

Para Diagnóstico *In Vitro*

Complejidad de CLIA: Alto

## Aplicación

El QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile es un fluoroinmunoanálisis para la detección semicuantitativa de anticuerpos IgA anti-htTG (transglutaminasa tisular humana) y anti-DGP (péptidos de gliadina desamidada) y de la deficiencia de IgA, en suero humano. La presencia de estos anticuerpos, junto a otros resultados clínicos y de laboratorio, sirve de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad celíaca o enteropatía sensible al gluten. La deficiencia de IgA indica que no hay suficiente IgA para permitir la detección de IgA anti-h-tTG o anti-DGP.

## Sumario y Explicación de la prueba

La enfermedad celíaca es un trastorno crónico cuyas características principales son inflamación y un “aplanamiento” de la mucosa intestinal que provoca un síndrome de malabsorción denominado enteropatía sensible al gluten. La etiología exacta de esta enfermedad sigue siendo desconocida, pero la gliadina (la fracción soluble en alcohol del gluten de trigo) es claramente el agente tóxico.<sup>1,2</sup>

Originalmente, se utilizaban una serie de biopsias intestinales para diagnosticar la enfermedad celíaca. Más recientemente, se ha propuesto el análisis serológico de anticuerpos anti-gliadina, anti-endomisio y anti-tTG para identificar a los pacientes con posible enteropatía sensible al gluten y supervisar el cumplimiento de las dietas.<sup>3-5</sup> La Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición ha recomendado el uso de marcadores de anticuerpos, como en los anticuerpos anti-gliadina y anti-endomisio, con el objetivo de reducir el número de biopsias intestinales necesarias para realizar el diagnóstico.<sup>5</sup>

El antígeno de endomisio ha sido identificado como la enzima tTG, que cataliza la formación de uniones covalentes entre proteínas.<sup>6</sup> Los procedimientos ELISA específicos que emplean tTG como antígeno son una alternativa objetiva y fiable a los tradicionales ensayos de inmunofluorescencia que utilizan secciones finas de esófago de primate como sustrato.<sup>6-8</sup> El antígeno htTG se ha producido mediante tecnología recombinante y puede tener ciertas ventajas frente al antígeno de hígado de cobaya.<sup>7,8</sup>

Recientes estudios han revelado que los anticuerpos anti-gliadina de pacientes con enfermedad celíaca se unen a un número muy pequeño de epítomos específicos de la molécula de gliadina.<sup>9-11</sup> Dichos estudios indican también que la desamidación selectiva de la gliadina por la enzima tTG, asociada a la enfermedad celíaca, potencia la unión a los anticuerpos anti-gliadina. Los análisis que utilizan péptidos de gliadina desamidados consiguen una exactitud en el diagnóstico de la enfermedad superior a la de las pruebas habituales con anti-gliadina e incluso a la de los ensayos con anti-tTG.<sup>12,13</sup> Además, estos anticuerpos son de interés para realizar un seguimiento de la actividad de la enfermedad a lo largo del tiempo y para supervisar el cumplimiento de las dietas sin gluten.<sup>13</sup>

Una proporción significativa de pacientes con enfermedad celíaca presentan deficiencia de IgA.<sup>14-17</sup> Por ello, una estrategia de detección sensible para las poblaciones de riesgo comprende el análisis de anticuerpos IgA anti-DGP y anti-h-tTG, así como la detección de la deficiencia selectiva de IgA.

La dermatitis herpetiforme (DH) es una enfermedad de la piel que, al igual que la enfermedad celíaca, está provocada por la ingesta de proteínas del trigo. La mayoría de los pacientes con DH presentan una atrofia de las vellosidades intestinales del yeyuno idéntica a la encontrada en la enfermedad celíaca, y una dieta estricta sin gluten mejora tanto las lesiones intestinales como las cutáneas.<sup>1,2,18</sup> Los métodos serológicos actuales, como los análisis de endomisio, gliadina nativa y tTG, poseen un rendimiento inferior cuando se utilizan para la detección de DH, pues tienen una sensibilidad solo del 60% al 75%<sup>18</sup>, frente a una sensibilidad superior al 95% en la enfermedad celíaca.<sup>3-8</sup>

El QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile es un análisis de detección de los anticuerpos que se encuentran en las personas con enfermedad celíaca y con el correspondiente trastorno sensible al gluten (dermatitis herpetiforme). Permite la detección simultánea de anticuerpos IgA para un péptido de gliadina desamidado sintético y también para la tTG humana recombinante, y al mismo tiempo detecta la deficiencia de IgA.

## Procedimiento de tradébil

La h-tTG recombinante y el DGP sintético se unen a diferentes lechos con “coloración” fluorescente. Los dos lechos recubiertos de antígeno, así como un lecho de control recubierto de anti-IgA y un lecho de control recubierto de IgA, se mezclan y se colocan en los pocillos de una placa microperforada en condiciones que mantienen los antígenos en su estado reactivo. Los controles previamente diluidos, un control sin suero formado por diluyente de la muestra sin suero añadido y, finalmente, los sueros diluidos de los pacientes, se añaden a diferentes pocillos, lo que permite que cualquier anticuerpo anti-DGP o anti-htTG que esté presente se una a los antígenos inmovilizados de los lechos, y que la IgA libre se una al lecho anti-IgA. A continuación, se añade anticuerpo anti-IgA humana conjugado con una sonda fluorescente a cada pocillo. Una segunda incubación permite que el conjugado fluorescente de anticuerpos anti-IgA humana se una a cualquier anticuerpo del paciente que se haya ligado a los antígenos de los lechos o haya sido capturado por el lecho anti-IgA, así como a la IgA en el lecho IgA. Seguidamente, se miden las muestras en el analizador de flujo Luminex™ 100 or 200. Este analizador de flujo puede distinguir el color de cada lecho entre los demás y medir la intensidad de fluorescencia del conjugado en cada lecho.<sup>19</sup> La intensidad de fluorescencia del lecho es proporcional a la cantidad de conjugado unido, que a su vez es proporcional a la cantidad de anticuerpos del paciente unidos a los lechos recubiertos de antígeno o al lecho anti-IgA. Cada anticuerpo puede determinarse semicuantitativamente comparando la intensidad de fluorescencia de la muestra del paciente con la del correspondiente Calibrador. Comparando las unidades Luminex (UL) calculadas del lecho anti-IgA y del lecho IgA podemos identificar un suero con deficiencia selectiva de IgA, tal como se explica más abajo en la interpretación de los resultados. Estos dos lechos de control también pueden utilizarse para garantizar la detección de falsos negativos debidos a errores de operación, tal como se explica en el apartado sobre control de calidad. Debe tenerse en cuenta que estos lechos producen los mismos resultados tanto si una persona tiene deficiencia de IgA como si no se añade suero al pocillo.

## Reactivos

1. Microplaca de poliestireno, 12 (1 x 8) tiras (plata grabada en color) de micropocillos con soporte, que contiene perlas de 4 colores diferentes. Cada una de las perlas de colores está recubierta de un antígeno purificado diferente (h-tTG, DGP, anti-IgA o IgA), en una lámina que contiene secantes
2. QUANTA Plex™ Negative Control, 1 vial de tampón que contiene conservante y suero humano sin anticuerpos IgA humanos frente a h-tTG y DGP antígenos, previamente diluido, lista para su uso, 1.2mL

- Celiac IgA Calibrator, 1 vial de tampón que contiene conservante y IgA anticuerpos en suero humano frente a los antígenos h-tTG y DGP, previamente diluidos, lista para su uso, 1.2mL
- Celiac IgA Positive Control, 1 vial de tampón que contiene conservante IgA anticuerpos en suero humano frente a los antígenos a h-tTG y DGP, previamente diluidos, lista para su uso, 1.2mL
- Muestra de diluyente HRP, 1 vial – color rosa, que contiene suero salino Tris-tamponado, Tween 20, estabilizantes de proteínas y conservantes, 50mL (también utilizado como control sin suero)
- Conjugado de IgA cabra marcado con fluorescencia, contra IgA humana (específico para cadena alfa), 1 vial de color ámbar – polvo liofilizado, que contiene tampón, estabilizantes de proteínas y conservantes. En la Sección de Métodos, encontrará instrucciones sobre la reconstitución
- QUANTA Plex™ Conjugate Diluent, 1 vial – de color rosa, contiene tampón, estabilizantes de proteínas y conservantes, 7mL

## Advertencias

- Aviso: Este producto contiene cloramfenicol al 0.02% en el Diluyente de muestras considerado en el estado de California como causante de cáncer.
- Todo material de origen humano usado en la preparación de los controles para este producto se ha examinado resultando negativo para anticuerpos contra HIV, HBsAg, y HCV por métodos aprobados por la FDA. Ningún método puede sin embargo ofrecer garantía completa que HIV, HBV, HCV o otros agentes contagiosos estén ausentes. Por lo tanto, QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Calibrator y Positive Control débil y negativo deben manejarse como si fueran material potencialmente contagioso.<sup>20</sup>
- Dado que se utiliza azida sódica como conservante, este producto puede ser tóxico por ingestión o absorción a través de piel o mucosas. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si se utilizan desagües para la eliminación de reactivos se recomienda lavarlos con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas metálicas.
- Se recomienda utilizar el equipo protector apropiado al trabajar con este kit.
- Los reactivos derramados deben limpiarse inmediatamente. Siga las normas aplicables en su laboratorio acerca de la eliminación de residuos.

## Precauciones

- Este producto es para ser usado en el Diagnóstico *In Vitro*.
- La sustitución de componentes diferentes de los incluidos en el sistema puede generar resultados inconsistentes. Todos los controles pertenecen a un lote específico.
- La adaptación de este ensayo para su uso en procesadores automáticos u otros dispositivos, totalmente o en parte, puede producir diferencias en los resultados en comparación con el procedimiento manual. Es responsabilidad de cada laboratorio de validar sus procedimiento automatizado y comprobar que produce resultados dentro de los límites aceptables.
- Diversos factores influyen en la eficacia del análisis. Algunos de ellos son la temperatura de inicio de los reactivos, la temperatura ambiental, la exactitud y reproducibilidad de la técnica de pipeteo, la reproducibilidad de la técnica de mezcla, el analizador de flujo Luminex™ 100 o 200 utilizado para determinar los resultados y la duración de los tiempos de incubación durante el análisis. Es necesario prestar mucha atención a la coherencia para conseguir resultados exactos y reproducibles.
- Se recomienda seguir estrictamente el protocolo.
- El sellado incompleto de la bolsa “zip-lock” que contenga tiras sin usar y desecante provocará la degradación del antígeno que se apreciará en un empeoramiento de la precisión de resultados.
- Después de varios usos de un mismo frasco de conjugado fluorescente en un determinado periodo, se puede observar una fluorescencia baja inaceptable. Para evitar que esto suceda, es importante controlar todos los procedimientos de manipulación del conjugado fluorescente recomendados.
- Una limpieza o un aclarado inadecuados del equipo o de los instrumentos, puede provocar la contaminación química del conjugado fluorescente. Residuos de productos químicos de laboratorio habituales como formalina, lejía, etanol o detergente, provocarán la degradación del conjugado fluorescente con el tiempo. Después de utilizar productos químicos de limpieza o desinfectantes, será preciso aclarar todo el equipo o los instrumentos con agua destilada o desionizada.

## Condiciones de Almacenaje

- Guardar todos los reactivos del kit en nevera a 2-8°C. No congelar. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si son almacenados y manipulados correctamente.
- Las tiras sin utilizar deben volverse a guardar en la bolsa de aluminio que contiene desecantes cerrándola herméticamente y almacenándola a 2-8°C.

## Recolección de Muestras

Este kit requiere suero como muestra. La adición de azida u otros conservantes a las muestras puede afectar adversamente los resultados. No deben utilizarse muestras contaminadas, tratadas por calor o que contengan partículas visibles. No utilice muestras lipémicas o hemolizadas.

Tras la recolección de las muestras de sangre, el suero debe ser separado del coágulo. El documento CLSI (antes NCCLS) H18-A3 recomienda las siguientes condiciones de almacenaje para muestras: 1) Guardar las muestras a temperatura ambiente no más de 8 horas. 2) Si el ensayo no se va completar en 8 horas, refrigerar la muestra a 2-8°C. 3) Si el ensayo no se va completar entre 48 horas, o para enviar las muestras, congelar a -20°C o a temperatura inferior. Una vez descongeladas las muestras deben agitarse bien antes de utilizarse.

## Procedimiento

### Materiales Suministrados

- Microplaca Celiac IgA Profile (12-1 x 8 pocillos) (plata estampada en color) con soporte
- 1.2 mL control prediluido, lista para su uso QUANTA Plex™ Negative Control
- 1.2mL control prediluido, lista para su uso Celiac IgA Calibrator
- 1.2mL control prediluido, lista para su uso Celiac IgA Positive Control
- 50mL Diluyente de muestra HRP (también utilizado como control sin suero)
- Conjugado de IgA (cabra) marcado con fluorescencia, contra IgA humana

## Material necesario no incluido

Micropipetas para 5 y 500µL

Puntas desechables para micropipeta

Tubos para dilución de muestras, 1-4mL

Agua destilada o desionizada

Fluido envolvente para el analizador de flujo Luminex™ 100 o 200

Analizador de flujo Luminex™ 100 o 200

Pipeta electrónica de 8 canales para administrar 5, 30, 45, 50 y 60 µL o pipeteador o diluctor automático

## Utilización del analizador de flujo Luminex™ 100 o 200

1. Si se desean instrucciones detalladas sobre el funcionamiento del analizador de flujo Luminex™ y la versión del sistema integrado (SI) de Luminex™ 100 o 200 o el programa de ordenador 2.0 o más arriba, consultar el manual del usuario que se proporciona con Luminex™. Para más información y para tratar los problemas surgidos con esta prueba, póngase en contacto con el servicio técnico de INOVA Diagnostics, Inc., en la dirección o el número de teléfono que encontrará en la última página del prospecto de instrucciones. A continuación se detallan unas breves instrucciones de uso del analizador de flujo Luminex™ 100 o 200.
2. Calibrar el Luminex™ utilizando las perlas de control y calibrado suministradas por Luminex Corporation, por lo menos una vez al mes y verificar que el calibrado haya sido satisfactorio. Además, será necesario calibrar el Luminex™ si la temperatura de calibrado delta es superior a 3 grados, si los controles de la prueba están fuera de los límites o siempre que sea necesario.
3. Una vez conectado, el Luminex™ tarda 30 minutos en calentarse. Una vez transcurrido el periodo de calentamiento, realizar las operaciones de inicio, limpieza con alcohol y lavado recomendadas por el fabricante.
4. Utiliza un programa de versión SI, cargar la plantilla "QP Celiac IgA Profile" y asegurarse de que toda la información del lote sea correcta. Si fuera necesario, actualizar la información del lote. Los parámetros del modelo son los siguientes: Los colores de las perlas son h-tTG = 27, DGP = 28, anti-IgA = 29, IgA = 30. Los eventos por lecho son 50, el tamaño de la muestra es 50µL, la velocidad de flujo es 60µL/minuto (rápido), y la entrada es 7.500 y 17.000. Se utilizan las medianas de los valores para la mediana de la intensidad de la fluorescencia (MIF).
5. Introducir los nombres de la muestra manualmente o tecleando en "Load Pa List".
6. Cargar la placa en la plataforma XY del aparato Luminex™.
7. Encender el Luminex™ dando al botón "Start Plate".
8. Al terminar el día, y antes de apagar el aparato, realizar todas las maniobras de saneamiento y limpieza.

## Metodología: Antes de empezar

1. Para recibir información sobre la programación del equipo automático, póngase en contacto con el servicio técnico de INOVA Diagnostics, Inc.
2. Encender el analizador de flujo Luminex™ 100 o 200, asegurarse de que se deja calentar y realizar las operaciones de mantenimiento diarias, como se ha descrito anteriormente. Si fuera necesario, calibrar el instrumento y confirmar que la calibración ha sido satisfactoria.
3. Dejar todos los reactivos y muestras de los pacientes a temperatura ambiente (20-26°C) y mezclarlas bien.
4. Si el conjugado fluorescente de IgA antihumano no se ha reconstituido, añadir 6 mL de QUANTA Plex™ Conjugate Diluent al vial ámbar que contiene el polvo liofilizado y girar el envase durante 30 segundos para disolver el contenido. El conjugado fluorescente reconstituido es estable durante 3 meses a 2-8°C. **No congelar.**
5. Asegúrese de que el recipiente del fluido envolvente del sistema Luminex™ esté lleno de fluido envolvente suministrado por Luminex Corporation y que la botella de desechos esté vacía.
6. Preparar una dilución al 1:101 de cada muestra de paciente añadiendo 5 µL de cada suero a 500 µL del diluyente de muestra HRP y después introducir en un agitador vorticial hasta mezclar completamente la solución. Las muestras diluidas se deben utilizar en las 8 horas siguientes a su preparación. **NO DILUIR QUANTA Plex™ Negative Control, le Celiac IgA Calibrator y le Positive Control.**
7. Para la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos frente a IgA anti h-tTG y anti-DGP utilizando unidades arbitrarias y detectar deficiencia selectiva de IgA, requiere dos pocillos para Calibrator y un pocillo para cada uno de los controles (negativo, positivo y sin suero). Se recomienda analizar las muestras de una en una.

## Procedimiento de Ensayo

1. **Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20-26°C) antes de comenzar la prueba.** Colocar el número necesario de micropocillos/tiras en el soporte. **Devolver inmediatamente las tiras no utilizadas a la bolsa que contiene los secantes y cerrar herméticamente para reducir al mínimo la exposición al vapor de agua y a la luz.**
2. Añada 45 µL de diluyente de muestra HRP a cada pocillo que contendrá una **muestra de paciente (y el control sin suero)**. **No añada** diluyente de muestra HRP a los primeros cuatro pocillos, pues estos contendrán QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Calibrator (por duplicado) y Celiac IgA Positive Control. **No** añadir las muestras del paciente diluidas a los micropocillos en este momento.
3. Al añadir los controles, las muestras y los conjugados a los micropocillos, mantener una de las siguientes secuencias temporales. Como las muestras se leen de forma sucesiva a una velocidad aproximada de 1 muestra cada 19 segundos (o una tira de 8 micropocillos en unos dos minutos y medio) con el Luminex™, las muestras de los pacientes y también los conjugados se deben añadir a los micropocillos a esta velocidad para reducir al mínimo cualquier variación retrógrada del análisis. Si los controles, las muestras o los conjugados se añaden de uno en uno, escalonar el momento de añadir cada muestra al siguiente micropocillo en 19 segundos. Si los controles, muestras o conjugados se añaden a las tiras de 8 en 8, se escalonará el procedimiento añadiendo 8 muestras cada 2 minutos y medio. Con ambos esquemas temporales, se tardarán unos 30 minutos en añadir las muestras a las 12 tiras de una microplaca completa y se reducirá al mínimo la variación retrógrada del análisis.
4. Mezcle con el agitador vorticial y, a continuación, añada 50 µL de cada uno de los siguientes controles

**prediluidos:** QUANTA Plex™ Negative Control al primer pocillo, Celiac IgA Calibrator a los pocillos segundo y tercero, y Celiac IgA Positive Control al cuarto pocillo. Cuando las muestras se añaden y se mezclan con las perlas manualmente, se debe utilizar una pipeta electrónica. Para añadir los controles utilizar una de las secuencias temporales descritas en el paso 3. **Pipetee enérgicamente al menos 30 µL de QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Calibrator y Celiac IgA Positive Control arriba y abajo cuatro veces para mezclar los lechos y los controles en cada pocillo.** El tiempo de incubación de 30 minutos comienza después de añadir el QUANTA Plex™ Negative Control al **primer** micropocillo.

5. Inmediatamente, añada 5 µL de diluyente de muestra HRP al quinto pocillo (el control sin suero) y 5 µL de suero diluido del paciente a los pocillos restante apropiados. (nota: se consigue así una dilución final de 1:1010 del suero del paciente). Mantener la misma secuencia temporal utilizada en el paso 4. **Mezclar la muestra del paciente diluida y el diluyente de muestra en el micropocillo pipeteando enérgicamente arriba y abajo por lo menos 30 µL del contenido de los micropocillos cuatro veces.** Continuar programando la incubación durante 30 minutos desde el momento en que se añadió el QUANTA Plex™ Negative Control. Colocar las tiras de micropocillos a temperatura ambiente, sobre una superficie lisa y evitando la exposición directa a la luz del sol durante el resto del periodo de incubación.
6. Al final del primer periodo de incubación, añadir 50 µL del conjugado fluorescente a cada micropocillo y **pipetear enérgicamente por lo menos 60 µL del contenido del micropocillo arriba y abajo cuatro veces.** Mantener la misma secuencia temporal para añadir el conjugado que se utilizó en los pasos 4 y 5. La extracción del conjugado de su frasco se realizará en condiciones de asepsia estándar y siguiendo las buenas técnicas de laboratorio. Retirar del frasco sólo la cantidad de conjugado necesaria para el análisis. **PARA EVITAR LA POSIBLE CONTAMINACIÓN MICROBIANA, QUÍMICA O DE AMBAS, NO INTRODUCIR NUNCA DE NUEVO EN EL FRASCO EL CONJUGADO NO UTILIZADO.** Incubar las tiras de micropocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente, sobre una superficie lisa y evitando la exposición directa a la luz solar. El tiempo de incubación comienza después de añadir el **primer** conjugado.
7. Una hora después de terminar la incubación del conjugado fluorescente durante 30 minutos, leer la placa del Celiac IgA Profile en el Luminex™ como se ha explicado en la sección anterior, "Utilización del analizador de flujo Luminex™ 100 or 200."

## Control de Calidad

1. Los análisis Celiac IgA Calibrator (por duplicado), Celiac IgA Positive Control y QUANTA Plex™ Negative Control y el control sin suero deben realizarse en cada lote de muestras para garantizar que todos los reactivos y procedimientos han actuado correctamente.
2. Recuerde que los análisis Celiac IgA Calibrator, Celiac IgA Positive Control y QUANTA Plex™ Negative Control, dado que son prediluidos, no tienen en cuenta los métodos de procedimiento asociados con las diluciones de las muestras.
3. Pueden añadirse controles adicionales según las directivas o requisitos del laboratorio. Pueden prepararse controles válidos haciendo alícuotas de un "pool" de suero humano que debe almacenarse a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .
4. Para considerar válidos los resultados del análisis, deben cumplirse todos los criterios indicados a continuación. Si alguno no se cumple, el análisis deberá considerarse no válido y la prueba deberá repetirse. El valor en unidades Luminex (UL) de Calibrator para cada antígeno está indicado en la etiqueta de la caja de cada kit. Consulte la fórmula del apartado "Cálculo de los resultados" para determinar las UL de QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Positive Control y de los controle sin suero.
  - a. El valor de QUANTA Plex™ Negative Control debe ser  $< 20$  UL para h-tTG y DGP. Debe estar comprendido entre 10 y 40 UL para los lechos de control IgA y anti-IgA.
  - b. El valor de Celiac IgA Positive Control debe ser  $\geq 30$  UL para h-tTG y entre 30 UL y entre 30 UL y 130 UL para DGP. Debe estar comprendido entre 10 y 40 UL para los lechos de control IgA y anti-IgA.
  - c. El valor del Control Sin Suero debe ser  $< 20$  UL para h-tTG y DGP. Para el lecho anti-IgA, el valor debe ser  $< 5.0$  UL, y para el lecho IgA debe estar entre 10 y 40 UL.
  - d. La proporción anti-IgA/IgA en UL debe ser  $> 0.50$  para QUANTA Plex™ Negative Control y Celiac IgA Positive Control y  $< 0.50$  para el control sin suero.
  - e. Los lechos de control anti-IgA e IgA sirven para detectar una deficiencia selectiva de IgA y para garantizar la detección de falsos negativos debidos a errores de operación. Si uno de los dos lechos de control presenta un resultado inferior a 5 UL en un paciente cualquiera, aparecerá el resultado "Volver a analizar" en el sistema IS 2.0 o posterior.
    - i. Existe la posibilidad de que el paciente tenga deficiencia selectiva de IgA si los resultados de anti-h-tTG y DGP son negativos (es decir, inferiores a 20 UL) y el lecho anti-IgA es inferior a 5 UL, mientras que al mismo tiempo el valor del lecho de control IgA sea superior a 20 UL, lo que indica una proporción anti-IgA/IgA en UL  $< 0.5$ . Tenga en cuenta que puede producirse este mismo resultado si no se ha añadido suero al pocillo.
    - ii. Si tanto el lecho anti-IgA como el lecho IgA son inferiores a 5.0 UL, existe la posibilidad de que no se haya añadido conjugado al pocillo. El paciente debe analizarse de nuevo para confirmar el resultado negativo.
5. Los QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Calibrator y Positive Control y Control Sin Suero fuerte están pensados para monitorizar problemas de reactivo de magnitud substancial. El usuario puede referirse al documento CLSI (antes NCCLS) [National Committee of Clinical Laboratory Standards] C24-A3 para una guía adicional acerca de buenas prácticas de laboratorio.

## Cálculo de Resultados

Primero se determinan las MIF de todos los controles y muestras de los pacientes para cada antígeno, así como los dos lechos de control. La reactividad en UL de una determinada muestra para cada tipo de antígeno se puede calcular a partir de la siguiente fórmula. Divida la MIF de la muestra por la MIF de Celiac IgA Calibrator para ese antígeno y multiplique el resultado por el número de ULs asignadas a Celiac IgA Calibrator para ese antígeno. Las UL valor de Calibrator para cada antígeno están indicadas en la etiqueta de la caja de cada lote de kits. El ejemplo siguiente permite determinar la reactividad anti-h-tTG. Utilice la fórmula equivalente para el lecho DGP y los dos lechos de control.

$$\text{Valor de la muestra (en UL)} = \frac{\text{MIF de la muestra para el h-tTG}}{\text{MIF h-tTG Calibrator}} \times \text{valor h-tTG Calibrator (en UL)}$$

La reactividad del anticuerpo IgA para htTG y DGP puede entonces clasificarse según la tabla siguiente.

|                | UL    |
|----------------|-------|
| Negativa       | <20   |
| Positiva débil | 20-30 |
| Positiva       | >30   |

La reactividad está relacionada de forma no lineal con la cantidad de autoanticuerpos presentes en la perla. Aunque los aumentos y descensos de las concentraciones de anticuerpos del paciente quedarán reflejadas en el aumento o descenso correspondiente de la reactividad fluorescente, la variación no es proporcional (es decir, que el aumento al doble de la concentración de anticuerpos no doblará la reactividad). Además, la cantidad de IgA total en el suero de un paciente afecta a la MIF medida. Si fuera necesaria una cuantificación más exacta de los autoanticuerpos del paciente, se analizará la muestra en una prueba cuantitativa.

## Interpretación de los Resultados

El QUANTA Plex Análisis es muy sensible a la técnica y permite detectar pequeñas diferencias en las poblaciones de pacientes. Cada laboratorio debe establecer sus propios límites normales basados en sus propias técnicas, controles, aparatos y población de pacientes, de acuerdo con sus propios procedimientos establecidos. Se recomienda que los resultados comunicados por el laboratorio incluyan la siguiente aclaración: "Los siguientes resultados se obtuvieron con QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile de INOVA. Los valores obtenidos con métodos de análisis de diferentes fabricantes no se pueden utilizar de manera indistinta. La magnitud de los niveles de autoanticuerpos IgA comunicados no siempre se puede correlacionar con un valor de criterio de valoración."

Para determinar si el paciente tiene una cantidad suficiente o insuficiente de IgA en su suero, divida las UL del lecho anti-IgA por las UL del lecho IgA. Si el resultado es inferior a 0.5 y el paciente es negativo para anti-h-tTG y anti-DGP, la muestra debe analizarse de nuevo para confirmar el resultado. Si se confirma que el paciente tiene deficiencia de IgA, la muestra debe someterse a los análisis de IgG anti-h-tTG e IgG anti-DGP. Si se necesita confirmación de la deficiencia de IgA, la muestra debe analizarse mediante una prueba de IgA cuantitativa.

## Limitaciones del Procedimiento

1. La presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobulinas en la muestra del paciente puede producir un aumento de uniones inespecíficas y causar falsos positivos en este ensayo.
2. No todos los pacientes de enfermedad celíaca y Dermatitis Herpetiforme son positivos para h-tTG o DGP IgA anticuerpos.
3. Los resultados de este ensayo deben utilizarse conjuntamente con hallazgos clínicos y otras pruebas serológicas.
4. No agitar adecuadamente los controles y/o las muestras prediluidas con las bolitas fijadas en la microplaca puede generar unos valores de coeficiente de variación superiores a los detectados típicamente en los ensayos ELISA.
5. Tras la incubación de media hora con el conjugado fluorescente, se produce aproximadamente un 10% de aumento en fluorescencia para cada media hora adicional de incubación.
6. La funcionalidad del ensayo no ha sido establecida para matrices diferentes del suero.
7. Si no se realiza la adición de reactivos de una manera consistente en tiempos puede ocurrir un aumento de la variación entre muestras iniciales y finales.

## Valores Esperados

La capacidad del análisis QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile análisis para detectar anticuerpos frente a anti-h-tTG y anti-DGP IgA se evaluaron comparando con pruebas ELISA ya comercializadas por INOVA Diagnostics, Inc. Los resultados de los ELISA y de cada uno de los análisis QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile se han considerado positivos si la muestra del paciente ha sido de 20 o más UL o unidades ELISA (UE), y negativos si ha sido inferior a 20 UL o UE.

### Rango Normal

278 muestras de donantes de sangre normales se analizaron con la prueba QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile. 277 muestras normales (99.6%) fueron negativas en la parte del h-tTG del QUANTA Plex™. La muestra más alta tuvo un valor de 29 UL. El valor medio fue de 3.2 UL con una desviación estándar (DE) de 1.5. El límite estuvo en 11 DE por encima de la media. Todas las 278 muestras normales salvo 3 (98.9%) han sido negativas en la fracción de DGP del análisis QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile. La muestra más alta ha tenido un valor de 88 UL. Iguales muestras también ha sido positiva en el ELISA DGP. Sin incluir la muestra con doble positivo, el valor medio ha sido de 4.4 UL, con una desviación estándar de 5.8. El límite estuvo en 2.7 DE por encima de la media

## Sensibilidad y Especificidad Clínicas

Para determinar la sensibilidad clínica de los ensayos de autoanticuerpos, se han analizado 29 muestras de pacientes con enfermedad celíaca activa y sin deficiencia de IgA mediante QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile y los ELISA correspondientes. La sensibilidad clínica de la IgA anti-h-tTG ha sido del 93% (intervalo de confianza del 95%; 77-99%). La sensibilidad clínica de la IgA anti-DGP ha sido del 73% (intervalo de confianza del 95%; 53-92%). Para determinar la especificidad clínica, se han analizado 494 pacientes que no habían sido diagnosticados de enfermedad celíaca. Este grupo incluye donantes de sangre normales, pacientes con enfermedades reumáticas, hepáticas, gastrointestinales e infecciosas. La especificidad clínica del anticuerpo anti-htTG ha sido del 98% (intervalo de confianza del 95%; 96-99%). La especificidad clínica del anticuerpo anti-DGP ha sido también del 98% (intervalo de confianza del 95%;96-99%).

Sensibilidad y especificidad clínicas de las pruebas de anticuerpos IgA anti-h-tTG y anti-DGP en el análisis Celiac IgA Profile

| h-tTG IgA |          | Diagnosis  |  |       |
|-----------|----------|--|--|-------|
|           |          | Positivo (Enfermedad celíaca con suficiente IgA y sin dieta libre de gluten) | Negativo (Controles no diagnosticados de enfermedad celíaca) | Todos |
| Luminex   | Positivo | 27   | 11**   | 38    |
|           | Negativo | 2*   | 483  | 485   |
|           | Todos    | 29   | 494  | 523   |

\*Ambas muestras han sido negativas en el ELISA tTG. \*\* Diez de éstos son positivos cerca ELISA  
 Sensibilidad:  $27/(27+2) \times 100 = 93.1\%$  ([CI] 77-99%) Especificidad:  $483/(11+483) \times 100 = 97.8\%$  ([CI] 96-99%)

| DGP IgA |          | Diagnosis   |  |       |
|---------|----------|---|--|-------|
|         |          | Positivo(Enfermedad celíaca con suficiente IgA y sin dieta libre de gluten) | Negativo (Controles no diagnosticados de enfermedad celíaca) | Todos |
| Luminex | Positivo | 18  | 12**   | 30    |
|         | Negativo | 11*   | 482  | 493   |
|         | Todos    | 29  | 494  | 523   |

\* Diez de estas muestras son negativas cerca ELISA. \*\* Diez de éstos son positivos cerca ELISA.  
 Sensibilidad:  $18/(18+11) \times 100 = 62.1\%$  ([CI] 53-92%). Especificidad:  $482/(12+482) \times 100 = 97.6\%$  ([CI] 96-99%)

### Comparación entre QUANTA Plex™ y las pruebas ELISA

Los porcentajes relativos de concordancia positiva, negativa y total (con intervalos de confianza del 95%) de los análisis de autoanticuerpos QUANTA Plex™ se han calculado para todas las muestras analizadas y se indican, comparados con los del ELISA, en las tablas siguientes.

| h-tTG IgA |          | ELISA    |          |       |
|-----------|----------|----------|----------|-------|
|           |          | Positivo | Negativo | Todos |
| Luminex   | Positivo | 174      | 2        | 176   |
|           | Negativo | 21       | 757      | 778   |
|           | Todos    | 195      | 759      | 954   |

Porcentaje de concordancia positivo::  $174/(174+21) \times 100 = 89.2\%$  (84-93%)  
 Porcentaje de concordancia negativo:  $757/(2+757) \times 100 = 99.7\%$  (99-100%)  
 Todos Porcentaje de concordancia:  $(174+757)/(174+2+21+757) \times 100 = 97.6\%$

| DGP IgA |          | ELISA    |          |       |
|---------|----------|----------|----------|-------|
|         |          | Positivo | Negativo | Total |
| Luminex | Positivo | 136      | 4        | 140   |
|         | Negativo | 31       | 783      | 814   |
|         | Todos    | 167      | 787      | 954   |

Porcentaje de concordancia positivo:  $136/(136+31) \times 100 = 81.4\%$  (75-87%)  
 Porcentaje de concordancia negativo:  $783/(4+783) \times 100 = 99.5\%$  (99-100%)  
 Todos Porcentaje de concordancia:  $(136+783)/(136+4+31+783) \times 100 = 96.3\%$

### Detección de la deficiencia de IgA

Los sueros de 5 pacientes con deficiencia selectiva de IgA probada se han analizado mediante el ensayo Celiac IgA Profile, al igual que otros 949 pacientes (tal como se ha explicado anteriormente). Estos 5 pacientes, más 21 adicionales, han presentado una proporción anti-IgA/IgA inferior a 0.5 UL, por lo que no tenían suficiente IgA para el ensayo Celiac IgA Profile.

Sensibilidad y especificidad para la proporción anti-IgA/ IgA en UL en el QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile

| Positivo Controls N=5 | QUANTA Plex™ Cociente >0.5 | QUANTA Plex™ Cociente <0.5 | Clínicas Sensibilidad QUANTA Plex™ (95% CI) | Todos Negativo Controls N=949 | QUANTA Plex™ Cociente >0.5 | QUANTA Plex™ Cociente <0.5 | Clínicas Especificidad QUANTA Plex™ (95% CI) |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|---|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|--|
| Anti-IgA/IgA Cociente | 0                          | 5                          | 100% (82-100%)**                            | Anti-IgA/IgA Cociente         | 928                        | 21*                        | 99% (98-100%)**                              |

\*Según parámetros serológicos, 12 resultaron ser pacientes con Enfermedad Celíaca y deficiencia de IgA, 7 fueron controles muy diluidos y 1 presentó niveles totales de IgA bajos en suero. De acuerdo con una probabilidad de 1 entre 500 IgA deficiencia, se esperaba que otras 2 muestras fueran positivas aleatoriamente.

\*\*Cálculos basados en 18 sueros con deficiencia esperada.

## Precisión y Reproducibilidad

**Variación intra-análisis e inter-análisis.** Para determinar la variación intraensayo, se han analizado 18 muestras 10 veces cada una en un análisis simple. La variación en 3-5 muestras representativas para cada análisis se indica en la tabla siguiente. Para determinar la variación interensayo, se han analizado 20 muestras en 6 ciclos de análisis realizados en 6 días diferentes. La variación en 3-5 muestras representativas para cada análisis está indicada en la tabla siguiente.

| Variación intraensayo |             |        | Variación interensayo |             |        |
|-----------------------|-------------|--------|-----------------------|-------------|--------|
| Antígeno              | Promedio UL | % C.V. | Antígeno              | Promedio UL | % 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%     |

## Referencias

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. Chorzeliski 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.

### Fabricante:

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

### Representante Autorizado:

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

Technical Service  
628940

888-545-9495  
July 2007  
Revision ESP0

