2.

ES

Estudios clínicos

La sensibilidad y especificidad de los análisis AGA IgG e IgA se determinó analizando pacientes con EC activa (niños = 38), pacientes con DH (adultos = 10), pacientes con trastornos tiroideos (adultos = 200), pacientes con pénfigo y penfigoide (adultos = 69), pacientes con trastornos gastrointestinales de otro tipo y 202 donantes de sangre sanos (niños = 113, adultos = 89). Los resultados de este estudio se ilustran en la tabla 1 al final de este documento.

Mediante los ensayos de anticuerpos antigliadina IgG e IgA Immulisa™ se observaron las siguientes incidencias de AGA en individuos normales, pacientes con EC y otras condiciones patológicas. Los AGA de clase IgA son específicos de la EC con una sensibilidad del 90%; por su parte, los AGA de clase IgG son indicadores sensibles de EC. Véase la Tabla 2.

El algoritmo de la tabla 3 es una guía de interpretación de los análisis serológicos para EC.

Algunos estudiosos han tomado el enfoque de la figura 3 para diagnosticar EC a través de métodos serológicos.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Los resultados obtenidos con los análisis AGA IgG e IgA Immulisa™ se compararon con el análisis de anticuerpos antiendomisiales (EMA) Immuglo™ para el diagnóstico de EC. En la comparación se involucró a un total de 186 individuos; el estudio incluía a 34 pacientes que seguían una dieta con gluten y 32 sometidos a dieta sin gluten con diagnóstico de EC confirmado a través de una biopsia, como establecen los criterios de ESPGAN. **Los resultados se presentan en las tablas 4 y 5 al final de este documento.**

Precisión:

Se analizaron muestras con concentraciones conocidas de AGA, repitiendo el análisis 10 veces a lo largo de dos semanas. El coeficiente de variación (CV) intraensayo e interensayo se muestra en las **tablas 6 y 7.**

Recuperación

Se mezclaron muestras con concentración conocida de AGA con las diluciones adecuadas de otra muestra positiva con cantidad conocida de AGA, se determinaron los niveles de anticuerpos antigliadina de las muestras mezcladas y a partir de los valores obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación. Los resultados se presentan en la **tabla 8.**



IMMCO
DIAGNOSTICS

Anti-Gliadin-Antikörper-ELISA (AGA)

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1117A IgA-AGA-ELISA 96 Bestimmungen

REF 1117G IgG-AGA ELISA 96 Bestimmungen

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von IgG- und IgA-Anti-Gliadin-Antikörpern in Humanserum als Hilfsmittel bei der Diagnose von Patienten mit Zöliakie und *Dermatitis herpetiformis*.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Glutensensitive Enteropathie (GSE), d.h. Zöliakie und *Dermatitis herpetiformis* (DH), ist eine verbreitete, klinisch heterogene gastrointestinale Erkrankung mit Empfindlichkeit gegen Gluten; sie kann mit nicht-klassischen oder minimalen Symptomen auftreten¹. Mit GSE besteht ein gewisses genetisches Element, was daraus zu ersehen ist, dass etwa 5-10% von Verwandten ersten Grades an symptomatischer oder asymptomatischer Zöliakie leiden. Bei kleinwüchsigen Kindern und Patienten mit insulinabhängigem Diabetes und anderen Autoimmunerkrankungen besteht ebenfalls eine größere Wahrscheinlichkeit für eine Entwicklung von GSE. Ein striktes Vermeiden von Gluten in der Ernährung wird empfohlen, um die Krankheitsaktivität unter Kontrolle zu halten, und eine frühe Diagnose kann die Gesamtprognose solcher Patienten verbessern².

Die veröffentlichte Literatur empfiehlt die Anwendung serologischer Tests für Patienten, bei denen ein Verdacht auf GSE besteht, sowie zur Überwachung der Einhaltung der Diät³⁻⁶. Die European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) empfiehlt das Einbeziehen von verschiedenen serologischen Tests, um die Anzahl der für die Diagnose erforderlichen intestinalen Biopsien zu reduzieren⁷. Zu diesen zählen Tests auf Anti-Gliadin-(AGA), Anti-Retikulin-(ARA) und Anti-Endomysium-Antikörper (EMA). Von diesen wurden AGA am eingehendsten untersucht⁸⁻²⁰. Mit ELISA werden AGA sowohl der Klasse IgA als auch der Klasse IgG im Serum von Patienten mit GSE nachgewiesen. Von diesen scheinen AGA der Klasse IgG sensitivere aber weniger spezifische Marker für GSE zu sein als AGA der Klasse IgA. Andererseits sind AGA der Klasse IgA weniger sensitiv aber spezifischer für GSE.

TESTPRINZIP

Gliadin-Antigen wird an die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte aus Polystyrol gebunden. Anschließend werden die unreaktierten Stellen blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibratoren und verdünnte Patientenserum werden in separate Vertiefungen gegeben; dies ermöglicht die Bindung der eventuell vorhandenen Gliadin-Antikörper an das immobilisierte Antigen. Ungebundene Proben werden durch Waschen entfernt, und jeder Vertiefung wird ein enzymmarkiertes Anti-human-IgG- oder -IgA-Konjugat hinzugefügt. Diese enzymkonjugierten Antikörper binden sich spezifisch an das Immunglobulin der entsprechenden Klasse. Nachdem eventuell nicht gebundenes Konjugat durch Waschen entfernt wurde, wird den Vertiefungen ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) hinzugefügt. Nachdem die enzymatische Reaktion gestoppt wurde, wird die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) angegeben.

REAGENZIEN

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.**

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. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

DE

Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum. 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 jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis²¹.

WARNUNG Natriumazid (N-N₃) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metalazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anheftung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer.

Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten.

Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

Mitgelieferte Materialien

ImmuLisa™ IgA-AGA-ELISA **REF** 1117A

ImmuLisa™ IgG-AGA-ELISA **REF** 1117G

12 x 8	MICROPLATE AGA	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit Gliadin-Antigen beschichtet
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A AGA * †	Gebrauchsfertiger Kalibrator A (grüneappe). Humanserum mit Antikörpern gegen Gliadin.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B AGA * †	Gebrauchsfertiger Kalibrator B (lilaappe). Humanserum mit Antikörpern gegen Gliadin.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C AGA * †	Gebrauchsfertiger Kalibrator C (blaueappe). Humanserum mit Antikörpern gegen Gliadin.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D AGA * †	Gebrauchsfertiger Kalibrator D (gelbeappe). Humanserum mit Antikörpern gegen Gliadin.
1 x 1.5 ml	CONTROL + AGA * †	Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (roteappe). Enthält AGA-positives Humanserum.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (weißeappe). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS * †	Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Gebrauchsfertiger Serumverdüner . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Gebrauchsfertiges Enzymsubstrat . Enthält pNPP. Vor Licht schützen .

DE

1 x 12 ml **STOP**

Gebrauchsfertige **Stopplösung**.

2 x **BUF** **WASH**

Waschpuffer in Pulverform. Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

* Enthält $< 0.1\%$ NaN_3

† **REF** 1117A enthält IgA-AGA-Kalibratoren und -Kontrollseren sowie IgA-Konjugat

REF 1117G enthält IgG-AGA-Kalibratoren und -Kontrollseren sowie IgG-Konjugat

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

LOT Chargennummer

REF Bestellnummer


 Verwendbar bis

 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

IVD In-vitro-Diagnostikum

 Hersteller

 Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 μl bis 1000 μl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 μl

PROBENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hemolysierte, lipemische 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.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig diese Anweisungen, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Bringen Sie alle Reagenzien und Proben 30 Minuten lang auf Raumtemperatur (20-26 °C). Stellen Sie die Materialien sofort nach ihrer Anwendung wieder in den Kühlschrank.

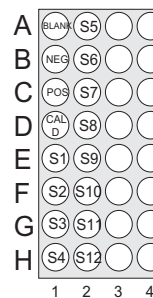
DE

- Bereiten Sie alle Verdünnungen der Patientenproben vor Beginn des Tests vor.
- **Geben Sie nicht verwendete Streifen sofort wieder in den Beutel mit dem Trockenmittel und verschließen Sie diesen fest, um den Kontakt mit Wasserdampf so gering wie möglich zu halten.**
- Waschschritt: Eine gute Methode ist unerlässlich. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Eine sorgfältige zeitliche Koordinierung ist wichtig. Die Inkubationszeit beginnt nach der Verteilung der Reagenzien.

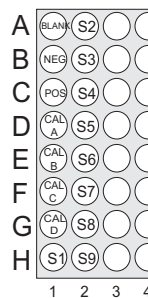
Testverfahren

1. **ALLE REAGENZIEN MÜSSEN VOR BEGINN DES TESTS AUF RAUMTEMPERATUR (20-26 °C) GEBRACHT WERDEN.**
2. Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in der Mikrotiterplatte zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.
3. **Qualitative Bestimmung:** Verwenden Sie nur Kalibrator D. **Semi-quantitative Bestimmung:** Verwenden Sie Kalibratoren A-D wie im untenstehenden Beispiel gezeigt.

QUALITATIVE BESTIMMUNG



SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG



4. Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:51**, indem Sie **10 µl** der Patientenprobe mit **0,5 ml** Probenverdünnung vermischen.
5. Geben Sie **100 µl** der Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.
Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünnung als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null. Die Extinktion dieser Vertiefung sollte nicht über 0,3 liegen.
6. Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur auf einer ebenen Oberfläche.
7. **W**-schritt: Säugen Sie den Inhalt jeder Vertiefung gründlich aus. Geben Sie 200-300 µl des **rekonstituierten** Waschlösungspuffers in alle Vertiefungen und saugen Sie ihn anschließend ab. Wiederholen Sie diese Schritte noch dreimal, bis Sie insgesamt viermal gewaschen haben. Drehen Sie die Platte um und klopfen Sie sie über saugfähigem Material ab, um jegliche nach dem letzten Waschen verbliebene Flüssigkeit zu entfernen. Trocknen Sie die Vertiefungen nicht vollständig.
8. Geben Sie 100 µl Konjugat in jede Vertiefung.
9. Inkubieren Sie die Vertiefungen **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
10. Waschschritt: Wiederholen Sie Schritt 7.
11. Geben Sie 100 µl Enzymsubstrat in jede Vertiefung.
12. Inkubieren Sie die Vertiefungen **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

DE

13. Geben Sie 100 µL Stopplösung in jede Vertiefung. Bewahren Sie bei der Zugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Geschwindigkeit bei, die Sie für das Enzymsubstrat verwendet haben. Lesen Sie die Extinktion (OD) jeder Vertiefung innerhalb einer Stunde bei 405 nm ab.
14. Lesen Sie die Extinktion (OD) jeder Vertiefung bei 405 nm mit einem Mikrotiterplattenreader mit einer oder zwei Wellenlängen gegen die auf Null-Extinktion eingestellte Blindprobe ab.

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 <20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, verwenden Sie den Mittelwert der beiden Messungen, um die EU/ml zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

ERGEBNISSE

Berechnungen

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

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Ext. der Testprobe

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

Ext. von Kalibrator D

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D 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.

Kalibrator

Die Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte zu bestimmen, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorenkurve fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren. Siehe das Beispiel für eine Standardkurve (Abb. 1) am Ende des Dokuments.

Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborergebnisse. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen.

	AGA-IgG-Wert		
	Kind	Erwachsener	Interpretation
<28 EU/ml		<20 EU/ml	Neg (-)
>28 EU/ml		>20 EU/ml	Pos (+)
	AGA-IgA-Wert		
	Kind	Erwachsener	Interpretation
<23 EU/ml		<20 EU/ml	Neg (-)
>23 EU/ml		>20 EU/ml	Pos (+)

DE

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Dieser Test sollte nicht an stark hämolysierten, mikrobiell 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 Zöliakiepatienten mit IgA-Mangel kann der IgA-AGA-Test negativ ausfallen.

Erwartete Werte

Die erwarteten Ergebnisse in einer normalen Population sind negativ (<20 EU/ml für Erwachsene und <23-28 EU/ml für Kinder). Es wurde jedoch nachgewiesen, dass einige anscheinend gesunde, asymptomatische Personen bei einem Test auf IgA- oder IgG-Anti-Gliadin-Antikörper positive Ergebnisse zeigen können. **Siehe Abb. 2.**

Klinische Studien

Die Sensitivität und Spezifität des IgG- und IgA-AGA-Tests wurden bestimmt, indem Patienten mit aktiver Zöliakie (Kinder=38), Patienten mit DH (Erwachsene=10), Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen (Erwachsene=200), Patienten mit *Pemphigus* und *Pemphigoid* (Erwachsene=69), Patienten mit anderen gastrointestinalen Erkrankungen und 202 normale Blutspender (Kinder=113 und Erwachsene=89) getestet wurden. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Tabelle 1 am Ende dieses Dokuments dargestellt.

Bei Anwendung der ImmuLisa™ IgG- und IgA-Anti-Gliadin-Antikörper-Testkits wurden die folgenden Häufigkeiten von AGA bei normalen Testpersonen, bei Zöliakiepatienten und bei anderen Krankheiten beobachtet. AGA der Klasse IgA sind spezifisch für Zöliakie mit einer Sensitivität von 90%. Andererseits sind IgG-AGA sensitive Marker für Zöliakie. Siehe Tabelle 2.

Der Algorithmus in Tabelle 3 dient als Richtlinie bei der Auslegung serologischer Tests auf Zöliakie.

Einige Forscher haben den in Abb. 3 gezeigten Ansatz verwendet, um mittels serologischer Methoden eine Zöliakiediagnose zu stellen.

LEISTUNGSMERKMALE

Die mit dem ImmuLisa™ IgG- und IgA-AGA-Test erhaltenen Ergebnisse wurden mit dem ImmuGlo™ Anti-Endomysium-Antikörper-Kit (EMA) für die Diagnose von Zöliakie verglichen. Der Vergleich schloss insgesamt 186 Testpersonen ein. Darunter befanden sich 34 Patienten mit einer Gluten enthaltenden Ernährung und 32 Patienten mit einer glutenfreien Ernährung, bei denen eine biopsiebestätigte Zöliakiediagnose gemäß den ESPGAN-Kriterien bestand. **Die Ergebnisse sind in Tabellen 4 und 5 am Ende dieses Dokuments angezeigt.**

Genauigkeit:

Proben mit einer bekannten AGA-Konzentration wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen hinweg zehnmal getestet. Die intraserialen und interserialen Variationskoeffizienten (VK) sind in **Tabellen 6 und 7** angezeigt.

Wiederfindung

Proben mit bekannten AGA-Konzentrationen wurden mit geeigneten Verdünnungen einer anderen positiven Probe mit einer bekannten Menge an AGA gemischt. Die Anti-Gliadin-Antikörperspiegel der gemischten Proben wurden bestimmt und die Wiederfindung in Prozent wurde aus den erhaltenen Werten errechnet. Die Ergebnisse sind in **Tabellen 8.**



Anticorps anti-gliadine (AGA) ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1117A IgA-AGA ELISA 96 Tests

REF 1117G IgG-AGA ELISA 96 ests

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA, destinée à la détection et la semi-quantification des anticorps anti-gliadine IgG ou IgA dans le sérum humain, destinée à fournir un support dans le diagnostic des patients souffrant de maladie cœliaque et de dermatite herpétiforme.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

L'entéropathie sensible au gluten (GSE), c'est-à-dire la *maladie cœliaque* (CD) et la *dermatite herpétiforme* (DH), est une maladie gastro-intestinale hétérogène cliniquement commune avec sensibilité au gluten et peut se présenter par des symptômes non-classiques ou minimaux¹. Il existe certaines composantes génétiques associées à la GSE, ce qui est démontré par le fait qu'environ 5-10% de la famille du premier degré de parenté du patient présentent des maladies cœliaques symptomatiques ou asymptomatiques. Les enfants de petite stature et les patients souffrant de diabète insulino-dépendant et d'autres maladies auto-immunes manifestent également une plus grande probabilité de développer une entéropathie sensible au gluten (GSE). Une élimination stricte du gluten de l'alimentation est recommandée afin de contrôler l'activité de la maladie et un diagnostic précocement posé chez de tels patients est en mesure d'améliorer leur pronostic général².

La littérature scientifique publiée suggère un recours au test sérologique chez les patients chez qui on suspecte une GSE et de contrôler la bonne observance du régime³⁻⁶. La Société européenne de Gastro-entérologie Pédiatrique et de Nutrition (ESPGAN) a recommandé la réalisation de plusieurs tests sérologiques afin de limiter le nombre des biopsies intestinales qui sont nécessaires pour poser un diagnostic⁷. Ceux-ci comprennent les tests par anticorps anti-gliadine (AGA), anti-réticuline (ARA) et anti-endomysial (EMA). Parmi ceux-ci, ce sont les anticorps anti-gliadine qui ont été le plus étudiés⁸⁻²⁰. Par le recours à une technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA, aussi bien les anticorps anti-gliadine de classe IgG que de classe IgA sont détectés dans le sérum de patients présentant une entéropathie sensible au gluten. Parmi ceux-ci, les anticorps anti-gliadine de la classe IgG semblent des indicateurs de GSE plus sensibles mais moins spécifiques que les anticorps anti-gliadine de la classe IgA. Les anticorps anti-gliadine de la classe IgG d'un autre côté sont moins sensibles mais plus spécifiques pour la GSE.

PRINCIPES DE LA MÉTHODE

L'antigène gliadine est lié aux puits d'une plaquette de puits en polystyrène, suivi par un blocage des sites sans réaction afin de limiter l'agglutination non spécifique. Les régulateurs, les calibreurs et le sérum dilué du patient sont ajoutés aux puits séparés, en permettant aux anticorps anti-gliadine présents de se lier à l'antigène immobilisé. L'échantillon non lié est éliminé par lavage et un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG ou l'IgA humain est ajouté à chaque puits. Ces anticorps conjugués à une enzyme se lient de manière spécifique à l'immunoglobuline humaine de la classe appropriée. Après élimination par lavage de tout le conjugué non lié, le substrat spécifique de la phosphatase alcaline (pNPP - paranitrophénylphosphate) est alors ajouté aux puits. La réaction enzymatique est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA par millilitre (EU)/ml.

RÉACTIFS

Stockage et Préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8°C. **Ne pas congeler.** Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant l'usage. Quand elle est entreposée à 2-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration de l'équipement. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée. Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

Pr cautions

Destiné à un usage diagnostique in vitro. Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours des opérations de stockage, de distribution et de manipulation de ce matériel²¹. **AVERTISSEMENT** L'azide de sodium peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue d'Immco Diagnostics Inc.

Il faut avoir recours à de bonnes techniques de laboratoire pour minimiser la contamination microbienne et chimique. Ne pas utiliser après l'expiration de la date de péremption.

Matériel fourni

ImmulinTM IgA-AGA ELISA **REF** 1117A

ImmulinTM IgG-AGA ELISA **REF** 1117G

12 x 8	MICROPLATE AGA	Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène gliadine.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A AGA * †	Etalon A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-gliadine.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B AGA * †	Etalon B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-gliadine.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C AGA * †	Etalon C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-gliadine.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D AGA * †	Etalon D (<i>couvercle jaune</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-gliadine.
1 x 1.5 ml	CONTROL + AGA * †	Contrôle positif (<i>couvercle rouge</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif AGA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Contrôle négatif (<i>couvercle blanc</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines prêt à l'emploi. Code couleur rose.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS * †	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines prêt à l'emploi. Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL *	Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. Protège de la lumière.
1 x 12 ml	STOP	Solution d'arrêt prête à l'emploi.

FR

2 x

BUF WASH

Tampon de lavage en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

* Contient < 0.1% NaN₃

† **REF** 1117A contient les étalons IgA-AGA, les solutions de contrôle et le conjugué IgA


REF 1117G contient les étalons IgG-AGA, les solutions de contrôle et le conjugué IgG

Symboles utilisés sur les étiquettes:

LOT Numéro de lot

REF Numéro de référence catalogue


 À utiliser avant

 Température de conservation

 Lire les instructions d'utilisation

IVD Pour usage diagnostique In vitro

 Fabricant

 Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl

- Bouchons de pipette jetables
- Prouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprovettes de test
- Eau distillée ou désionisée
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Nettoyeur automatique de microplaque en mesure de dispenser 200 µl

RÉCOLTE DES SPÉCIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROCÉDURE

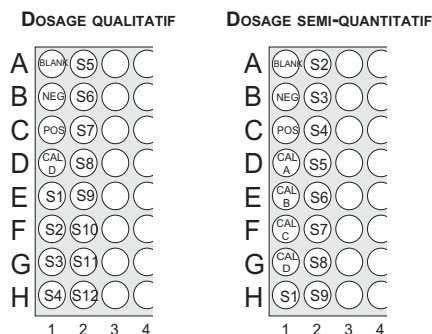
Notes de procédure

- Avant de commencer l'essai, il faut lire les présentes instructions avec soin.
- Amener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (20-26°C) pendant 30 minutes. Remettre le sachet dans le réfrigérateur immédiatement après son utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des spécimens patients avant de commencer le test.

- **Remettre immédiatement les bandes inutilisées dans le sachet contenant des produits dessiccateurs et sceller avec soin pour limiter le plus possible l'exposition à la vapeur d'eau.**
- **tape du lavage :** Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- Un chronométrage soigneux est important. Les périodes d'incubation commencent après avoir dispensé les réactifs.

Procédure d'essai

1. **TOUS LES REACTIFS DOIVENT ÊTRE AMENÉS À TEMPÉRATURE AMBIANTE (20-26 C) AVANT USAGE.**
2. **Étiqueter le feuillet du protocole pour indiquer l'emplacement du spécimen dans la microplaque.** Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.
3. **Dosage qualitatif :** utiliser seulement le calibreur D. **Dosage semi-quantitatif :** Utiliser les calibreurs A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.



4. **Préparer une dilution 1:51** de spécimen patient en mélangeant 10 μ l d'échantillon de patient avec **0,5 ml** de diluant de sérum.
5. Ajouter **100 μ l** de calibreurs, de régulateurs positif et négatif et d'échantillons de patient dilués dans les micropuits appropriés indiqués dans le dossier du protocole.
Note : Inclure un puits qui contient 1 **100 μ l** du diluant de sérum à titre de réactif à blanc. Mettre à zéro le lecteur ELISA sur le réactif à blanc. L'absorption de ce puits ne doit pas être supérieure à 0.3.
6. Incuber pendant 30 minutes (\pm 5 minutes) à température ambiante sur une surface plane.
7. **tape du lavage :** Aspirer soigneusement le contenu de chaque puits. Ajouter 200-300 μ l de solution de lavage **reconstituée** aux puits et ensuite aspirer. Répéter cette séquence trois fois pour un total de quatre lavages. Renverser la plaque et la tapoter sur un matériau absorbant pour enlever tout le fluide résiduel après le dernier lavage. Ne pas sécher complètement les puits.
8. Ajouter 100 μ l de conjugué à chaque puits.
9. Incuber les puits pendant **30 minutes** (\pm 5 min) à température ambiante.
10. **Étape du lavage :** Recommencer l'étape 7.
11. Ajouter 100 μ l de substrat d'enzyme à chaque puits.
12. Incuber les puits pendant **30 minutes** (\pm 5 min) à température ambiante.
13. Ajouter 100 μ l de solution d'arrêt à chaque puits. Maintenir la même séquence et le même chronométrage pour l'addition de la solution d'arrêt que celles qui furent utilisées pour le substrat d'enzyme. Lire l'absorption (OD) de chacun des puits à 405nm dans l'heure qui suit la réaction.

14. Lire l'absorption (OD) de chaque puits à 405nm, en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

Des calibres, des régulateurs positif et négatif et un réactif à blanc doivent être utilisés à chaque essai pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif à blanc doit être inférieure à 0,3 Le calibre A doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est effectué en double, il faut prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer l'EU/ml. Quand on procède aux dosages qualitatifs, la densité optique du Calibre D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs dans la plage figurant sur la fiole.

RÉSULTATS

Calculs

Les concentrations des échantillons de patient peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

1. DOSAGE QUALITATIF

Abs. de l'échantillon d'essai

$$\frac{\text{Abs. de l'échantillon d'essai}}{\text{Abs. du calibre D}} \times \text{EU/ml du calibre D} = \text{EU/ml échantillon de test}$$

Abs. du calibre D

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption du Calibre A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en EU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe meilleure. Déterminer les concentrations des échantillons de patient à partir de la courbe par rapport à sa valeur d'absorption.

Calibreur

Les calibres prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patients qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux du calibre A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent en outre être dilués de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe du calibreur quand on refait l'essai. Pour la détermination EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution. Consulter les courbes standards d'échantillon (Figure 1) à la fin de ce document.

Interprétation

Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

AGA-IgG Valeur		Interprétation
Enfant	Adulte	
<28 EU/ml	<20 EU/ml	NEG (-)
>28 EU/ml	>20 EU/ml	POS (+)

AGA-IgA Valeur		Interprétation
Enfant	Adulte	
<23 EU/ml	<20 EU/ml	NEG (-)
>23 EU/ml	>20 EU/ml	POS (+)

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Le test ne devrait pas être exécuté sur des échantillons grossièrement hémolysés, contaminés du point de vue microbien ou lipémiques. Cette méthode doit uniquement être utilisée pour le test d'échantillons de sérum humain. Les résultats obtenus servent seulement comme aide dans le diagnostic et ne devraient pas être interprétés comme un diagnostic par eux-mêmes. Chez les patients souffrant de maladie cœliaque avec déficience en IgA, les anticorps anti-gliadine IgA peuvent être négatifs.

Valeurs attendues

Les valeurs attendues dans une population normale sont négatives (< 20 EU/ml pour les adultes et les enfants). Cependant, on a remarqué que certains individus apparemment sains, asymptomatiques peuvent apparaître positifs pour les anticorps anti-gliadine IgG et IgA. **Voir Figure 2.**

Études cliniques

La sensibilité et la spécificité des tests par anticorps anti-gliadine IgG et IgA ont été déterminés en testant des patients présentant une maladie cœliaque en cours (enfants=38), des patients avec dermatite herpétiforme (adultes=10), des patients atteints de désordres thyroïdiens (adultes=200), des patients avec pemphigus et pemphigoïde (adultes=69), des patients atteints d'autres maladies gastro-intestinales et 202 donateurs de sang normaux (enfants=113 et adultes=89). Les résultats de cette étude figurent dans le tableau 1 à la fin du présent document.

Quand on utilise les kits anticorps anti-gliadine IgG et IgA ImmuLisa™, on a observé chez des patients normaux, atteints de maladie cœliaque et d'autres maladies les fréquences d'anticorps anti-gliadine suivantes. Les anticorps anti-gliadine de la classe IgA sont spécifiques de la maladie cœliaque avec une sensibilité de 90%. Les anticorps anti-gliadine IgG, d'autre part, sont des indicateurs sensibles de la maladie cœliaque. Voir tableau 2.

L'algorithme du Tableau 3 sert de guide pour l'interprétation du test sérologique pour la maladie cœliaque.

Certains chercheurs ont adopté l'approche de la Figure 3 pour établir le diagnostic de maladie cœliaque en ayant recours à des méthodes sérologiques.

DONNÉES DE RENDEMENT

Les résultats obtenus avec le test par anticorps anti-gliadine IgG et IgA ImmuLisa™ ont été comparés avec le kit de test par anticorps anti-endomysial (EMA) ImmuGlo™ pour diagnostiquer la maladie cœliaque. La comparaison a porté sur un total de 186 sérums : On a inclus dans l'étude 34 patients sous régime avec gluten et 32 patients avec régime exempt de gluten présentant un diagnostic de maladie cœliaque confirmé par biopsie conformément aux critères de l'ESPGAN (Société européenne de Gastro-entérologie Pédiatrique et de Nutrition). **Les résultats figurent dans les tableaux 4 et 5 à la fin de ce document.**

Précision :

Des échantillons avec des concentrations connues d'AGA ont été analysés dans 10 mesures sur une période de deux semaines. Le coefficient de variation intra et inter-essai (CV) apparaît dans les **tableaux 6 et 7** à la fin de ce document.

Récupération :

Des échantillons avec des concentrations connues d'anticorps anti-gliadine AGA ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon avec des montants connus d'anticorps de type AGA. Les niveaux des anticorps des échantillons mélangés ont été déterminés et on a calculé le pourcentage de récupération à partir des valeurs obtenues. Les résultats figurent dans les **Tableaux 8.**



Anticorpi Anti-gliadina (AGA) ELISA

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1117A AGA-IgA ELISA 96 Determinazioni

REF 1117G AGA-IgG ELISA 96 Determinazioni

Test immunoenzimatico (ELISA) per la ricerca e la semiquantificazione di anticorpi anti-gliadina di classe IgG o IgA nel siero come strumento utile nella diagnosi dei pazienti affetti da celiachia o da dermatite erpetiforme.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

L'enteropatia glutine sensibile (EGS), o malattia celiaca (MC) e la dermatite erpetiforme (DH) sono disturbi gastrointestinali comuni, clinicamente eterogenei, causati dalla sensibilità al glutine, che pu manifestarsi con sintomi non classici o minimi¹. Esiste una componente genetica associata con la EGS, illustrata dalla dimostrazione che circa il 5-10% dei parenti di primo grado sono affetti da MC sintomatica o asintomatica. I bambini di bassa statura e i pazienti con diabete insulino-dipendente e con altre malattie autoimmuni hanno una maggiore probabilità di sviluppare la EGS. Per controllare l'attività della malattia viene raccomandata una dieta priva di glutine e una diagnosi precoce di questi pazienti pu migliorare la prognosi generale².

La letteratura pubblicata suggerisce l'uso di analisi sierologiche per lo screening dei pazienti con sospetta EGS e per il monitoraggio della conformità alla dieta³⁻⁶. La Società Europea di Gastroenterologia e Nutrizione Pediatrica (ESPGAN) ha raccomandato l'inclusione di una serie di test sierologici per ridurre il numero di biopsie intestinali necessarie all'ottenimento di una diagnosi⁷. Queste analisi includono i test per gli anticorpi anti-gliadina (AGA), anti-reticolina (ARA) e anti-endomisio (EMA). Di questi test, il più studiato è quello per gli AGA⁸⁻²⁰. Avvalendosi della metodologia ELISA gli AGA di classe IgA e di classe IgG sono rilevati nei sieri dei pazienti con EGS. Di questi, gli AGA di classe IgG sembrano essere maggiormente sensibili, ma si rivelano indicatori con minore specificità per la EGS degli AGA di classe IgA. In contrapposizione, gli AGA di classe IgA sono meno sensibili, ma più specifici per la EGS.

PRINCIPI DELLE METODICHE

L'antigene gliadina si lega ai pozzetti presenti su una micropiastra in polistirene, segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito, per ridurre i legami non specifici. Controlli, calibratori e campioni diluiti di siero del paziente vengono incubati in pozzetti separati, e ci permette agli anticorpi anti-gliadina presenti nel siero di legarsi all'antigene immobilizzato. Il campione non legato viene lavato via e in ciascun pozzetto viene aggiunto un coniugato anti-IgA o IgG umane marcato con enzima. Questi anticorpi coniugati con l'enzima si legano in modo specifico all'immunoglobulina umana di classe appropriata. Successivamente alla rimozione mediante lavaggio del coniugato non legato, nei pozzetti viene aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP). La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in unità ELISA (EU)/ml.

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.** Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Le strisce con i pozzetti sono monouso.

Precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali²¹. **ATTENZIONE** – L'azide sodica (NaN₃) pu reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante

lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo.

Usare tecniche di laboratorio idonee per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Materiali forniti

AGA-IgA ELISA ImmuLisa™ **REF** 1117A

AGA-IgG ELISA ImmuLisa™ **REF** 1117G


12 x 8	MICROPLATE AGA	Micropiastra con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene gliadina
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A AGA * †	Calibratore A (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-gliadina
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B AGA * †	Calibratore B (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-gliadina.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C AGA * †	Calibratore C (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-gliadina.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D AGA * †	Calibratore D (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-gliadina.
1 x 1,5 ml	CONTROL + AGA * †	Controllo Positivo (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per AGA.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umane pronto all'uso; di colore rosa.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS * †	Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umane pronto all'uso; di colore rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluente siero pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato Enzimatico pronto all'uso. Contiene pNPP. Proteggere dalla luce.
1 x 12 ml	STOP	Soluzione di Stop pronta all'uso.
2 x	BUF WASH	Tampone di Lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

* Contiene < 0,1% NaN₃

† **REF** 1117A contiene calibratori AGA-IgA, controlli e coniugati IgA.


REF 1117G contiene calibratori AGA-IgG, controlli e coniugati IgG.


Simboli usati sulle etichette:

 Numero di lotto

 Numero catalogo

 Scadenza

 Temperatura di conservazione

 Leggere le istruzioni per l'uso

 Uso diagnostico in vitro

 Produttore

 Numero di test

Materiali necessari ma non forniti

- Pipette con capacità di dispensazione da 5 μ l a 1000 μ l
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Timer
- Carta assorbente
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 μ l

RACCOLTA DEL CAMPIONE

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

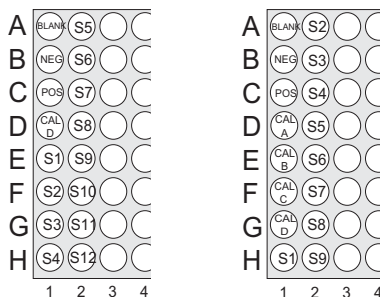
PROCEDURA**Note sul test**

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti (20-26°C) per 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i materiali non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- **Riporre immediatamente le strisce inutilizzate nella busta di confezionamento dove sono presenti dissecanti e sigillare per minimizzare l'esposizione a vapore acqueo.**
- Fase di lavaggio: Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 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.

Metodo del test

- TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26 C) PRIMA DELL'INIZIO DEL TEST.**
- Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nella micropiastra. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Determinazione qualitativa:** usare unicamente il Calibratore D.
DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA usare i Calibratori da A a D pronti all'uso, come illustrato nell'esempio di disposizione riportato sotto:

DETERMINAZIONE QUALITATIVA DETERMINAZIONE SEMI-QUANTITATIVA



- Preparare una diluizione **1:51** del campione del paziente mescolando **10 µl** di campione con **0,5 ml** di Diluente del Siero.
- Aggiungere **100 I** di Calibratori, di Controlli Positivi e Negativi e di campioni del paziente diluiti nei pozzetti appropriati come indicato sul foglio protocollo.
Nota: Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco. L'assorbanza del bianco non deve essere superiore a 0,3.
- Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente su una superficie piana.
- Fase di lavaggio: Aspirare completamente i contenuti di ciascun pozzetto. Aggiungere 200-300µL del tampone di lavaggio **ricostituito** in tutti i pozzetti e poi aspirare. Ripetere questa sequenza per altre tre volte per un totale di quattro lavaggi. Invertire la piastra e batterla su materiale assorbente per rimuovere residui di liquido dell'ultimo lavaggio. Non asciugare i pozzetti completamente.
- Aggiungere 100µL di Coniugato in ogni pozzetto.
- Incubare i pozzetti per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase di lavaggio: Ripetere la procedura 7.
- Aggiungere 100µL di Substrato Enzimatico in ogni pozzetto.
- Incubare i pozzetti per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Aggiungere 100µL di Soluzione di Stop in ciascun pozzetto. Per l'aggiunta della Soluzione di Stop rispettare lo stesso ordine e gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
- Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia 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

IT

calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore <20 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, prendere la media delle due letture per determinare il valore EU/ml. Se si eseguono le determinazioni qualitative, l'assorbanza del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore di quella del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

Assorbanza del campione del test

----- X EU/ml del Calibratore D = EU/ml del Campione

Assorbanza del calibratore D

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.

Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione. Vedere le curve standard del campione (Figura 1) alla fine di questo foglio.

Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati di laboratorio. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali.

Valore AGA-IgG		Interpretazione
Bambini	Adulti	
<28 EU/ml	<20 EU/ml	Neg (-)
>28 EU/ml	>20 EU/ml	Pos (+)

Valore AGA-IgA		Interpretazione
Bambini	Adulti	
<23 EU/ml	<20 EU/ml	Neg (-)
>23 EU/ml	>20 EU/ml	Pos (+)

LIMITAZIONI DEL TEST

Il test per gli AGA non deve essere eseguito su campioni fortemente emolizzati, microbiologicamente contaminati o lipemici. Questa metodica deve essere usata per testare solo campioni di siero umano. I risultati ottenuti rappresentano unicamente un elemento di supporto alla diagnosi, considerati singolarmente non hanno valenza diagnostica. Nei pazienti celiaci con deficit di IgA, gli AGA-IgA possono essere negativi.

IT

Valori Attesi

I valori attesi in una popolazione normale sono negativi (<20 EU/ml per adulti e <23-28 EU/ml per i bambini). Tuttavia, è stato determinato che alcuni individui apparentemente sani e asintomatici possono risultare positivi agli anticorpi anti-gliadina di classe IgA o IgG. **Vedere Figura 2.**

Studi Clinici

La sensibilità e la specificità dei test per gli AGA- IgA e IgG è stata determinata analizzando campioni da pazienti con MC attiva (bambini = 38), pazienti con DH (adulti = 10), pazienti con disturbi tiroidei (adulti = 200), pazienti con pemfigo e pemfigoidi (adulti = 69), pazienti con altre malattie gastrointestinali e 202 donatori normali (bambini = 113 e adulti = 89). I risultati di questo studio sono riassunti nella Tabella 1 alla fine di questo foglio.

Con i kit per l'analisi degli anticorpi anti-gliadina IgA e IgG Immulisa™ sono state osservate le seguenti incidenze di AGA in individui normali, in pazienti con MC e con altri disturbi. Gli AGA di classe IgA sono specifici per la MC con sensibilità del 90%. Gli AGA-IgG si rivelano invece indicatori sensibili della MC. Vedere Tabella 2.

L'algoritmo in tabella 3 serve da guida per l'interpretazione dei test sierologici per la MC.

Alcuni ricercatori hanno adottato l'approccio presentato nella Figura 3 per stabilire una diagnosi di MC usando i metodi sierologici.

Caratteristiche di PERFORMANCE

I risultati ottenuti con il Test per gli AGA IgG e IgA Immulisa™ sono stati comparati con quelli ottenuti con il kit per gli anticorpi anti-endomisio (EMA) ImmuGlo™ per la diagnosi della MC. La comparazione ha incluso un totale di 186 individui. Sono stati inclusi nello studio 34 pazienti in regime di dieta contenente glutine e 32 pazienti in regime di dieta priva di glutine con una diagnosi di MC confermata da biopsia secondo i criteri della ESPGAN. **I risultati sono riassunti nelle Tabelle 4 e 5 alla fine di questo foglio.**

Precisione:

Campioni con concentrazioni note di AGA sono stati analizzati in 10 replicati nell'arco di un periodo di due settimane. Il coefficiente di variazione (CV) all'interno di uno stesso saggio tra un saggio e l'altro compare nelle Tabelle 6 e 7.

Recupero

I campioni con concentrazioni note di AGA sono stati miscelati con diluizioni appropriate di un altro campione positivo con quantitativo noto di AGA. I livelli di anticorpi anti-gliadina dei campioni miscelati sono stati determinati e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di recupero. I risultati sono raccolti nella Tabella 8:



IMMCO
DIAGNOSTICS

ELISA para Anticorpos Anti-Gliadina (AGA)

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1117A IgA-AGA ELISA 96 Determina es

REF 1117G IgG-AGA ELISA 96 Determina es

É um exame de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a detecção e semiquantificação de anticorpos IgG ou IgA anti-gliadina no soro humano para auxiliar no diagnóstico de doentes com doença celíaca e dermatite herpetiforme.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A enteropatia sensível ao glúten (ESG), ou seja, a *doença celíaca* (DC) e a *dermatite herpetiforme* (DH), é uma patologia gastrointestinal comum clinicamente heterogénea com sensibilidade ao glúten e pode apresentar sintomas não clássicos ou mínimos¹. Existe um componente genético associado à ESG o qual é ilustrado mostrando que aproximadamente 5 a 10% dos familiares de primeiro grau têm DC sintomática ou assintomática. As crianças de baixa estatura e os doentes insulino-dependentes e outras patologias auto-imunes também demonstram uma maior probabilidade de desenvolver a ESG. É recomendada uma restrição rigorosa de glúten na dieta para controlar a actividade da doença e um diagnóstico precoce nesses doentes poderá incrementar o seu prognóstico geral².

A literatura publicada sugere a utilização de testes serológicos nos doentes suspeitos de terem ESG e a monitorização do cumprimento da dieta³⁻⁶. A Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica (ESPGAN) aconselhou a inclusão de diversos testes serológicos para reduzir a quantidade de biopsias intestinais necessárias para efectuar o diagnóstico⁷. Estes incluem testes de anticorpos anti-gliadina (AGA), anti-reticulina (ARA) e anti-endomisiais (EMA). Destes, os AGA foram os mais estudados⁸⁻²⁰. Usando ELISA, foram detectados em soros de doentes com ESG ambos os AGA, da classe IgA e IgG. Destes, os AGA da classe IgG parecem ser indicadores mais sensíveis mas menos específicos de ESG do que os da classe IgA. Por outro lado, os AGA da classe IgA são menos sensíveis, mas mais específicos de ESG.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O antígeno gliadina adere aos poços de uma placa de micropoços em polistireno seguida pelo bloqueio das zonas que não reagiram para reduzir a ligação não específica. Os controlos, os calibradores e o soro diluído do doente são deitados em poços separados, permitindo que todos os anticorpos anti-gliadina presentes possam ligar-se ao antígeno imobilizado. A amostra que não se ligou é eliminada por lavagem e em cada poço é deitado um conjugado de IgG ou IgA anti-humana marcado com enzima. Estes anticorpos conjugados com enzima ligam-se especificamente à imunoglobulina humana da classe apropriada. Depois de eliminar por lavagem todo o conjugado que não se ligou, deita-se nos poços um substrato enzimático específico (pNPP). Depois de interromper a reacção enzimática a intensidade da cor altera-se, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, e é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são apresentados em unidades ELISA por mililitro (UE/ml).

REAGENTES

Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congele.** Não utilize o reagente se não estiver límpido ou se apresentar precipitação. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20-25 °C) no momento da utilização. Quando é conservado entre 2 e 8 °C, o tempo de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade indicada no kit. Reconstitua o tempo de lavagem em 1 litro de água destilada ou desionizada. As tiras de micropoços revestidas só devem ser utilizadas uma vez.

Precauções

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente

PT

infecciosos. Respeite as normas laboratoriais em matéria de conservação, distribuição e eliminação desses materiais²¹. ATENÇÃO – a azida de sódio (NaN₃) pode reagir com a canalização de cobre ou chumbo para formar azidas metálicas muito explosivas. Na eliminação de líquidos, juntar quantidades abundantes de água para evitar a formação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director do laboratório ou o Centro Anti-Venenos.

Para assegurar a obtenção de resultados válidos devem ser rigorosamente respeitadas as instruções que acompanham este kit. Não troque os componentes do kit por componentes de origem diferente do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc.

Respeite as normas em vigor em matéria de processos laboratoriais para minimizar as possibilidades de contaminação microbiana ou química dos reagentes durante o seu manuseamento. Não use após a data de validade indicada no rótulo.

Materiais fornecidos

ELISA para IgA-AGA ImmuLisa™ **REF** 1117A

ELISA para IgG-AGA ImmuLisa™ **REF** 1117G

12 x 8	MICROPLATE AGA	Microplaca com micropoços individuais destacáveis revestidos com antígeno gliadina.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A AGA * †	Calibrador A pronto a usar (<i>tampa verde</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-gliadina.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B AGA * †	Calibrador B pronto a usar (<i>tampa violeta</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-gliadina.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C AGA * †	Calibrador C pronto a usar (<i>tampa azul</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-gliadina.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D AGA * †	Calibrador D pronto a usar (<i>tampa amarela</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-gliadina.
1 x 1.5 ml	CONTROL + AGA * †	Controlo positivo pronto a usar (<i>tampa vermelha</i>). Contém soro humano positivo para AGA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo pronto a usar (<i>tampa branca</i>). Contém soro humano.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS * †	Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz.
1 x 12 ml	STOP	Solução de paragem pronta a usar.
2 x	BUF WASH	Tampão de lavagem em pH . Reconstituir cada unidade em um litro.

* Contém < 0,1% NaN₃

PT


† **REF** 1117A contém calibradores IgA-AGA, controlos e conjugado de IgA


REF 1117G contém calibradores IgG-AGA, controlos e conjugado de IgG


Smbolos utilizados nos r tulos:

LOT Número de lote

REF Número de catálogo

 Prazo de validade

 Temperatura de armazenamento

 Ler as instruções de utilização

IVD Utilização em diagnóstico in vitro

 Fabricante

 Número de testes

Materiais necessários mas n o fornecidos

Pipetas para 5 a 1000 µl

- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- gua destilada ou desionizada
- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado para 600-650 nm.
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Temporizador
- Papel absorvente

Lavador automático de microplacas com capacidade de distribuição de 200 µl

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o desempenho do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras de 2 a 8 °C e por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

PROCEDIMENTO

Notas sobre o procedimento

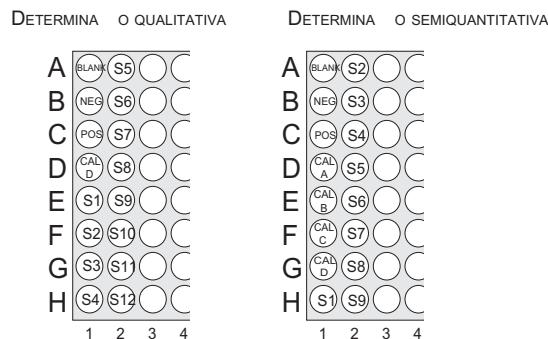
- Leia atentamente estas instruções antes de iniciar o teste.
- Deixe que todos os reagentes e amostras estabilizem à temperatura ambiente (20-26 °C) por 30 minutos. Guarde os produtos imediatamente no frigorífico depois do uso.
- Prepare todas as diluições das amostras do doente antes de iniciar o teste.
- **Guarde imediatamente as tiras n o usadas no pacote com dessecantes e feche bem para reduzir a exposi o a vapor de água.**
- Passo de lavagem: É imprescindível uma boa técnica. **Aconselha-se um lavador automático de microplacas.**

PT

- Use uma pipeta multicanal com capacidade de distribuição em 8 poços simultaneamente. Isso torna mais rápido o processo e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Os tempos são muito importantes. Os períodos de incubação iniciam-se após a distribuição dos reagentes.

Método de teste

1. **OS REAGENTES DEVEM ESTAR TODOS À TEMPERATURA AMBIENTE (20-26 °C) ANTES DE INICIAR O TESTE.**
2. Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nas microplacas. É uma boa prática de laboratório testar as amostras em duplicado.
3. **Determina o qualitativa:** use apenas o Calibrador D. **Determina o semiquantitativa:** use os Calibradores A - D, como ilustrado no exemplo abaixo.



4. Prepare uma diluição da amostra do doente a **1:51** misturando **10 µl** da amostra do doente com **0,5 ml** de Diluente de Soro.
5. Junte **100 µl** de Calibradores, Controlos Positivo e Negativo e amostra do doente diluída nos respectivos micropoços indicados na folha de protocolo
Nota: Inclua uma poço com **100 µl** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente. A absorvância deste poço não deve ser superior a 0,3.
6. Incube **30 minutos** (± 5 minutos) à temperatura ambiente numa superfície plana.
7. Passo de lavagem: Aspire muito bem o conteúdo de cada poço. Junte 200-300 µl do tampão de lavagem **reconstituído** a todos os poços e depois aspire. Repita esta sequência mais três vezes por um total de quatro lavagens. Vire a placa ao contrário e bata em material absorvente para eliminar todos os resíduos fluidos após a última lavagem. Não enxugue completamente os poços.
8. Junte 100 µl de Conjugado a cada poço.
9. Incube os poços por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
10. Passo de lavagem: Repita o passo 7.
11. Junte 100 µl de Substrato enzimático em cada poço.
12. Incube os poços por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
13. Junte 100 µl de Solução de Paragem em cada poço. Mantenha a mesma sequência e tempos da Solução de Paragem como efectuado para o Substrato Enzimático. Leia a absorvância (OD) de cada poço a 405 nm no prazo de uma hora da interrupção da reacção.
14. Leia a absorvância (OD) de cada poço a 405 nm usando um leitor de comprimento de onda simples ou duplo em relação ao branco de reagente definido em absorvância zero.

Controlo de qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o reagente nulo devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvância do branco de reagente deverá ser < 0,3. O Calibrador A deverá ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário o teste deverá ser repetido. O controlo negativo deve ser < 20 UE/ml. Se o teste for efectuado em duplicado, calcule a média das duas leituras para determinar as UE/ml. Quando se efectuam determinações qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à do controlo positivo. Para determinações semiquantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado no frasco.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras do doente podem ser determinadas em dois métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

----- X UE/ml de Calibrador D = UE/ml Amostra de Teste

Abs. do Calibrador D

2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Registe a absorvância dos Calibradores A a D em relação à respectiva concentração num papel milimétrico linear. Registe a concentração em UE/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e trace a curva de melhor ajuste. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva em relação ao correspondente valor de absorvância.

Calibrador

Os calibradores são incluídos para assegurar uma semiquantificação e devem ser usados em todos os testes. As amostras de doente que contêm níveis altos de anticorpos podem dar valores de absorvância superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semiquantitativos com precisão, essas amostras devem ser mais diluídas de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando são novamente testadas. Para a determinação de UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição. Veja as curvas padrão da amostra (Figura 1) no fim deste documento.

Interpretação

As seguintes informações servem apenas como guia na interpretação dos resultados de laboratório. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais.

AGA-IgG Valor		Interpretação
Criança	Adulto	
<28 EU/ml	<20 EU/ml	NEG (-)
>28 EU/ml	>20 EU/ml	POS (+)

AGA-IgA Valor		Interpretação
Criança	Adulto	
<23 EU/ml	<20 EU/ml	NEG (-)
>23 EU/ml	>20 EU/ml	POS (+)

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

O teste não deve ser efectuado em amostras muito hemolisadas, contaminadas com micróbios ou lipémicas. Este método só deve ser utilizado para testar amostras de soro humano. Os resultados obtidos servem apenas como auxílio do diagnóstico e não deverão ser interpretados já como um diagnóstico. Em doentes com DC deficiente em IgA, o IgA-AGA deve ser negativo.

PT

VALORES PREVISTOS

Os valores previstos numa população normal são negativos (< 20 UE/ml nos adultos e < 23-28 nas crianças). Todavia, foi determinado que alguns indivíduos assintomáticos, aparentemente saudáveis podem dar resultados positivos aos anticorpos IgA ou IgG anti-gliadina. **Ver a Figura 2.**

Estudos Clínicos

A sensibilidade e a especificidade dos testes AGA IgG e IgA foram determinadas testando doentes com DC activa (crianças = 38), doentes com DH (adultos = 10), doentes com problemas de tiróide (adultos = 200), doentes com *p nfigo* e *penfigóide* (adultos = 69), doentes com outras patologias gastrointestinais e 202 doadores de sangue normais (crianças = 113 e adultos = 89). Os resultados deste estudo encontram-se na Tabela 1 no fim deste documento.

Usando os kits de teste de anticorpos anti-gliadina IgG e IgA ImmuLisa™, observaram-se as seguintes incidências de AGA em indivíduos normais, em doentes com DC e noutros estados da doença. Os AGA da classe IgA são específicos para DC com uma sensibilidade de 90%. Por outro lado os AGA IgG são indicadores sensíveis a DC. Ver a Tabela 2.

O algoritmo na Tabela 3 serve como guia para a interpretação dos testes serológicos de DC.

Alguns investigadores seguiram o sistema da Figura 3 para estabelecer o diagnóstico de DC usando métodos serológicos.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Os resultados obtidos com o teste AGA IgG e IgA ImmuLisa™ foram comparados com o kit anticorpos anti-endomisial (EMA) ImmuGlo™ para o diagnóstico de DC. A comparação incluiu um total de 186 sujeitos. Foram incluídos neste estudo 34 doentes com uma dieta com glúten e 32 doentes com uma dieta sem glúten com um diagnóstico com biopsia confirmado de DC com o critério ESPGAN. **Os resultados encontram-se nas Tabelas 4 e 5 no fim deste documento.**

Precisão:

Foram testadas amostras com concentrações conhecidas de AGA em 10 repetições por um período de duas semanas. O coeficiente de variação intra e inter-testes (CV) encontra-se nas **Tabelas 6 e 7.**

Recuperação:

Amostras com concentrações de AGA conhecidas foram misturadas com diluições apropriadas de outra amostra positiva com quantidades conhecidas de AGA. Foram determinados os níveis de anticorpos anti-gliadina das amostras misturadas e dos valores obtidos foi calculada a percentagem de recuperação. Os resultados encontram-se nas **Tabela 8.**

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. 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.
3. Rautonen J, Rautonen N and Sauifahti E. Antibodies to gliadin in children with celiac disease. *Acta Paediatr Scand*; 1991, 80:1200-1205.
4. 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.
5. Lerner A, Kumar V, Iancu TC. Immunological diagnosis of childhood coeliac disease: comparison between anti-gliadin, anti-reticulin and anti-endomysial antibodies. *Clin Exp Immunol*; 1994, 95:78-82.
6. Patinen P, Björkstén F, Malmström M et al. Salivary and serum anti-gliadin antibodies in dermatitis herpetiformis. *Eur J Oral Sci*; 1995, 103.
7. 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.
8. Savilahti E, Perkkio M, Kalimo K, et al. IgA anti-gliadin antibodies: a marker of mucosal damage in childhood celiac disease. *Lancet* 1973; i:320-322.
9. Kumar V, Jain N, Lerner A, Beutner EH, Chorzelski TP, Lebenthal E. Comparative studies of different gliadin preparations in detecting anti-gliadin antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986; 5:730-734.
10. 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.
11. 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.
12. Mearin ML, Konincx CR, Biemond I, et al. Influence of genetic factors on the serum levels of anti-gliadin antibodies in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3:373-377.
13. Levenson SD, Austin RK, Dietler MD, et al. Specificity of anti-gliadin antibody in celiac disease. *Gastroenterology* 1985; 89:1-5.
14. Lerner A, Lebenthal E. The controversy of anti-gluten antibody (AGA) as a diagnostic tool in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 12:407-409.
15. Lebenthal E, Heitlinger LA. Gliadin antibodies in celiac disease. *J Pediatr* 1983; 102:711-712.
16. Kumar V, Lerner A, Jain N, Beutner EH. Are anti-gliadin antibodies specific for celiac disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3:815.
17. Tucker NT, Barghuthy FS, Prihoda TJ, Kumar V, Lerner A, Lebenthal E. Anti-gliadin antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay as a marker of childhood celiac disease. *J Pediatr* 1988; 113:286-289.
18. Unsworth DJ, Kieffer M, Holborow EJ, et al. IgA anti-gliadin antibodies in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1981; 46:286-293.
19. 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.
20. 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.
21. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health; 1993 (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
22. Unsworth DJ. Serological diagnosis of gluten sensitive enteropathy. *J Clin Pathol*, 1996, 49:704-711.

Figure 1. Standard Curve

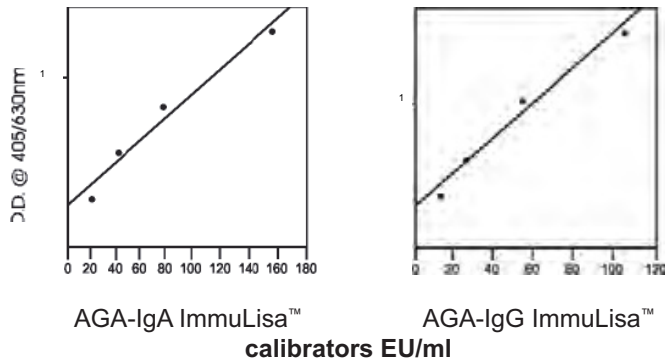
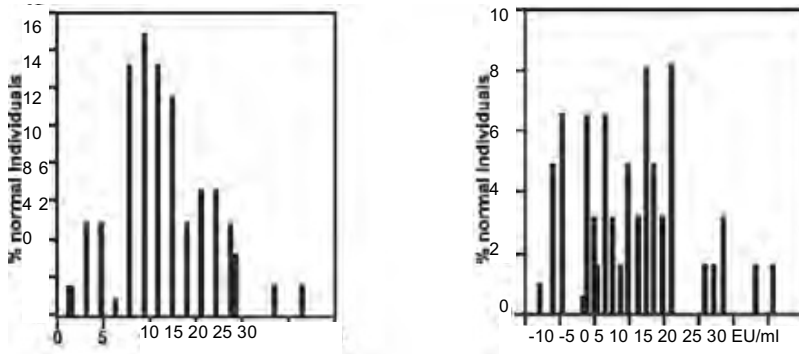


Figure 2. Incidence of Anti-Gliadin Antibodies



		Clinical Specificity	Clinical Sensitivity
Children	IgG-AGA	79%	94%
	IgA-AGA	97%	61%
Adults	IgG-AGA	88%	70%
	IgA-AGA	98%	60%

Adult patients with *gluten sensitive enteropathy* in our study were patients with *dermatitis hepetiformis*.

Table 2. Incidence of Anti-Gliadin Antibodies

Disease State		Antibody Specificity	
		IgG	IgA
Confirmed CD	On Gluten Diet	100%	90%
	On Gluten-Free Diet	0%	0%
Disease Controls		0%	0%
Normals		5%	0%

Table 3. CD Diagnosis Algorithm

EMA	ARA	AGA		anti-tTG	Interpretation
		IgG	IgA		
+	+	+	+	+	Positive
+	+	-	+	+	Positive
+	+	-	-	+	Positive
+	-	+	+	+	Positive
+	-	-	-	+	CD prob-ble
-	+	+	+	+	CD prob-ble
-	-	+	+	+	CD possible
-	-	+	-	-	CD unlikely
-	-	-	+	-	CD unlikely
-	-	-	-	-	Negative

Figure 3. Laboratory Testing Algorithm

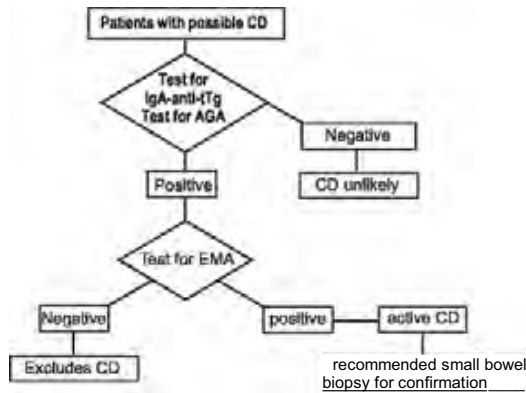


Table 4. Immco™ AGA-IgA vs. EMA

		Immco™ AGA-IgA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Immco™	POS (+)	58	21	79
EMA	NEG (-)	5	102	107
	TOT (=)	63	123	186

relative specificity: 86%
 relative sensitivity: 73%
 relative agreement: 95%

Table 5. Immco™ AGA-IgG vs. EMA

		Immco™ AGA-IgG			
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)	
Immco™	POS (+)	77	3	80	
EMA	NEG (-)	26	81	107	
		TOT (=)	103	84	187

relative specificity: 84%
 relative sensitivity: 96%
 relative agreement: 75%

Table 6. AGA-IgG Precision

Anti-AGA-IgG (EU/ml)	Intra-plate CV	Inter-plate CV
1. 68.4	11.9%	8.8%
2. 130.1	7.2%	12.0%

Table 7. AGA-IgA Precision

Anti-AGA-IgA (EU/ml)	Intra-plate CV	Inter-plate CV
1. 83.3	10.7%	12.0%
2. 197.4	4.5%	8.4%

Table 8. AGA-IgG Recovery

IgG	EU/ml added	EU/ml obtained	% Recovery
1.	88	90	102%
2.	79	81	103%
3.	73	76	104%



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@immco.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

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

www.emergogroup.com