

QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile

708940

Per uso diagnostico *In Vitro*

Complessità CLIA: elevata

Finalità d'uso

QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile è un saggio di immunofluorescenza per la determinazione semi-quantitativa degli autoanticorpi anticorpi IgA anti-transglutaminasi tissutale umana (h-tTG) e anti-peptidi di gliadina deamidati (DGP) e il rilevamento di una quantità insufficiente di IgA nel siero umano. La presenza di questi anticorpi unitamente ad altri risultati clinici e di laboratorio costituisce un ausilio nella diagnosi della malattia celiaca, un'enteropatia sensibile al glutine. La quantità insufficiente di IgA indica che non esistono IgA sufficienti per consentire il rilevamento delle IgA anti-h-tTG o anti-DGP.

Riassunto e Spiegazione del test

La malattia celiaca è una patologia cronica i cui tratti principali includono infiammazione e caratteristico „appiattimento“ della mucosa intestinale con conseguente sindrome da malassorbimento nota come enteropatia sensibile al glutine. L'eziologia esatta della malattia resta sconosciuta ma la gliadina, la frazione solubile in alcol del glutine di grano, costituisce chiaramente l'agente tossico.^{1,2}

In origine, per diagnosticare la malattia celiaca venivano utilizzate una serie di biopsie intestinali. Più recentemente, per lo screening dei pazienti con enteropatia sensibile al glutine e per il monitoraggio del rispetto delle prescrizioni alimentari è stato suggerito un test sierologico volto a rilevare la presenza di anticorpi anti-gliadina, anti-endomisiali e anti-tTG.³⁻⁵ La European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition ha raccomandato l'uso di marcatori anticorpali come gli anticorpi anti-gliadina e anti-endomisiali per ridurre il numero di biopsie intestinali necessarie per formulare una diagnosi.⁵

L'antigene endomisiale è stato identificato quale enzima legante la proteina tTG.⁶ Procedure ELISA specifiche che includono la tTG come antigene offrono un'alternativa affidabile e oggettiva ai tradizionali test basati sulle metodiche a immunofluorescenza che utilizzando sezioni sottili di esofago di primati come substrato.⁶⁻⁸ L'antigene h-tTG è stato prodotto mediante tecnologia ricombinante e può presentare determinati vantaggi rispetto all'antigene estratto dal fegato di cavia.^{7,8}

Studi recenti hanno dimostrato che gli anticorpi reattivi alla gliadina di pazienti celiaci si legano a un numero molto limitato di epitopi specifici sulla molecola di gliadina.⁹⁻¹¹ Questi stessi studi rivelano inoltre che la deamidazione selettiva della gliadina da parte dell'enzima celiaco associato, la transglutaminasi tissutale, implica un legame rafforzato da parte degli anticorpi antigliadina. I test in cui vengono utilizzati peptidi deamidati presentano un'accuratezza diagnostica superiore per la celiachia rispetto ai test antigliadina e persino anti-tTG standard.^{12,13} Inoltre, questi anticorpi sono interessanti per seguire l'andamento dell'attività patologica nel tempo e per monitorare il rispetto della dieta priva di glutine.¹³

Una proporzione significativa di pazienti affetti da celiachia presenta deficit di IgA.¹⁴⁻¹⁷ Pertanto, una strategia di screening ragionevole per le popolazioni a rischio include test per gli anticorpi IgA anti-DGP e anti-h-tTG nonché test volti a rilevare un deficit di IgA selettivo.

La dermatite herpetiforme (DH) è una malattia della pelle che, come la celiachia, è causata dall'ingestione di glutine di grano. La maggior parte dei pazienti con DH presenta atrofia dei villi del digiuno identica a quella riscontrata nella celiachia e una dieta rigida priva di glutine determina un miglioramento delle lesioni sia intestinali sia cutanee.^{1,2,18} Gli attuali metodi sierologici come i test endomisiali sulla gliadina nativa e sulla transglutaminasi tissutale evidenziano prestazioni deludenti quando usati per la DH, con sensibilità che variano dal 60 al 75%¹⁸ rispetto alle sensibilità pari al 95% e superiori riferite per la celiachia.³⁻⁸

Il QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile è un test di screening per gli anticorpi rilevati nei soggetti con celiachia e per il disturbo sensibile al glutine correlato, rappresentato dalla dermatite herpetiforme. Esso consente il rilevamento simultaneo degli anticorpi anti-IgA a un peptide di gliadina sintetico deamidato e alla tTG umana ricombinante e allo stesso tempo rileva un deficit di IgA.

Principio della Metodica

L'h-tTG ricombinante e il DGP sintetico si legano entrambi a diverse microsfere colorate fluorescenti. Due microsfere rivestite con antigeni differenti, una sfera di controllo rivestita con anti-IgA e una sfera di controllo rivestita di IgA vengono miscelate e collocate nei pozzetti di una piastra a micropozzetti in condizioni che conservano gli antigeni nello stato reattivo. I controlli prediluiti, un controllo privo di siero costituito da diluente per campioni senza aggiunta di siero e sieri di paziente diluiti vengono aggiunti a micropozzetti separati consentendo a qualsiasi anticorpo DGP e h-tTG presente di legarsi agli antigeni immobilizzati sulle microsfere e all'IgA libero di legarsi alla microsfera anti-IgA. Quindi, in ogni micropozzetto viene aggiunta IgA anti-umana coniugata con un campione fluorescente. Una seconda incubazione consente al coniugato fluorescente di IgA anti-umana di legarsi a qualsiasi anticorpo del paziente che si sia legato agli antigeni sulle microsfere o sia stato catturato dalla microsfera anti-IgA e all'IgA sulla microsfera IgA. I campioni vengono quindi misurati nell'analizzatore di flusso Luminex™ 100 o 200. Questo analizzatore di flusso è in grado di distinguere il colore di ogni microsfere dalle altre e di misurare l'intensità fluorescente del coniugato su ogni microsfere.¹⁹ L'intensità fluorescente sulla microsfere è proporzionale alla quantità di coniugato legato, che a sua volta è proporzionale alla quantità di anticorpi del paziente legati alle microsfere rivestite con antigene o alla microsfere anti-IgA. Ogni anticorpo può essere sottoposto ad analisi semi-quantitativa comparando l'intensità fluorescente del campione del paziente con il calibratore corrispondente. Confrontando le Unità Luminex calcolate della microsfere anti-IgA e della microsfere IgA è possibile identificare il siero con deficit di IgA come sotto descritto nella Interpretazione dei risultati. Queste due microsfere di controllo possono essere utilizzate anche per garantire che i risultati falsamente negativi a causa di un errore operativo vengano individuati come descritto in Controllo qualità. Si noti che queste microsfere quando una persona presenta un deficit di IgA producono gli stessi risultati che si ottiene quando

al pozzetto non viene aggiunto siero.

Reagenti

1. Piastra a micropozzetti in polistirene, 12 strisce di micropozzetti (1x8) (argento stampato a colori) con portapiastra, contenenti microsferi di 4 "colori" differenti. Ogni microsfera colorata è rivestita con un diverso antigene purificato (h-tTG, DGP, anti-IgA o IgA), ed è posta in una bustina metallica contenente polvere essiccante
2. QUANTA Plex™ Negative Control (controllo negativo), 1 fiala di sostanza tampone contenente conservanti e siero umano senza anticorpi IgA umani verso gli h-tTG e DGP antigeni, prediluito, pronta all'uso, 1,2 mL
3. Celiac IgA Calibrator, 1 fiala di sostanza tampone contenente conservanti e IgA anticorpi di siero umano IgA verso gli antigeni h-tTG e DGP, prediluito, pronta all'uso, 1,2 mL
4. Celiac IgA Positive Control, 1 fiala di sostanza tampone contenente conservanti e IgA anticorpi di siero umano IgA verso gli antigeni h-tTG e DGP, prediluito, pronta all'uso, 1,2 mL
5. HRP Sample Diluent (diluyente per campioni), 1 fiala di colore rosa, contenente soluzione fisiologica tamponata con Tris, Tween 20, stabilizzanti proteici e conservanti, 50 mL (usato anche come Controllo senza siero)
6. IgA Conjugate (di capra) marcato fluorescente, anti IgA umana (specifico per la catena alfa), 1 fiala color ambra, polvere liofilizzata, contenente sostanza tampone, stabilizzanti proteici e conservanti. Fare riferimento al paragrafo "Metodi" per istruzioni sulla ricostituzione.
7. QUANTA Plex™ Conjugate Diluent (diluyente per coniugato), 1 fiala di colore rosa, contenente sostanza tampone, stabilizzanti proteici e conservanti, 7 mL

Avvertenze

1. ATTENZIONE: Questo prodotto contiene un composto chimico (cloramfenicolo allo 0,02%) nel diluyente per i campioni noto allo Stato della California come causa di tumori.
2. Tutte le fonti umane di materiali usati nella preparazione dei controlli per questo prodotto sono state testate e sono risultate negative per la presenza di anticorpi anti-HIV, per HBsAg e per anticorpi anti-HCV mediante metodi approvati dall'FDA. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Calibrator e Celiac IgA Positive Control devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.²⁰
3. La sodio azide è usata come conservante. La sodio azide è un veleno e può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Lasciar scorrere grandi quantità di acqua, se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, per prevenire la formazione di azidi.
4. Usare appropriati indumenti personali protettivi mentre si lavora con i reagenti forniti.
5. I reagenti eventualmente rovesciati devono essere rimossi immediatamente. Seguire tutte le normative vigenti in materia di eliminazione dei residui di natura chimica.

Precauzioni

1. Questo prodotto è stato messo a punto per l'uso diagnostico *In Vitro*.
2. La sostituzione di componenti diversi da quelli forniti nel kit può causare risultati non attendibili. Tutti i controlli possiedono un codice di lotto specifico per ciascun kit.
3. L'adattamento di questo test all'uso con apparecchiature automatiche e altri dispositivi per trattamento dei campioni liquidi, in toto o in parte, può causare differenze nei risultati rispetto a quelli ottenuti mediante la procedura manuale. E' responsabilità di ciascun Laboratorio confermare che le procedure automatizzate utilizzate diano risultati entro limiti di accettabilità.
4. Parecchi fattori influenzano l'efficienza del saggio. Questi comprendono elementi come temperatura iniziale dei reagenti, temperatura ambiente, precisione e riproducibilità della tecnica di pipettaggio, riproducibilità della tecnica di mescolamento, analizzatore a flusso Luminex™ 100 o 200 utilizzato per misurare i risultati e durata dei periodi d'incubazione del saggio. È necessario utilizzare procedure coerenti per ottenere risultati accurati e riproducibili.
5. Si raccomanda di attenersi scrupolosamente alle istruzioni fornite.
6. Una chiusura incompleta della busta richiudibile contenente le strisce di pozzetti ed il materiale essiccante causa la degradazione dell'antigene ed una scarsa precisione nei risultati.
7. È possibile osservare valori bassi inattendibili dopo l'uso ripetuto di una singola boccetta di coniugato fluorescente per un certo periodo di tempo. È importante seguire tutte le procedure consigliate per la manipolazione del coniugato fluorescente, in modo da prevenire questo tipo di evenienza.
8. La contaminazione chimica del coniugato fluorescente può essere causata da scorretta pulizia o risciacquo delle attrezzature o degli strumenti. I residui dei comuni prodotti di laboratorio come ad esempio formalina, candeggina, etanolo, o dei detersivi può causare nel tempo la decomposizione del coniugato fluorescente. Risciacquare accuratamente tutte le attrezzature o gli strumenti con acqua distillata o deionizzata dopo l'utilizzo di detersivi chimici o disinfettanti.

Condizioni di conservazione

1. Conservare tutti i reagenti del kit a 2-8°C. Non congelare. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
2. Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate nella busta ben chiusa a 2-8°C.

Raccolta dei campioni

Questa tecnica deve essere usata con un campione di siero. L'aggiunta al campione di sodio azide o di altri

conservanti può influenzare in modo negativo i risultati. Campioni con segni di contaminazione microbica, trattati con calore o contenenti particelle visibili non dovrebbero essere usati. Non usi il lipemici di emolizzati o del fortemente.

Dopo il prelievo, il siero dovrebbe essere separato dal coagulo. Il Documento H18-A3 dell' CLSI (precedentemente NCCLS) raccomanda le seguenti condizioni di conservazione per i campioni: 1) Conservare i campioni a temperatura ambiente per non più di 8 ore. 2) Se il test non può essere eseguito entro 8 ore, conservare i campioni in frigorifero a 2-8°C. 3) Se il test non può essere eseguito entro 48 ore, oppure per la spedizione dei campioni, congelare a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. I campioni congelati devono essere mescolati bene dopo lo scongelamento e prima di essere testati.

Procedura

Materiali forniti

- 1 Piastra microtiter Celiac IgA Profile, (12-1 x 8 pozzetti), (colore aregneto timbrato) con supporto
- 1 1,2mL QUANTA Plex™ Controllo Negativo prediluito, lista para su uso
- 1 1,2mL Celiac IgA Calibrator prediluito, lista para su uso
- 1 1,2mL Celiac IgA Positive Control prediluito, lista para su uso
- 1 50mL Diluente per campioni HRP (usato anche come Controllo senza siero)
- 1 IgA Conjugate (di capra) marcato fluorescente, anti IgA umana
- 1 7mL QUANTA Plex™ Conjugate Diluent (diluente per coniugato)

Materiali richiesti ma non forniti

Micropipette in grado di erogare volume di 5 e 500 μL

Puntali monouso per micropipette

Provette per la diluizione dei sieri, volume 1-4mL

Acqua distillata o deionizzata

Fluido di distribuzione per il a flusso Luminex™ 100 o 200 flusso analizzatore

Analizzatore a flusso Luminex™ 100 o 200

Pipettatrice elettronica ad 8 canali con portate di 5, 30, 45, 50 e 60 μL o pipettatrice/diluitore automatizzato

Utilizzo del analizzatore a flusso Luminex™ 100 o 200

1. Consultare il manuale per l'utente allegato al Luminex™ per istruzioni dettagliate sul funzionamento del analizzatore a flusso Luminex™ 100 o 200 e sul software Luminex™ Integrated System 2,0 o superiore. Per ottenere altre informazioni e risolvere eventuali problemi che riguardano l'esecuzione del saggio, contattare il servizio tecnico di INOVA Diagnostics inc. all'indirizzo o numero di telefono reperibili sull'ultima pagina del manuale. Istruzioni schematiche sul funzionamento del analizzatore a flusso Luminex™ 100 o 200 sono fornite qui di seguito.
2. Calibrare il Luminex™ utilizzando le microsferi di controllo e calibrazione fornite da Luminex Corporation almeno una volta al mese e verificare la correttezza della calibrazione. Inoltre, calibrare il Luminex™ se il delta della temperatura di calibrazione è superiore a 3 gradi, se i controlli del saggio sono fuori scala od ogni qualvolta si ritenga necessario.
3. Il Luminex™ ha bisogno di 30 minuti per riscaldarsi dopo essere stato acceso. Una volta completato il periodo di riscaldamento, eseguire le operazioni di innesco, risciacquo con alcool e lavaggio consigliate dal produttore.
4. Utilizzando il software versione, caricare il modello "QP Celiac IgA Profile" ed assicurarsi che tutte le informazioni sul lotto siano corrette. Se necessario, aggiornare questi dati. I parametri nel modello sono i seguenti: I colori delle microsferi sono h-tTG = 27, DGP = 28, anti-IgA = 29, IgA = 30. Gli eventi per microsfera sono 50, le dimensioni del campione è 50 μL , la velocità di flusso è 60 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ (veloce) ed il valore soglia è 7.500-17.000. I valori medi sono utilizzati per il calcolo della intensità della Fluorescenza Media (MFI).
5. Immettere manualmente i nomi dei campioni o cliccando su "Load Pa List".
6. Caricare la piastra nella piattaforma XY del Luminex™.
7. Avviare il Luminex™ cliccando sul tasto "Start Plate".
8. Una volta terminata la giornata di lavoro, eseguire le operazioni di disinfezione e ammollo prima di spegnere lo strumento.

Metodica: Prima di incominciare

1. Per informazioni sulla programmazione dei dispositivi automatizzati, contattare i servizi tecnici INOVA Diagnostics, Inc.
2. Accendere il analizzatore a flusso Luminex™ 100 o 200, assicurarsi che sia completato il ciclo di riscaldamento ed eseguire tutte le operazioni di manutenzione giornaliera come descritto in precedenza. Se necessario, calibrare lo strumento e verificare la correttezza della calibrazione.
3. Portare tutti i reagenti ed i campioni dei pazienti a temperatura ambiente (20-26°C) e mescolarli accuratamente.
4. Se il coniugato fluorescente anti IgA umana non è ricostituito, aggiungere 6 mL di QUANTA Plex™ Conjugate Diluent alla fiala color ambra contenente la polvere liofilizzata e ruotare il contenitore per circa 30 sec. per dissolverne il contenuto. Il coniugato fluorescente ricostituito è stabile per tre mesi a 2-8°C. **Non congelare.**
5. Accertarsi che il contenitore per il fluido di distribuzione del Luminex™ sia riempito completamente con il fluido fornito da Luminex Corporation e che la bottiglia di scarico è vuota.
6. Preparare una diluizione 1:101 per ciascun campione dei pazienti aggiungendo 5 μL di ogni siero a 500 μL di HRP Sample Diluent (diluente per campioni HRP), quindi centrifugare per mescolare completamente la soluzione. I campioni diluiti possono essere utilizzati entro 8 ore dalla

preparazione. **NON DILUIRE** QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Calibrator e Positive Control.

7. La determinazione della presenza o assenza di anticorpi IgA anti-h-tTG e anti-DGP, e il rilevamento del deficit di IgA selettivo richiede due micropozzetti per il Calibratore e un micropozzetto ciascuno per i Controlli Negativo, Positivo e Senza siero. È consigliabile analizzare i campioni in un'unica sessione.

Esecuzione del test

1. **Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-26°C) prima di iniziare il saggio.** Inserire il numero necessario di micropozzetti/strisce sul portapietra. **Rimettere immediatamente le strisce non utilizzate nella bustina di protezione contenente polvere essiccante e sigillarla perfettamente per minimizzare l'esposizione all'umidità e alla luce.**
2. Aggiungere 45µL di diluente per campioni HRP a ogni micropozzetto che conterrà un **campione dei pazienti (e il controllo senza siero)**. **Non** aggiungere diluente per campioni HRP ai primi quattro micropozzetti, dato che questi conterranno il controllo QUANTA Plex™ Negative Control, il calibratore Celiac IgA Calibrator (in duplicato) e il controllo Celiac IgA Positive Control. **Non** aggiungere a questo punto i campioni diluiti dei pazienti ai micropozzetti.
3. Attenersi ad una delle sequenze temporali seguenti al momento di aggiungere controlli, campioni e coniugati ai micropozzetti. Poiché Luminex™ legge i campioni in modo sequenziale alla velocità di circa 1 campione ogni 19 sec. (o una striscia da 8 pozzetti in circa 2 minuti e mezzo), è necessario aggiungere ai micropozzetti i campioni dei pazienti ed anche il coniugato alla stessa velocità per minimizzare ogni variazione fronte-retro del saggio. Se controlli, campioni, o coniugato sono aggiunti uno alla volta, intervallare ogni aggiunta nel successivo micropozzetto di 19 sec. Se controlli, campioni, o coniugato sono aggiunti 8 alla volta in una striscia, intervallare ciascuna aggiunta nella successiva striscia di 2 minuti e mezzo. Entrambe le sequenze temporali richiedono circa 30 minuti per aggiungere i campioni a tutte le 12 strisce di un'intera piastra e ridurranno al minimo la variazione fronte-retro del saggio.
4. Agitare mediante vortex, quindi aggiungere 50µL di ciascuno dei seguenti controlli **prediluiti**: il controllo QUANTA Plex™ Negative Control al primo micropozzetto, il calibratore Celiac IgA Calibrator al secondo e al terzo micropozzetto e il controllo Celiac IgA Positive Control al quarto micropozzetto. È necessario utilizzare una pipettatrice elettronica quando si aggiungono manualmente i campioni e si mescolano le microsfele. Utilizzare una delle sequenze temporali per aggiungere i controlli come descritto nel paragrafo 3. **Pipettare vigorosamente almeno 30µL di QUANTA Plex™ Negative Control e Celiac IgA Calibrator e Positive Control su e giù quattro volte per miscelare le microsfele e i controlli in ogni micropozzetto.** Il conteggio del tempo di incubazione di 30 minuti inizia dopo l'aggiunta di QUANTA Plex™ Negative Control nel primo micropozzetto.
5. Continuare immediatamente il test aggiungendo 5µL di Diluente per campioni HRP al quinto micropozzetto (il controllo senza siero) e 5µL di siero di pazienti diluito ai micropozzetti appropriati restante (nota: ciò fornisce un siero paziente con diluizione finale di 1:1010). Mantenere la stessa sequenza temporale come indicato nel paragrafo 4. **Mescolare nel micropozzetto il campione diluito del paziente e il HRP Sample Diluent pipettando energicamente almeno 30 µL di contenuto del micropozzetto su e giù quattro volte.** Continuare la procedura regolando la durata dell'incubazione a 30 minuti subito dopo aver aggiunto il QUANTA Plex™ Negative Control. Lasciare le strisce con i micropozzetti a temperatura ambiente, in piano e al riparo dalla luce solare diretta per il tempo di incubazione residuo.
6. Al termine del primo periodo di incubazione, aggiungere 50 µL al coniugato fluorescente di ciascun micropozzetto e **pipettare energicamente almeno 60 µL di contenuto del micropozzetto su e giù quattro volte.** Mantenere la stessa sequenza temporale per aggiungere il coniugato che era stato utilizzato al paragrafo 4 e 5. Il coniugato deve essere rimosso dal flacone utilizzando le comuni procedure di asepsi e le tecniche di laboratorio corrette. Rimuovere dal flacone soltanto la quantità di coniugato necessaria per il saggio. **PER EVITARE LA POSSIBILE CONTAMINAZIONE MICROBICA E/O CHIMICA, NON RIMETTERE MAI IL CONIUGATO INUTILIZZATO NEL FLACONE.** Incubare le strisce di micropozzetti per 30 minuti a temperatura ambiente, in piano e al riparo dalla luce solare diretta. Il conteggio del tempo di incubazione inizia subito dopo la prima aggiunta di coniugato.
7. Entro un'ora dal completamento dell'incubazione del coniugato fluorescente della durata di 30 minuti, leggere sul Luminex™ la piastra Celiac IgA Profile come descritto dettagliatamente nella sezione precedente, "Utilizzo del Analizzatore a flusso Luminex™ 100 o 200".

Controllo di qualità

1. Il Celiac IgA Calibrator (in duplicato), il Celiac IgA Positive Control, il QUANTA Plex™ Negative Control e il Serum Free Control devono essere eseguiti con ciascun lotto di campioni per garantire che tutti i reagenti e tutte le procedure siano eseguiti correttamente.
2. Si noti che, dato che il Celiac IgA Calibrator, il Celiac IgA Positive Control e il QUANTA Plex™ Negative Control sono prediluiti, non controllano i metodi procedurali associati alle diluizioni dei campioni.
3. Ulteriori controlli possono essere inclusi in base alle indicazioni o alle richieste delle vigenti regolamentazioni o delle organizzazioni di accreditamento. Ulteriori sieri di controllo possono essere preparati raccogliendo un pool dei sieri umani, aliquotandolo e conservandolo a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
4. Affinché i risultati di test possano essere considerati validi, devono essere soddisfatti tutti i criteri seguenti. Se qualsiasi di questi non viene soddisfatto, il test deve essere considerato non valido e deve essere ripetuto. Il valore in Unità Luminex (LU) del Calibratore per ogni antigene è riportato

sull'etichetta della confezione con il kit. Vedere la formula nella sezione Calcolo dei risultati per determinare le LU del QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Positive Control e Controllo Senza Siero.

- a. Il valore di QUANTA Plex™ Negative Control deve essere < 20 LU per h-tTG e DGP. Deve essere compreso tra 10 e 40 LU per le microsfere di controllo IgA e anti-IgA.
 - b. Il valore di Celiac IgA Positive Control deve essere ≥ 30 LU per h-tTG e fra 30 LU e 130 LU per DGP. Deve essere compreso tra 10 e 40 LU per le microsfere di controllo IgA e anti-IgA.
 - c. Il valore del Controllo Senza Siero deve essere < 20 LU per h-tTG e DGP. Per la microsfere anti-IgA il valore deve essere < 5,0 LU e per la microsfere IgA deve essere compreso tra 10 e 40 LU.
 - d. Il rapporto delle LU per Anti-IgA/IgA deve essere >0,50 per QUANTA Plex™ Negative Control e Celiac IgA Positive Control e <0,50 per Controllo Senza Siero.
 - e. Le microsfere di controllo anti-IgA e IgA hanno lo scopo di rilevare un deficit di IgA selettivo e di garantire che i risultati dei pazienti falsamente negativi dovuti a errori operativi vengano rilevati. Se una delle due microsfere di controllo ha un risultato calcolato inferiore a 5 LU per qualsiasi paziente particolare, nella Versione IS 2,0 e superiore apparirà il risultato "Retest".
 - i. Esiste la possibilità che il paziente abbia un deficit di IgA selettivo se i risultati per anti-h-tTG e DGP sono negativi (ossia inferiori a 20 LU) e la microsfere anti-IgA è inferiore a 5 LU, mentre allo stesso tempo il valore della microsfere di controllo IgA è superiore a 20 LU e produce un rapporto anti-IgA LU/IgA LU < 0,5. Si noti che lo stesso risultato può essere riscontrato se il siero del paziente non è stato aggiunto al micropozzetto.
 - ii. Se sia la microsfere anti-IgA sia la microsfere IgA si trovano di meno che 5,0 LU, esiste la possibilità che il coniugato non sia stato aggiunto al micropozzetto. Paziente deve essere sottoposto nuovamente a test per confermare il risultato negativo.
5. QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Calibrator e Positive Control e Controllo Senza Siero servono per controllare un'eventuale malfunzionamento dei reagenti. L'utente del test dovrebbe fare riferimento al Documento C24-A3 dell' CLSI (precedentemente NCCLS) per ulteriori informazioni su appropriate tecniche di Controllo di Qualità.

Calcolo dei risultati

In primo luogo vengono determinati gli MFI per tutti i controlli e i campioni dei pazienti per ogni antigene e le due microsfere di controllo. La reattività espressa in LU di un determinato campione per ciascun tipo di antigene può quindi essere calcolata secondo la formula seguente. Dividere l'MFI del campione per l'MFI del Celiac IgA Calibrator per quell'antigene o microsfere di controllo e moltiplicare il risultato per il numero di LUs assegnato al Celiac IgA Calibrator per quell'antigene. L'LU valore del Calibratore per ogni antigene è riportato sull'etichetta della confezione del kit. L'esempio che segue è per la determinazione di una reattività anti-h-tTG. Utilizzare la formula equivalente per la microsfere DGP e le due microsfere di controllo.

$$\text{Valore del campione (in LU)} = \frac{\text{MFI del campione per h-tTG}}{\text{MFI h-tTG Calibratore}} \times \text{valore h-tTG Calibratore (in LU)}$$

La reattività dell'anticorpo IgA per h-tTG e DGP può quindi essere classificata in base alla tabella seguente.

	LU
Negativo	<20
Debolmente positivo	20-30
Positivo	>30

La reattività è correlata in modo non lineare alla quantità di autoanticorpi presenti sulla microsfere. Sebbene l'aumento e la diminuzione delle concentrazioni anticorpali del paziente si riflettano in un corrispondente aumento o caduta della reattività della fluorescenza, la variazione non è proporzionale (cioè il raddoppio della concentrazione anticorpale non raddoppia la reattività). Inoltre, la quantità di IgA totali nel siero del paziente influenza il valore misurabile di MFI. Se è necessaria un'analisi quantitativa più accurata degli autoanticorpi del paziente, il campione dev'essere elaborato con un test quantitativo.

Interpretazione dei risultati

QUANTA Plex™ Analisi è una tecnica molto sensibile e capace di individuare piccole differenze nelle popolazioni di pazienti. Ciascun laboratorio deve stabilire il proprio intervallo normale basato sulle tecniche, controlli, attrezzature e popolazione di pazienti specifiche e secondo le proprie procedure abituali.

È consigliabile che i risultati certificati dal laboratorio includano questa dichiarazione: "I risultati seguenti sono stati ottenuti con INOVA QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile. I valori ottenuti con metodi analitici di altri produttori possono non essere intercambiabili. La grandezza dei livelli riportati di autoanticorpi IgA non può mai essere correlata ad un titolo di punto finale."

Per determinare se il paziente dispone di una quantità sufficiente o insufficiente di IgA nel siero, dividere l'LU della microsfere anti-IgA per l'LU della microsfere IgA. Se il risultato è inferiore a 0,5 e il paziente è negativo sia all'anti-h-tTG sia all'anti-DGP, il campione deve essere testato nuovamente per confermare il risultato. Se viene confermato che il paziente ha una quantità insufficiente di IgA, il campione deve essere riflesso su test IgG anti-h-tTG e IgG anti-DGP. Se occorre la conferma del deficit IgA, il campione deve essere testato utilizzando un test IgA quantitativo.

Limitazioni del test

1. La presenza nel campione di complessi immuni o di altri aggregati di immunoglobuline può causare un aumento del livello di reazioni aspecifiche con conseguenti risultati falsi positivi con questo test.
2. Non tutti i pazienti affetti da celiaca malattia e la Dermatite Erpetiforme risultano positivi per la presenza di anticorpi anti-h-tTG o DGP IgA.
3. I risultati di questo test devono essere valutati dal medico curante alla luce del quadro clinico del paziente e del risultato degli altri test sierologici.
4. Mescolare in modo inadeguato i controlli e/o i campioni diluiti con le sfere conservate nei pozzetti può portare a valori di CV% più alti rispetto a quelli che normalmente si ottengono con i test ELISA.
5. Dopo la incubazione di mezz'ora con il coniugato fluoresceinato, approssimativamente c'è un ulteriore incremento del 10% nella fluorescenza per ogni 30 minuti aggiuntivi di incubazione.
6. Le prestazioni caratteristiche del test non sono state valutate per campioni diversi dal siero.
7. Non prestare attenzione alla tempistica nella aggiunta del reattivo, può portare ad un incremento della variazione dovuta all'effetto front-to-back (fronte-retro).

Valori attesi

INOVA Diagnostics, Inc. ha valutato la capacità del test QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile analisi di rilevare gli anticorpi anti-h-tTG e anti-DGP IgA in confronto ai test ELISA commercialmente disponibili. I risultati degli ELISA e di ciascuno dei test QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile sono stati considerati positivi se il campione del paziente era superiore o uguale a 20 Unità Luminex o Unità ELISA e negativo se era inferiore a 20 LU o EU.

Range normale

278 campioni di sangue normale da donatori sono stati elaborati con il test QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile 277 campioni normali (99,6%) sono risultati negativi per la frazione h-tTG del test QUANTA Plex™. Il campione più forte mostrava un valore di 29 LU. Il valore medio era di 3,2 LU con deviazione standard (SD) di 1,5. Il valore soglia era 11 (SD) superiore alla media. Tutti i 278 campioni normali tranne 3 (98,9%) sono risultati negativi alla parte DGP del test QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile. Il campione più alto aveva un valore di 88 LU. Lo stesso campione era positivo anche all'ELISA DGP. Escludendo il campione doppiamente positivo, il valore medio era di 4,4 LU con una SD di 5,8. Il valore soglia era 2,7 (SD) superiore alla media.

Sensibilità e specificità clinica

Per determinare la sensibilità clinica dei test anticorpali, 29 campioni tratti da pazienti con malattia Celiaca attiva senza deficit di IgA sono stati sottoposti a test con QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile e gli ELISA corrispondenti. La sensibilità clinica per IgA anti-h-tTG è risultata pari a 93% (con un Intervallo di Confidenza [CI] del 95% [CI] dal 77-99%). La sensibilità clinica per IgA anti-DGP è risultata pari al 73% (CI 95% da 53-92%). Per determinare la specificità clinica, sono stati sottoposti a test 494 pazienti a cui non era stata diagnosticata celiachia. Questo gruppo includeva donatori di sangue normali, pazienti con malattie reumatiche, epatiche, gastrointestinali ed infettive. La specificità clinica per l'anti-h-tTG è risultata pari al 98%, con un CI del 95% di 96-99%. Anche la specificità clinica dell'anti-DGP è risultata pari a 98% (95% CI da 96-99%).

Sensibilità e Specificità clinica per i test IgA anti-h-tTG e DGP nel Celiac IgA Profile

h-tTG IgA		Diagnosi		
		Positivi (celiachia senza deficit di IgA e paziente che non seguiva una dieta priva di glutine)	Negativi (Controlli per i quali non è stata formulata la diagnosi di celiachia)	Totale
Luminex	Positivi	27	11**	38
	Negativi	2*	483	485
	Totale	29	494	523

*Entrambi questi campioni sono risultati negativi all'ELISA tTG. **Dieci di questi sono positivi vicino ELISA.
Sensibilità : $27/(27+2) \times 100 = 93,1\%$ ([CI] 77-99%) Specificità: $483/(11+483) \times 100 = 97,8\%$ ([CI] 96-99%)

DGP IgA		Diagnosi		
		Positivi (celiachia senza deficit di IgA e paziente che non seguiva una dieta priva di glutine)	Negativi (Controlli per i quali non è stata formulata la diagnosi di celiachia)	Totale
Luminex	Positivi	18	12**	30
	Negativi	11*	482	493
	Totale	29	494	523

* Dieci di questi sono negativi vicino ELISA. **Dieci di questi sono positivi vicino ELISA.
Sensibilità: $18/(18+11) \times 100 = 62,1\%$ ([CI] 53-92%). Specificità: $482/(12+482) \times 100 = 97,6\%$ ([CI] 96-99%)

Confronto tra i saggi QUANTA Plex™ ed ELISA

La concordanza relativa delle percentuali positive, negative e totale (con Intervalli di Confidenza del 95%) dei test anticorpali QUANTA Plex™ rispetto ai test ELISA è stata calcolata per tutti i campioni sottoposti a test ed è riportata nelle tabelle seguenti.

h-tTG IgA		ELISA		
		Positivi	Negativi	Totale
Luminex	Positivi	174	2	176
	Negativi	21	757	778
	Totale	195	759	954

Percentuale di accordo positivi:: $174/(174+21) \times 100 = 89,2\%$ (84-93%)
 Percentuale di accordo negativi: $757/(2+757) \times 100 = 99,7\%$ (99-100%)
 Percentuale di accordo totale: $(174+757)/(174+2+21+757) \times 100 = 97,6\%$

DGP IgA		ELISA		
		Positivi	Negativi	Totale
Luminex	Positivi	136	4	140
	Negativi	31	783	814
	Totale	167	787	954

Percentuale di accordo positivi:: $136/(136+31) \times 100 = 81,4\%$ (75-87%)
 Percentuale di accordo negativi: $783/(4+783) \times 100 = 99,5\%$ (99-100%)
 Percentuale di accordo totale: $(136+783)/(136+4+31+783) \times 100 = 96,3\%$

Rilevamento di una quantità insufficiente di IgA

Il siero di 5 pazienti con deficit IgA selettivo noto è stato testato sulla base del Celiac IgA Profile, così come altri 949 pazienti sopra descritti. Questi 5 più 21 altri pazienti hanno prodotto rapporti di anti-IgA LU/IgA LU inferiori a 0,5 e quindi hanno evidenziato una quantità di IgA insufficiente per il Celiac IgA Profile.

Sensibilità e la Specificità del rapporto anti-IgA LU/IgA LU Ratio nel QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile.

Positivi Controllo N=5	QUANTA Plex™ Rapporto >0,5	QUANTA Plex™ Rapporto <0,5	Clinica Sensibilità : QUANTA Plex™ (95% CI)	Tutti Negativi Controllo N=949	QUANTA Plex™ Rapporto >0,5	QUANTA Plex™ Rapporto <0,5	Clinica Specificità QUANTA Plex™ (95% CI)
Anti-IgA/IgA Rapporto	0	5	100% (82-100%)**	Anti-IgA/IgA Rapporto	928	21*	99% (98-100%)**

*In base a parametri sierologici, 12 pazienti sono risultati affetti da celiachia con deficit di IgA e 7 controlli altamente diluiti, mentre 1 aveva un livello sierico di IgA totale basso noto. Considerando un'incidenza di 1 su 500 IgA carente, dovrebbero essere positivi altri 2 campioni.

**Calcoli basati su 18 sieri con deficit attesi.

Precisione e riproducibilità

Variazione intra-analisi ed inter-analisi. Per la variazione all'interno del test, 18 campioni sono stati sottoposti a test 10 volte per ciascun singolo test. La variazione in 3 - 5 campioni rappresentativi per ogni test è riportata nella tabella sottostante. Per la variazione tra un test e l'altro, 20 campioni sono stati sottoposti a test in 6 cicli svolti in 6 giorni diversi. La variazione in 3 - 5 campioni rappresentativi per ogni test è riportata nella tabella sottostante.

Variazione all'interno del test			Variazione tra un test e l'altro		
Antigene	Media LU	% C.V.	Antigene	Media LU	% C.V.
h-tTG	22	6%	h-tTG	23	9%
h-tTG	23	7%	h-tTG	26	8%
h-tTG	31	7%	h-tTG	31	8%
h-tTG	89	9%	h-tTG	102	3%
h-tTG	255	4%	h-tTG	263	3%
DGP	17	12%	DGP	19	4%
DGP	22	8%	DGP	23	11%
DGP	25	8%	DGP	26	5%
DGP	59	4%	DGP	65	9%
DGP	38	8%	DGP	44	9%
anti-IgA	5	5%	anti-IgA	5	8%
anti-IgA	11	4%	anti-IgA	11	5%
anti-IgA	20	2%	anti-IgA	20	5%
IgA	27	5%	IgA	28	4%
IgA	10	4%	IgA	10	5%
IgA	21	2%	IgA	23	4%

Bibliografia

1. Trier JS: Celiac Sprue: N Engl J Med **325**: 1709-1719, 1991.
2. Strober W: Gluten-sensitive enteropathy: A nonallergic immune hypersensitivity of the gastrointestinal tract. J. Allergy Clin. Immunol. **78**: 202-211, 1986.
3. McMillan SA, Haughton DJ, Biggart JD, et al.: Predictive value for coeliac disease of antibodies to gliadin, endomysium and jejunum in patients attending for jejunal biopsy. BMJ **303**: 1163-1165, 1991.
4. Valdimarsson T, Franzen L, Grodzinsky E, et al.: Is small bowel biopsy necessary in adults with suspected celiac disease and IgA anti-endomysial antibodies? 100% positive predictive value for celiac disease in adults. Digestive Diseases and Science **41**: 83-87, 1996.
5. 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 (ESPGAN). Arch Diseases of Childhood **65**: 909-911, 1990.
6. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al.: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nature Medicine **3**: 797-801, 1997.
7. Sardy M, Odenthal U, Karpati S, et al.: Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. Clin Chem **45**: 2142, 1999.
8. Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, et al.: Human recombinant tissue transglutaminase ELISA : an innovative diagnostic assay for celiac disease. Am J Gastroenterology **95**: 1253-1257, 2000.
9. Osman AA, Günnel T, Dietl A, et al.: B-Cell epitopes of gliadin. Clin Exp Immunol **121**: 248-254, 2000.
10. Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, et al.: Celiac disease: Antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. Clin Chem **47**: 2023-2028, 2001.
11. Schwertz E, Kahlenberg F, Sack U, et al.: Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. Clin Chem **50**: 2370-2375, 2004.
12. Prince HE: Evaluation of the INOVA Diagnostics enzyme-linked immunosorbent assay kits for measuring serum immunoglobulin G (IgG) and IgA to deamidated gliadin peptides. Clin Vaccine Immunol **13**: 150-151, 2006.
13. Sugai E, Vazquez H, Nachman F, et al.: Accuracy of testing for antibodies to synthetic gliadin-related peptides in celiac disease. Clin Gastroenterol Hepatol **4**: 1112-1117, 2006.
14. Collin P, Maki M, Keyrilainen O, et al.: Selective IgA deficiency and celiac disease. Scand J Gastroenterol **27**: 367-371, 1992.
15. Cataldo F, Marino V, Ventura A, et al.: Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Gut **42**: 362-365, 1998.
16. Fernandez E, Blanco C, Garcia S, et al.: Use of low concentrations of human IgA anti-tissue transglutaminase to rule out selective IgA deficiency in patients with suspected celiac disease. Clin Chem **51**: 1014-1016, 2005.
17. Dahlbom I, Olsson M, Forooz NK, et al.: Immunoglobulin G (IgG) anti-tissue transglutaminase antibodies used as markers for IgA-deficient celiac disease patients. Clin Diag Lab Immunol **12**: 254-258, 2005.
18. Chorzelski TP, Sulej J, Tcherzewska H, et al.: IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and celiac disease. Ann NY Acad Sci **420**: 325-334, 1983.
19. Martins TB, Burlingame R, von Mühlen CA, et al.: Evaluation of multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens. Clin Diagn Lab Immunol **11**: 1054-1059, 2004.
20. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: Centers for Disease Control/National Institutes of Health, Fifth Edition, 2007.

Fornitore:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Rappresentante Autorizzato:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

Technical Service
628940

888-545-9495
July 2007
Revision ITA0

