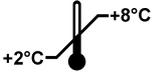


REF 41420 	ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA		
ISTRUZIONI PER L'USO		  100	

FINALITA' D'USO

Il test *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* è un test immunologico chemiluminescente (CLIA) per la determinazione quantitativa, con strumentazione dedicata *ZENIT RA Analyser*, degli anticorpi specifici di classe IgA diretti contro i peptidi deamidati della gliadina in campioni di siero o plasma umano (EDTA, Eparina).

Questo dosaggio viene impiegato come ausilio diagnostico nella valutazione dell'enteropatia da glutine (malattia celiaca) e della dermatite erpetica di Durhing.

ATTENZIONE: Qualunque decisione medica non può essere basata sul risultato di questo solo test, ma va fondata sulla valutazione dell'insieme di tutti i dati clinici e di laboratorio disponibili.

SIGNIFICATO CLINICO

La malattia celiaca (MC) o intolleranza alimentare al glutine è una malattia autoimmune, che si manifesta in soggetti geneticamente suscettibili, innescata da una dieta ricca in cereali, quali frumento, orzo e segale¹.

La predisposizione genetica è legata principalmente ad alcuni geni del sistema HLA, in particolare ai genotipi DQ2 e DQ8 che sono presenti nel 95-98 % dei soggetti celiaci, ma che si riscontrano con una percentuale tra il 20 ed il 30 % nella popolazione generale^{2,3}. La prevalenza della MC nella popolazione caucasica è di 1:100 circa, per cui un soggetto su 30 che porta gli alleli codificati dai geni HLA DQ2/DQ8 sviluppa la MC^{4,5}.

La gliadina è la porzione proteica del glutine in grado di innescare il processo autoimmune; il contatto tra i peptidi della gliadina e le cellule del sistema immunitario della sottomucosa intestinale può avvenire in seguito ad un'alterazione della permeabilità intestinale indotta dalla zonulina secreta dagli enterociti. La gliadina è un eccellente substrato per l'enzima transglutaminasi tissutale (t-TG); le azioni di deamidazione e transamidazione sui peptidi gliadinici da parte della t-TG modificano la carica complessiva della molecola permettendone il legame agli antigeni HLA DQ2-DQ8, espressi dalle cellule presentanti l'antigene, con la formazione di un complesso HLA DQ2-DQ8/ peptidi deamidati/t-TG. Tale complesso viene riconosciuto dai linfociti T CD4⁶ che innescano il processo immunologico con attivazione dei linfociti T effettori, produzione di citochine, proliferazione dei linfociti B e sintesi di anticorpi anti-t-T-G⁷ e anti-peptidi della gliadina^{8,9}. Il risultato è un processo infiammatorio con diversi quadri istologici che arrivano fino a lesioni (reversibili) della mucosa intestinale come l'atrofia villare.

I test sierologici assumono un ruolo cruciale nella diagnosi della MC e nel monitoraggio della compliance al trattamento caratterizzato da una dieta priva di glutine. Come indicato nelle linee guida internazionali il primo approccio alla diagnosi di MC è l'esecuzione di un test per la ricerca di autoanticorpi anti-t-TG di classe IgA in associazione al test per il dosaggio delle IgA totali; questa prassi è suggerita in quanto i soggetti con deficit assoluto di IgA ($IgA \leq 5 \text{ mg/dl}$)¹⁰ hanno un rischio relativo di sviluppare la MC 10 volte superiore alla popolazione normale¹¹.

L'elevata sensibilità e specificità degli autoanticorpi anti-trannglutaminasi IgA, rispettivamente del 96-98 % e del 93-95 %¹², associata alla oggettività e alla completa automazione del test fanno sì che la ricerca degli anti-t-TG IgA abbia sostituito nel corso di questi ultimi anni le altre indagini sierologiche per MC¹³. La ricerca degli anti-endomisio (EMA) IgA riveste comunque un ruolo di conferma importante in tutti i sieri anti-t-TG IgA positivi, proprio per l'elevatissima specificità (99-100 %) degli EMA anche se gli aspetti interpretativi di questo test rimangono rilevanti. Nei deficit selettivi di IgA è d'obbligo l'esecuzione degli anti-t-TG IgG in associazione agli anticorpi anti-peptidi deamidati della gliadina (a-DGP) IgG.

Recentemente è stato dimostrato che i soggetti celiaci sintetizzano anticorpi specifici diretti verso alcuni peptidi deamidati della gliadina. Gli anticorpi anti-DGP risultano molto specifici nella identificazione dei soggetti con intolleranza al glutine a differenza degli anticorpi anti-gliadina in toto, riscontrati in soggetti sani o con altre patologie del tratto enterico e perciò con ridotta specificità¹⁴.

Gli anticorpi anti-DGP di classe IgA presentano sensibilità del 86-95 % e specificità del 91-95 %, mentre quelli di classe IgG presentano sensibilità del 84-98 % e specificità del 95-98 %; queste prestazioni ne suggeriscono l'utilizzo nei soggetti pediatrici¹⁵ dove la sintesi di tali anticorpi sembra precedere quella degli anti-transglutaminasi IgA. Inoltre, l'utilizzo dei test per anticorpi anti-DGP, sia di classe IgA che IgG, è consigliato indipendentemente dall'età, in tutti i soggetti con sintomi suggestivi per MC nei quali gli autoanticorpi t-TG o EMA sono assenti o presentano bassi titoli¹⁶.

Nei pazienti celiaci in dieta priva di glutine si assiste ad un progressivo decremento degli anticorpi anti-t-TG ed anti-gliadina. La diminuzione del titolo degli anticorpi di classe IgG è più lenta rispetto a quella degli anticorpi di classe IgA.

PRINCIPIO DEL METODO

Il kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* per la determinazione quantitativa delle IgA specifiche anti-peptidi deamidati della gliadina utilizza un metodo immunologico indiretto a due step basato sul principio della chemiluminescenza.

L'antigene specifico è utilizzato per rivestire le particelle magnetiche (fase solida) ed un anticorpo anti-IgA umana è marcato con un derivato dell'estere di acridinio (coniugato).

Durante la prima incubazione gli anticorpi specifici presenti nel campione, nei calibratori o nei controlli si legano alla fase solida.

Durante la seconda incubazione il coniugato reagisce con gli anticorpi anti-Gliadina IgA sequestrati dalla fase solida.

Dopo ciascuna incubazione il materiale non legato alla fase solida è rimosso mediante aspirazione e susseguente lavaggio.

La quantità di coniugato marcato rimasto legato alla fase solida viene valutata mediante attivazione della reazione di chemiluminescenza e misura del segnale luminoso. Il segnale generato, espresso in unità relative di luce (RLU, Relative Light Unit), è indicativo della concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel campione, nei calibratori e nei controlli.

AUTOMAZIONE

Lo strumento *ZENIT RA Analyser* esegue in automatico tutte le operazioni previste dal protocollo di dosaggio: aggiunta nel contenitore di reazione dei campioni, calibratori, controlli, particelle magnetiche, coniugato e soluzioni di attivazione della chemiluminescenza; separazione magnetica e lavaggio delle particelle; misura della luce emessa.

Il sistema calcola i risultati del dosaggio per i campioni ed i controlli mediante curva di calibrazione memorizzata e stampa un rapporto che include tutte le informazioni relative al dosaggio ed al paziente.

MATERIALI E REAGENTI

Materiali e reagenti forniti

REAG	1	MP	2.5 mL
------	---	----	--------

Particelle magnetiche rivestite con antigene Gliadina (peptici deamidati specifici) in Tampone Fosfato contenente proteine stabilizzanti, tensioattivo, Pro-Clin 300 e sodio azide (< 0.1 %) come conservanti.

REAG	2	CONJ	25 mL
------	---	------	-------

Anticorpo policlonale di capra anti-IgA umane marcato con un derivato dell'estere di acridinio (coniugato), in Tampone Fosfato contenente proteine stabilizzanti e sodio azide (< 0.1 %) come conservante.

REAG	3	DIL	25 mL
------	---	-----	-------

Soluzione Diluente Campioni: Tampone Fosfato contenente sieralbumina bovina, un tensioattivo, un colorante blu inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ come conservanti.

REAG	4	CAL A	1.6 mL
------	---	-------	--------

Siero umano con bassa concentrazione di anticorpi anti-Gliadina IgA in Tampone Fosfato contenente sieralbumina bovina, un tensioattivo, un colorante blu inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ come conservanti.

REAG	5	CAL B	1.6 mL
------	---	-------	--------

Siero umano con elevata concentrazione di anticorpi anti-Gliadina IgA in Tampone Fosfato contenente sieroalbumina bovina, un tensioattivo, un colorante blu inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ come conservanti.

Tutti i reagenti sono pronti per l'uso.

I reagenti 1, 2 e 3 sono assemblati in un unico insieme che costituisce la cartuccia reagenti.

Le concentrazioni dei Calibratori sono espresse in UA/mL (Unità Arbitrarie) e tarate contro uno standard di riferimento interno. I valori delle concentrazioni, specifici per lotto di prodotto, sono registrati nel DATA DISK inserito nel kit.

DATA DISK

Mini-DVD contenente le informazioni riguardanti tutti i prodotti della Linea ZENIT RA (Reagenti, Calibratori, Sieri di controllo, Reagenti ausiliari) aggiornati all'ultimo lotto produttivo con l'esclusione dei prodotti scaduti alla data di compilazione del nuovo DATA DISK.

E' sufficiente conservare il DATA DISK con il numero di lotto più elevato per mantenere aggiornate le informazioni richieste per il corretto funzionamento del sistema.

Materiali e reagenti richiesti ma non forniti nel kit

- ZENIT RA Analyzer Cod. No. 41400
- ZENIT RA Cuvette Cube Cod. No. 41402
Confezione da 960 cuvette.
- ZENIT RA System Liquid Cod. No. 41409
1 bottiglia da 0.5 litri di soluzione 10x.
- ZENIT RA Wash Solution Cod. No. 41407
1 bottiglia da 0.5 litri di soluzione 20x.
- ZENIT RA Trigger Set Cod. No. 41403
1 flacone da 250 mL di Trigger A (soluzione di preattivazione)
1 flacone da 250 mL di Trigger B (soluzione di attivazione)
- ZENIT RA D-SORB Solution Cod. No. 41436
Confezione da 2 bottiglie da 1 litro di soluzione pronta per l'uso.
- ZENIT RA Cartridge Checking System Cod. No. 41401

- ZENIT RA Top Cap Set Cod. No. 41566
300 tappi superiori per la chiusura dei contenitori dei calibratori dopo il primo utilizzo.

Altri Reagenti Raccomandati

- ZENIT RA CELIAC CONTROL SET Cod. No. 41452
3 fiale da 1.5 mL di siero umano negativo e 3 fiale da 1.5 mL di siero umano positivo per anticorpi anti-Gliadina.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti forniti nel kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* sono solo per uso diagnostico in vitro e non per uso in vivo in uomini o animali.

Questo prodotto deve essere utilizzato in stretta osservanza alle istruzioni riportate nel presente documento da utilizzatori professionali.

Menarini non può essere ritenuta responsabile di perdite o danni generati da un uso non conforme alle istruzioni fornite.

Precauzioni di sicurezza

Questo prodotto contiene materiale di origine animale e pertanto deve essere manipolato come se contenesse agenti infettanti.

Questo prodotto contiene componenti di origine umana. Tutte le unità di siero o plasma utilizzate per la fabbricazione dei reagenti di questo kit sono state analizzate con metodi FDA approvati e trovate non reattive per la presenza di HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 ed anti-HIV2.

Tuttavia, poiché nessun metodo di analisi è in grado di garantire l'assenza di agenti patogeni, tutto il materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto e manipolato come tale.

In caso di imballaggio danneggiato con fuoriuscita dei reagenti provvedere alla decontaminazione dell'area interessata con una soluzione diluita di Ipoclorito di Sodio dopo essersi protetti con idonei dispositivi di protezione individuale (camice, guanti, occhiali).

Provvedere allo smaltimento del materiale utilizzato per la pulizia e dei rifiuti di imballaggio coinvolti nella fuoriuscita, in base alle norme nazionali per lo smaltimento dei rifiuti potenzialmente infetti.

Alcuni reagenti contengono sodio azide come conservante. Poiché la sodio azide può reagire con piombo, rame e ottone piombato formando azidi esplosive nelle tubature, si raccomanda di non eliminare reagenti o rifiuti negli scarichi ma di seguire le norme nazionali in materia di smaltimento rifiuti potenzialmente pericolosi.

Precauzioni operative

Per ottenere risultati affidabili è necessario attenersi strettamente alle presenti Istruzioni per l'uso e seguire scrupolosamente quanto indicato nel manuale operativo dello strumento.

I reagenti forniti nel kit devono essere utilizzati esclusivamente con il sistema *ZENIT RA Analyzer*.

I componenti della cartuccia reagenti non possono essere rimossi dalla cartuccia e riassemblati.

Non usare il kit oltre la data di scadenza.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti forniti nel kit sono tutti pronti per l'uso.

CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

Conservare i reagenti forniti nel kit a 2-8 °C in posizione verticale ed al buio.

In queste condizioni la cartuccia reagenti ed i calibratori non aperti sono stabili sino alla data di scadenza.

La cartuccia reagenti dopo apertura può essere utilizzata per 60 giorni se conservata in frigorifero a 2-8 °C oppure a bordo macchina.

I calibratori dopo apertura possono essere utilizzati per 60 giorni se conservati in frigorifero a 2-8 °C e se la permanenza a bordo non supera le 6 ore per seduta.

Non congelare i reagenti ed i calibratori.

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere eseguito su campioni umani di siero e plasma (EDTA - Eparina).

Si sconsiglia l'uso di campioni lipemici, emolizzati e torbidi.

Se il dosaggio viene eseguito dopo più di 8 ore dal prelievo, separare il siero dal coagulo o il plasma dai globuli rossi, trasferendoli dalle provette primarie di separazione con gel in provette secondarie senza additivi.

Prima di essere analizzati i campioni possono essere conservati in frigorifero a 2-8 °C per 7 giorni al massimo.

Se il dosaggio viene eseguito dopo più di 7 giorni, conservare i campioni congelati (< - 20 °C).

Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.

PROCEDIMENTO OPERATIVO

Per ottenere prestazioni analitiche affidabili attenersi scrupolosamente alle istruzioni riportate nel manuale operativo dello strumento.

Caricamento dei reagenti

Tutti i reagenti forniti nel kit sono pronti per l'uso.

Prima di inserire la cartuccia reagenti nel sistema, il contenitore delle particelle magnetiche deve essere agitato per rotazione orizzontalmente in modo da favorire la risospensione delle particelle. Eseguire l'operazione evitando la formazione di schiuma.

Posizionare la cartuccia reagenti nell'area reagenti dello strumento utilizzando l'apposita guida e lasciare in agitazione per almeno 30 minuti prima dell'uso.

Il posizionamento della cartuccia reagenti determina contemporaneamente la lettura del codice a barre identificativo. In caso di danneggiamento dell'etichetta della cartuccia o in caso di mancata lettura, i dati identificativi della cartuccia reagenti possono essere inseriti manualmente.

Lo strumento mantiene automaticamente in agitazione continua le particelle magnetiche.

Se la cartuccia reagenti viene rimossa dallo strumento, conservarla verticalmente al buio a 2-8 °C.

Caricamento dei calibratori e dei controlli

I calibratori ed i controlli ZENIT RA sono pronti per l'uso. Lasciare i calibratori ed i controlli a temperatura ambiente per 10 minuti ed agitare delicatamente il contenuto, manualmente o mediante vortex, evitando la formazione di schiuma. Non capovolgere il contenitore e non togliere il tappo perforatore di chiusura (tappo giallo per i calibratori e tappi verdi o blu per i controlli).

Nel caso i calibratori o i controlli fossero utilizzati per la prima volta, premere il tappo perforatore verso il basso sino a completarne la sua corsa. Con questa operazione la membrana che sigilla il contenitore verrà perforata rendendo possibile il prelievo del liquido contenuto. L'avvenuto abbassamento del tappo perforatore è segnalato dalla contemporanea copertura della fascia di colore rosso presente nel lato superiore dell'etichetta (Fig. 1 – Contenitore sigillato e Contenitore perforato).

Nel caso i calibratori o i controlli fossero già stati utilizzati, il contenitore sarà provvisto del tappo superiore (tappo bianco) e la fascia rossa dell'etichetta sarà coperta.

Sullo strumento devono essere caricati esclusivamente i contenitori senza tappo superiore (tappo bianco) e con la fascia rossa dell'etichetta coperta (Fig. 1 – Contenitore perforato).

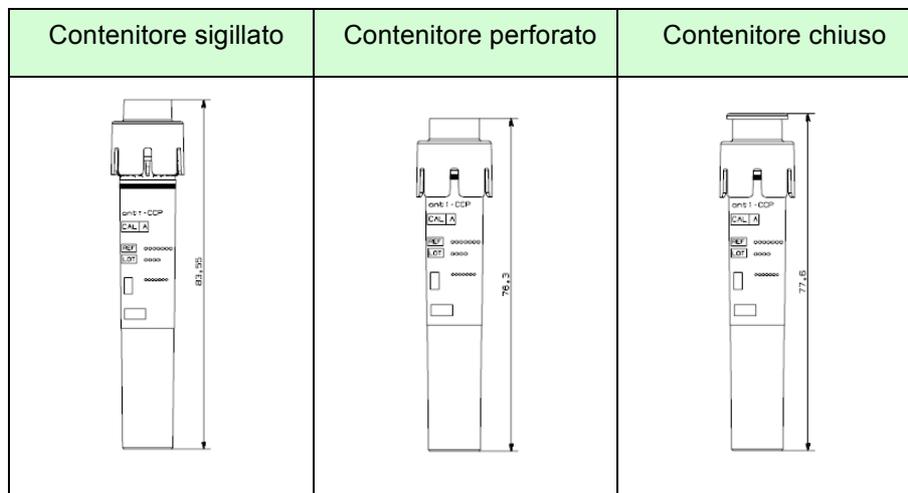
Inserire nello strumento i calibratori o i controlli nell'area campioni dopo lettura del bar code. I dati del bar code possono essere inseriti anche manualmente in caso di danneggiamento dell'etichetta o in caso di mancata lettura.

I valori della concentrazione degli anticorpi IgA anti-Gliadina presente nei calibratori o nei controlli sono registrati nel DATA DISK ed automaticamente trasferiti nell'analizzatore. In caso di mancato trasferimento dei dati è possibile il loro inserimento manuale.

Al termine della seduta i contenitori dei calibratori e dei controlli devono essere chiusi con gli appositi tappi superiori (tappi bianchi) e trasferiti a 2-8 °C sino al loro successivo impiego (Fig. 1 – Contenitore chiuso).

I calibratori possono essere utilizzati per un massimo di quattro volte.

Figura 1: Layout contenitore



Caricamento dei campioni

Identificare i campioni utilizzando il lettore di bar code ed inserirli nello strumento, nell'apposito contenitore. In caso di mancanza del bar code sul campione o in caso di mancata lettura, i dati identificativi del campione possono essere inseriti manualmente.

Selezionare per ogni campione i parametri richiesti.

Calibrazione

Lo strumento *ZENIT RA Analyzer* utilizza una curva di calibrazione memorizzata (master curve), generata dal produttore per ogni lotto di cartuccia reagenti.

I parametri delle "master curve", unitamente ai valori delle concentrazioni dei calibratori, sono memorizzati nel DATA DISK e trasferiti nel database dello strumento.

I calibratori A e B sono utilizzati per ricalibrare la "master curve" in funzione sia dello strumento utilizzato che dei reagenti a bordo.

Per eseguire la ricalibrazione analizzare in triplicato i due calibratori A e B ed in singolo i controlli. I valori di concentrazione ottenuti con i controlli permettono di validare la nuova calibrazione.

Una volta che la ricalibrazione della "master curve" sia stata accettata e memorizzata, tutti i campioni successivi possono essere analizzati senza ulteriore calibrazione, tranne nei seguenti casi:

- quando è caricata a bordo dello strumento una cartuccia reagenti con un nuovo lotto;
- quando i valori dei controlli non rientrano nell'intervallo di accettabilità;
- quando è eseguita la procedura di manutenzione dello strumento;
- quando è scaduta la validità della "master curve" ricalibrata.

La validità della "master curve" ricalibrata per il kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* è di 15 giorni.

La gestione della ricalibrazione è attuata in automatico dallo strumento.

Dosaggio

Premere il tasto di avvio.

1. Il sistema aspira 100 µL di Diluente Campioni, 20 µL di Particelle Magnetiche, 100 µL di Diluente Campioni e 6 µL di campione o controllo (per i calibratori il siero positivo è fornito prediluito con il Diluente Campioni ed il volume prelevato è di 106 µL). Le soluzioni e la sospensione aspirate sono dispensate nella cuvetta di reazione.
2. La cuvetta di reazione è incubata nel rotore a 37 °C per 10 minuti.
3. Dopo questa fase di incubazione, le particelle magnetiche sono separate e lavate.
4. Nella cuvetta vengono dispensati 200 µL di coniugato.
5. La cuvetta di reazione è incubata nel rotore a 37 °C per 10 minuti.
6. Dopo questa ultima fase di incubazione, le particelle magnetiche sono separate e lavate e la cuvetta viene trasferita nella camera di lettura.
7. La quantità di coniugato legato alla fase solida, espressa in RLU, è direttamente proporzionale alla concentrazione di IgA anti-Gliadina presente nel campione.
8. Le risposte ottenute sono interpolate sulla curva di taratura e trasformate in concentrazioni.

Campioni con valori di concentrazione più elevati del limite superiore dell'intervallo di misurabilità possono essere diluiti e ritestati. Il nuovo valore ottenuto viene moltiplicato, per ottenere il risultato finale, per il fattore di diluizione utilizzato.

CONTROLLO QUALITA'

Per assicurare la validità del dosaggio, sieri di controllo a differenti livelli di concentrazione (almeno un siero negativo ed un siero positivo) devono essere misurati ogni giorno in cui si esegue il dosaggio.

Se il proprio laboratorio richiede, per la verifica dei risultati del dosaggio, un uso più frequente o un numero più elevato di controlli, seguire le procedure del controllo qualità ivi stabilite.

Se vengono utilizzati i sieri di controllo ZENIT RA, i valori medi attesi ed i limiti di accettabilità sono quelli riportati nel DATA DISK presente anche nella confezione dei controlli.

Qualora venissero utilizzati sieri di controllo diversi, è necessario, prima del loro impiego, definire i valori attesi con reagenti e sistema ZENIT RA.

Qualora il valore dei controlli non rientri nel range di accettabilità specificato, i relativi risultati del dosaggio non sono validi ed i rispettivi campioni devono essere rianalizzati.

In questo caso è necessario eseguire prima della ripetizione del dosaggio una procedura di ricalibrazione.

CALCOLO ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolo dei risultati

La concentrazione degli anticorpi IgA anti-Gliadina presente nei campioni in esame è calcolata automaticamente dal sistema. I valori possono essere visualizzati mediante lettura sul video o attraverso stampa.

Le concentrazioni sono espresse in UA/mL.

Il calcolo della concentrazione di analita nel campione avviene attraverso lettura della risposta ottenuta per ogni campione su una curva di calibrazione elaborata mediante un sistema di "fitting" logistico a quattro parametri (4PL, Y ponderato), corretta periodicamente in funzione delle risposte ottenute nel dosaggio dei calibratori.

Per informazioni dettagliate su come il sistema calcola i risultati, consultare il manuale operativo del sistema.

Interpretazione dei risultati

Il range di misurabilità del dosaggio *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* è: 0.0 – 200 UA/mL.

I valori inferiori a 0.0 UA/mL sono valori estrapolati e possono essere riportati come "uguali a 0.0 UA/mL".

I valori superiori a 200 UA/mL possono essere riportati come "superiori a 200 UA/mL", o ritestati dopo opportuna diluizione.

I risultati dei campioni possono essere interpretati nel seguente modo:

(UA/mL)	Interpretazione
< 10	Il campione è da considerare Negativo per la presenza di IgA anti-Gliadina
≥ 10	Il campione è da considerare Positivo per la presenza di IgA anti-Gliadina

I valori sopra riportati sono da considerare solo valori suggeriti. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri intervalli di riferimento.

LIMITI DEL DOSAGGIO

Per scopi diagnostici, i risultati ottenuti con il kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* ed il sistema *ZENIT RA Analyzer* devono essere utilizzati unitamente agli altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.

La contaminazione batterica dei campioni e l'inattivazione al calore possono influenzare il risultato del dosaggio.

Gli anticorpi eterofili presenti nei campioni di siero umano possono reagire con i reagenti a base di immunoglobuline, causando interferenze nei dosaggi immunologici in vitro. Questi campioni possono dar luogo a valori anomali se analizzati con il kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA*.

VALORI ATTESI

Sono stati analizzati i campioni di 100 donatori selezionati casualmente per verificare la presenza di anticorpi IgA anti-Gliadina.

Di questi campioni 1 è risultato positivo e 99 negativi, con un valore medio di 1.3 UA/mL ed una deviazione standard di 1.11 UA/mL.

Con i risultati ottenuti è stato calcolato il "Limit of Blank" (LoB = il più alto valore che possiamo attenderci in una serie di campioni che non contengono l'analita). Il "Limit of Blank", determinato come 95° percentile della popolazione negativa, è risultato pari a 3.2 UA/mL con il Lotto di reagenti n. 2.

SENSIBILITA' E SPECIFICITA' CLINICA

Un totale di 62 campioni celiaci alla prima diagnosi, confermati da esame istologico, e 90 campioni non celiaci (60 donatori e 30 pazienti affetti da patologie infiammatorie e funzionali dell'intestino) sono stati testati con il kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA*. Tutti i campioni presentavano una concentrazione di IgA totali, determinata con metodo immunonefelometrico, compresa nel range di normalità.

Nella popolazione presumibilmente negativa (non celiaci) studiata 5 campioni, appartenenti al gruppo con patologie intestinali, sono risultati positivi e 85 campioni sono risultati negativi:

- **Specificità diagnostica: 94.4 %**

Nella popolazione presumibilmente positiva (celiaci) studiata 14 campioni sono risultati negativi e 48 campioni sono risultati positivi:

- **Sensibilità diagnostica: 77.4 %**

In base ai risultati della specificità e della sensibilità diagnostica, l'**accordo diagnostico è del 87.5 %**.

PRESTAZIONI

Avvertenza: i dati presentati non rappresentano le specifiche di funzionamento del kit, ma costituiscono evidenza sperimentale di come il kit funzioni entro tali specifiche nel modo previsto dal produttore.

Precisione e Riproducibilità

La precisione e riproducibilità del kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* sono state valutate impiegando un protocollo basato sulle linee guida del documento EP5-A2 del Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

La **precisione** è stata calcolata analizzando i risultati di 20 replicati di cinque sieri (uno negativo e quattro positivi con diverse concentrazioni di anti-Gliadina IgA) eseguiti con due diversi lotti di reagenti nella stessa seduta sperimentale.

La concentrazione del siero anti-Gliadina IgA negativo (N4) è risultata compresa nell'intervallo da 1.6 a 3.0 UA/mL e da 0.9 a 2.8 UA/mL rispettivamente con il Lotto di reagenti n. 1 e n. 2.

In Tabella si riportano i risultati ottenuti con i 4 sieri positivi.

Campione	Reagenti Lot. no.	Concentrazione media (UA/mL)	SD	CV %
P1	1	17.7	0.80	4.5
	2	18.1	0.65	3.6
P2	1	28.1	0.72	2.6
	2	29.1	0.82	2.8
P3	1	49.9	2.01	4.0
	2	56.5	1.49	2.6
P4	1	111.6	6.36	5.7
	2	110.6	2.51	2.3

La **riproducibilità** è stata calcolata analizzando i risultati della determinazione di quattro sieri (uno negativo e quattro positivi con diverse concentrazioni di anti-Gliadina IgA) eseguita in singolo con due diversi lotti di reagenti, in 15 sedute diverse.

La concentrazione del siero anti-Gliadina IgA negativo (N4) è risultata compresa nell'intervallo da 1.8 a 4.4 UA/mL e da 0.7 a 2.5 UA/mL rispettivamente con il Lotto di reagenti n. 1 e n. 2.

In Tabella si riportano i risultati ottenuti con i 3 sieri positivi.

Campione	Reagenti Lot. no.	Concentrazione media (UA/mL)	SD	CV %
P1	1	17.1	1.06	6.2
	2	17.4	0.41	2.4
P2	1	27.3	1.38	5.1
	2	27.8	0.99	3.6
P3	1	47.4	2.77	5.8
	2	52.3	1.50	2.9

Linearità delle Diluizioni

La linearità delle diluizioni del kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* è stata valutata impiegando un protocollo basato sulle linee guida del documento EP6-A del Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

Sono state dosate diluizioni scalari di 3 sieri a concentrazione elevata di IgA anti-Gliadina, eseguite con il Diluente Campioni.

I risultati di questo studio sono riassunti nella seguente tabella.

Campione	Fattore di diluizione	Concentrazione misurata (UA/mL)	Concentrazione attesa (UA/mL)	Recovery %
1	1	146.2	-	(100)
	2	80.7	73.1	110.4
	4	43.2	36.6	118.0
	8	21.4	18.3	116.9
	16	10.9	9.1	119.8
2	1	156.5	-	(100)
	2	86.1	78.3	110.0
	4	41.5	39.1	106.1
	8	20.8	19.6	106.1
	16	9.7	9.8	99.0
3	1	173.5	-	(100)
	2	92.8	86.8	106.9
	4	46.7	43.4	107.6
	8	21.6	21.7	99.5
	16	9.7	10.8	89.8

In ogni caso si rende necessario sottolineare che non tutti i sieri, quando misurati a diluizioni diverse, possono fornire risultati lineari all'interno dell'intervallo di misurabilità essendo il risultato dipendente non solo dalla concentrazione ma anche dall'affinità degli anticorpi presenti nel campione.

Sensibilità Analitica

La sensibilità analitica del kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA*, espressa come **limite di rilevazione** (*Limit of Detection – LoD*: ossia la più piccola quantità di analita che il metodo è in grado di misurare) è stata valutata utilizzando un protocollo basato sulle linee guida del documento EP17-A del Clinical and Laboratory Standards (CLSI) e la formula per il calcolo $LoD = LoB + C_{\beta} SD_s$ (dove LoB rappresenta il valore del "Limit of Blank", SD_s la deviazione standard stimata della distribuzione del campione a bassa concentrazione e C_{β} è derivato dal 95 ° percentile della distribuzione standard gaussiana).

Sono stati utilizzati 4 campioni a bassa concentrazione di analita, determinati in singolo con due differenti Lotti di reagenti in 15 esperimenti diversi.

Il Limite di rilevazione del kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* è risultato pari a 5.2 UA/mL.

I valori del limite di rilevazione, unitamente a considerazioni di carattere clinico ed ai risultati di comparazione con metodi di riferimento hanno contribuito alla definizione del valore cut-off.

Specificità Analitica: Interferenze

Uno studio basato sulle linee guida del documento EP7-A2 del CLSI ha dimostrato che le prestazioni del dosaggio non sono influenzate dalla presenza nel campione delle sostanze potenzialmente interferenti elencate nella seguente tabella, sino alla concentrazione sperimentata.

Sostanze Potenzialmente Interferenti	Massima concentrazione sperimentata
Bilirubina libera	20 mg/dL
Bilirubina coniugata	28 mg/dL
Emoglobina	1000 mg/dL
Acidi grassi	3000 mg/dL

L'uso di campioni lipemici, emolizzati o torbidi viene comunque sconsigliato.

Effetto saturazione ad alte dosi

Alcuni metodi immunologici impiegati per la determinazione di campioni contenenti l'analita a concentrazioni estremamente elevate possono fornire livelli apparenti di analita sottostimati (Effetto hook).

Il metodo utilizzato nel kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA*, essendo un metodo a due incubazioni, non risente di tale effetto.

Un campione con concentrazione estremamente elevata (al di sopra dell'intervallo di misura) di IgA anti-Gliadina ha confermato l'assenza di effetto "hook" sino alla concentrazione di 5.500 UA/mL.

Sensibilità e Specificità Relative

La presenza di anticorpi anti-Gliadina IgA è stata determinata utilizzando il kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* ed un metodo di dosaggio ELISA disponibile in commercio in 136 campioni.

I campioni analizzati appartenevano a pazienti celiaci prima diagnosi, pazienti celiaci in dieta, pazienti celiaci e non celiaci con deficit di IgA e pazienti normali.

5 campioni hanno dato luogo a risultati discordanti tra il dosaggio ZENIT RA ed il dosaggio disponibile in commercio.

La **concordanza relativa** è risultata pertanto essere pari al 96.3 % (131/136).

La **sensibilità relativa** è risultata pari al 92.9 % (26/28).

La **specificità relativa** è risultata pari al 97.2 % (105/108).

BIBLIOGRAFIA

1. Stern M, Cicilitira P, van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Mendez E, et al. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J Gastroenterology Hepatol* 2001; 13:741-7.
2. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993; 105:910-22.

3. Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M, Louka AS, Clot F, Percopo S, et al. HLA-DQ relative risk for celiac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigens* 2004; 63: 562-7.
4. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994; 342:200-3.
5. Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, et al. Prevalence of coeliac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 2003; 348: 2517-24.
6. Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Jung G, Fleckenstein B, Sollid LM. Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. *J Immunol* 2005; 175: 254-61.
7. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3: 797-801.
8. Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, Garcilazo S, Waggenger M. Celiac disease: antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clin Chem* 2001; 47: 2023-8.
9. Schwertz E, Kahlenberg F, Sack U, Ritcher T, Stern M, Conrad K, et al. Serological assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. *Clin Chem* 2004; 50: 2370-5.
10. Latiff AH, Kerr MA. The clinical significance of immunoglobulin A deficiency. *Ann Clin Biochem* 2007; 44:131-9.
11. Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR, and the Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and " Club del Tenue " working groups on celiac disease. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease : an Italian multicentre study. *Gut* 1998; 42: 362-5.
12. Roston A, Dubè C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C, et al. The diagnostic accuracy of serological test for celiac disease : a systematic review. *Gastroenterology* 2005; 128:S38-46.
13. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Caradonna M, Cerni L, Villalta D, et al. The role of anti-tissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of celiac disease : a French-Italian multicentre study. *J Clin Pathol* 2003; 56:389-93.
14. Berger R, Schimdt G. Evaluation of six anti-gliadin antibody assays. *J Immunol Methods* 1996; 191:77-86.
15. Basso D, Guariso G, Fogar P, Meneghel A, Zambon CF, Navaglia F, et al. Antibodies against syntetic deamidated gliadin peptides for celiac disease diagnosis and follow up in children. *Clin Chem* 2009; 55: 150-7
16. Tonutti E, Visentini D, Picierno A, Bizzarro N, Villalta D, Bozzoli R, et al. Diagnostic efficacy of the ELISA tests for the detection of deamidated anti gliadin antibodies in the diagnosis and monitoring of celiac disease. *J Clin Lab Anal.* 2009; 23(3): 172-4.



TECHNOGENETICS S.r.l.
Viale Casiraghi 471
20099 – Sesto San Giovanni (MI) - Italia

Distribuito da

A. Menarini Diagnostics Srl
Via Lungo l'Enza, 7 - 50012 Bagno a Ripoli - Firenze
Tel. +39 055 56 80 422 - Fax +39 055 56 80 905
www.menariniagnostics.it