


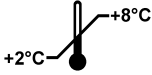




REF 41420 	ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA		
INSTRUCCIONES DE USO		  100	

USO PREVISTO

El análisis *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* es un inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) para la determinación cuantitativa, mediante el instrumento *ZENIT RA Analyser*, de los anticuerpos específicos de clase IgA contra los péptidos deamidados de la gliadina en muestras de suero o plasma humano (EDTA, heparina).

Este ensayo se utiliza como auxilio diagnóstico en la evaluación de la enteropatía por gluten (enfermedad celíaca) y de la dermatitis herpetiforme de Dühring.

ATENCIÓN: una decisión médica, sea cual fuere, no puede basarse únicamente en el resultado de este análisis, sino que debe fundarse en la evaluación del conjunto de datos clínicos y de laboratorio disponibles.

IMPORTANCIA CLÍNICA

La enfermedad celíaca (EC) o intolerancia alimenticia al gluten es una enfermedad autoinmune que se manifiesta en individuos genéticamente predispuestos y se dispara por una dieta rica en cereales como trigo, cebada y centeno¹.

La predisposición genética se relaciona principalmente con algunos genes del sistema HLA, en especial con los genotipos DQ2 y DQ8 que están presentes en el 95-98 % de las personas celíacas, pero que también se encuentran, con un porcentaje del 20 al 30 %, en la población general^{2,3}. La prevalencia de la EC en la población de raza blanca es aproximadamente de 1:100; por tanto, un individuo sobre 30 portador de los genes codificados por los alelos HLA DQ2/DQ8 desarrolla la EC^{4,5}.

La gliadina es la porción proteica del gluten, la que puede disparar el proceso autoinmune; el contacto entre los péptidos de la gliadina y las células del sistema inmunitario de la submucosa intestinal puede producirse como consecuencia de una alteración de la permeabilidad intestinal inducida por la zonulina excretada por los enterocitos. La gliadina es un excelente sustrato para la enzima transglutaminasa tisular (t-TG); las acciones de deamidación y transamidación de los péptidos gliadínicos por parte de la t-TG modifican la carga de conjunto de la molécula, permitiendo la unión con los antígenos HLA DQ2-DQ8, manifestados por las células que presentan el antígeno, dando lugar a la formación de un complejo HLA DQ2-DQ8/ péptidos deamidados/t-TG. Este complejo es reconocido por los linfocitos T CD4⁶, que disparan el proceso inmunológico activando los linfocitos T efectoras, la producción de citoquinas, la proliferación de linfocitos B y síntesis de anticuerpos anti-t-T-G⁷ y anti-péptidos de la gliadina^{8,9}. El resultado es un proceso inflamatorio

con diferentes cuadros histológicos que llegan hasta lesiones (reversibles) de la mucosa intestinal tales como la atrofia de las vellosidades.

Los análisis serológicos asumen un papel crucial en el diagnóstico de la EC y en el control del cumplimiento del tratamiento, caracterizado por una dieta carente de gluten. Tal como indican las directivas internacionales, el primer paso en el diagnóstico de EC es efectuar un análisis en busca de autoanticuerpos anti-t-TG de clase IgA, que se asociará al análisis de IgA totales; se aconseja esta práctica porque los individuos con déficit total de IgA ($IgA \leq 5 \text{ mg/dl}$)¹⁰ presentan un riesgo relativo de desarrollar la EC diez veces superior al de la población normal¹¹.

La elevada sensibilidad y especificidad de los autoanticuerpos anti-transglutaminasa IgA, respectivamente del 96-98 % y del 93-95 %¹², asociada a la objetividad y a la completa automatización del análisis, hacen que la búsqueda de los anti-t-TG IgA haya reemplazado en los últimos años las otras pesquisas serológicas para EC¹³. La búsqueda de los antiendomisiales (EMA) IgA reviste siempre un papel de confirmación importante en todos los sueros anti-t-TG IgA positivos, precisamente por la altísima especificidad (99-100 %) de los EMA, si bien siguen siendo relevantes los aspectos interpretativos de este análisis. En los déficit selectivos de IgA es forzoso realizar los anti-t-TG IgG en asociación con los anticuerpos anti-péptidos deamidados de la gliadina (a-DGP) IgG.

Recientemente se ha demostrado que los individuos celíacos sintetizan anticuerpos específicos dirigidos hacia algunos péptidos deamidados de la gliadina. Los anticuerpos anti-DGP resultan muy específicos en la identificación de los individuos que padecen intolerancia al gluten, contrariamente a los anticuerpos anti-gliadina en general, encontrados en individuos sanos o con otras patologías del tracto entérico y por consiguiente con especificidad reducida¹⁴.

Los anticuerpos anti-DGP de clase IgA presentan sensibilidad del 86-95 % y especificidad del 91-95 %, mientras que los de clase IgG tienen sensibilidad del 84-98 % y especificidad del 95-98 %; estas características aconsejan su uso en sujetos pediátricos¹⁵, en los cuales la síntesis de dichos anticuerpos parece preceder a la de los anti-transglutaminasa IgA. Además, el empleo de los análisis de anticuerpos anti-DGP, tanto de clase IgA como IgG, se aconseja independientemente de la edad en todos aquellos individuos con síntomas que sugieran una EC en los que los anticuerpos t-TG o EMA estén ausentes o presenten títulos bajos¹⁶.

En los pacientes celíacos que siguen una dieta carente de gluten se asiste a un paulatino decremento de los anticuerpos anti-t-TG y anti-gliadina. La disminución del título de los anticuerpos de clase IgG es más lenta respecto a la de los anticuerpos de clase IgA.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* para la determinación cuantitativa de las IgA específicas anti-péptidos deamidados de la gliadina utiliza un método inmunológico indirecto de dos fases, basado en el principio de la quimioluminiscencia.

El antígeno específico se utiliza para recubrir las partículas magnéticas (fase sólida); un anticuerpo anti-IgA humana se marca con un derivado del éster de acridinio (conjugado).

Durante la primera incubación, los anticuerpos específicos presentes en la muestra, en los calibradores o en los controles se ligan a la fase sólida.

Durante la segunda incubación, el conjugado reacciona con los anticuerpos anti-gliadina IgA capturados en la fase sólida.

Después de cada incubación, el material no ligado a la fase sólida se elimina por aspiración y subsiguiente lavado.

La cantidad de conjugado marcado que queda ligado a la fase sólida se evalúa activando la reacción de quimioluminiscencia y midiendo la señal luminosa. La señal generada, expresada en unidades relativas de luz (RLU, Relative Light Unit), indica la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra, en los calibradores y los controles.

AUTOMATIZACIÓN

El instrumento *ZENIT RA Analyser* efectúa automáticamente todas las operaciones previstas en el protocolo de análisis: agregado en el recipiente de reacción de las muestras, calibradores, controles, partículas magnéticas, conjugado y soluciones de activación de la quimioluminiscencia; separación magnética y lavado de las partículas; medición de la luz emitida.

El sistema calcula los resultados del análisis de muestras y controles mediante curva de calibración memorizada e imprime un informe que comprende todas las informaciones correspondientes al análisis y al paciente.

MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales y reactivos suministrados

REAG	1	MP	2,5 ml
------	---	----	--------

Partículas magnéticas recubiertas de antígeno gliadina (péptidos deamidados específicos) en tampón fosfato que contiene proteínas estabilizadoras, tensoactivo, Pro-Clin 300 y azida de sodio (< 0,1 %) como conservantes.

REAG	2	CONJ	25 ml
------	---	------	-------

Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgA humana marcado con un derivado del éster de acridinio (conjugado) en tampón fosfato que contiene proteínas estabilizadoras y azida de sodio (< 0,1 %) como conservante.

REAG	3	DIL	25 ml
------	---	-----	-------

Solución diluyente de muestras: tampón fosfato que contiene seroalbúmina bovina, un tensoactivo, un colorante azul inerte, Pro-Clin 300 y gentamicina SO₄ como conservantes.

REAG	4	CAL A	1,6 ml
------	---	-------	--------

Suero humano con baja concentración de anticuerpos anti-gliadina IgA en tampón fosfato que contiene seroalbúmina bovina, un tensoactivo, un colorante azul inerte, Pro-Clin 300 y gentamicina SO₄ como conservantes.

REAG	5	CAL B	1,6 ml
------	---	-------	--------

Suero humano con alta concentración de anticuerpos anti-gliadina IgA en tampón fosfato que contiene seroalbúmina bovina, un tensoactivo, un colorante azul inerte, Pro-Clin 300 y gentamicina SO₄ como conservantes.

Todos los reactivos están listos para usar.

Los reactivos 1, 2 y 3 están reunidos en un único conjunto que constituye el cartucho de reactivos.

Las concentraciones de los calibradores se expresan en UA/ml (unidades arbitrarias) y están calibradas frente a un estándar de referencia interno. Los valores de las concentraciones específicos para cada lote de producto están registrados en el disco de datos incluido en el kit.

DISCO DE
DATOS

Mini-DVD con las informaciones relacionadas con todos los productos de la Línea ZENIT RA (reactivos, calibradores, sueros de control, reactivos auxiliares), actualizados hasta el último lote de producción; están excluidos los productos caducados a la fecha de redacción del nuevo disco de datos.

Es suficiente conservar el disco de datos con el número de lote más alto para mantener actualizadas las informaciones necesarias para el funcionamiento correcto del sistema.

Materiales y reactivos necesarios no incluidos en el kit

- ZENIT RA Analyzer Cód. nº 41400
- ZENIT RA Cuvette Cube Cód. nº 41402
Paquete de 960 cubetas.
- ZENIT RA System Liquid Cód. nº 41409
1 botella de 0,5 litro de solución 10x.
- ZENIT RA Wash Solution Cód. nº 41407
1 botella de 0,5 litro de solución 20x.
- ZENIT RA Trigger Set Cód. nº 41403
1 frasco de 250 ml de Trigger A (solución de preactivación)
1 frasco de 250 ml de Trigger B (solución de activación)

- ZENIT RA D-SORB Solution Cód. nº 41436
Paquete de 2 botellas de 1 litro de solución lista para usar.
- ZENIT RA Cartridge Checking System Cód. nº 41401
- ZENIT RA Top Cap Set Cód. nº 41566
300 tapones superiores para cerrar los recipientes de calibradores después de usarlos por primera vez.

Otros reactivos aconsejados

ZENIT RA CELIAC CONTROL SET Cód. nº 41452
3 ampollas de 1,5 ml de suero humano negativo y 3 ampollas de 1,5 ml de suero humano positivo a anticuerpos anti-gliadina.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos del kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* deben utilizarse exclusivamente para diagnóstico *in vitro*; no deben utilizarse *in vivo* en seres humanos o animales.

Este producto debe ser utilizado únicamente por profesionales en el pleno respeto de las instrucciones contenidas en el presente documento.

La firma A. Menarini declina toda responsabilidad por pérdidas o perjuicios derivados de un uso que no se atenga a las instrucciones dadas.

Precauciones de seguridad

Este producto contiene material de origen animal y por consiguiente debe ser manipulado como si se tratara de material infeccioso.

Este producto contiene componentes de origen humano. Todo el suero o plasma utilizado ha sido analizado mediante métodos aprobados por la FDA y resultó negativo a la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos anti-HCV, anti-HIV1 y anti-HIV2.

Pese a ello, y dado que ningún método de análisis puede garantizar la total ausencia de agentes patógenos, todo el material de origen humano debe considerarse potencialmente infeccioso y manipulado como tal.

Ante un embalaje dañado con derrame de reactivos, descontaminar el área afectada con una solución diluida de hipoclorito de sodio, no si antes ponerse los elementos de protección individual adecuados (delantal, guantes, gafas).

El material utilizado para limpiar, así como los residuos del embalaje en que se produjo el derrame, se eliminará conforme con las normas nacionales para la eliminación de residuos potencialmente infecciosos.

Algunos reactivos contienen azida de sodio como conservante. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo, cobre y latón de las tuberías formando azidas explosivas; por tanto, se recomienda que los reactivos

o residuos relacionados no se eliminen por el desagüe, sino que se sigan las normas nacionales en materia de eliminación de residuos potencialmente peligrosos.

Precauciones operativas

Para que los resultados obtenidos sean fiables, es necesario atenerse estrictamente a las instrucciones de uso de este documento, y seguir escrupulosamente las indicaciones del manual operativo del instrumento.

Los reactivos del kit deben utilizarse exclusivamente con el sistema *ZENIT RA Analyzer*.

Los componentes del cartucho de reactivos no pueden quitarse del cartucho ni reensamblarse.

No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos contenidos en el kit están listos para usar.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Conservar los reactivos del kit a 2-8 °C, en posición vertical y a oscuras.

En estas condiciones, el cartucho de reactivos y los calibradores sin abrir son estables hasta la fecha de caducidad.

Una vez abierto, el cartucho de reactivos puede utilizarse durante 60 días, siempre que se lo conserve en refrigerador a 2-8 °C o bien dentro de la máquina.

Una vez abiertos, los calibradores pueden utilizarse durante 60 días siempre que se los conserve en refrigerador a 2-8 °C y siempre que la permanencia dentro de la máquina no supere las 6 horas por sesión.

No congelar los reactivos ni los calibradores.

PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El análisis debe efectuarse en muestras humanas de suero o plasma (EDTA - heparina).

No utilizar muestras lipémicas, hemolizadas o turbias.

Si transcurren más de ocho horas desde la extracción antes de efectuar el análisis, separar el suero del coágulo o el plasma de los glóbulos rojos, transfiriéndolos de las probetas primarias de separación con gel a probetas secundarias sin aditivos.

Antes del análisis, las muestras pueden conservarse en refrigerador a 2-8 °C por un máximo de 7 días.

Si el análisis se ha de efectuar después de los 7 días, conservar las muestras congeladas (< - 20 °C).

Evítese congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO OPERATIVO

Para un rendimiento analítico fiable, atenerse escrupulosamente a las instrucciones del manual operativo del instrumento.

Cargar los reactivos

Todos los reactivos del kit están listos para usar.

Antes de introducir el cartucho de reactivos en el sistema, es necesario agitar el recipiente de partículas magnéticas mediante rotación horizontal, de manera que las partículas queden en suspensión. Evítese la formación de espuma durante esta operación.

Utilizando la correspondiente guía, colocar el cartucho de reactivos en la zona de reactivos del instrumento; dejar en agitación por lo menos 30 minutos antes de usar.

Al colocar el cartucho de reactivos, simultáneamente se lee el código de barras identificador. Si la etiqueta del cartucho estuviera dañada, o si la misma no fuera leída, los datos identificadores del cartucho de reactivos se pueden introducir manualmente.

El instrumento mantiene automáticamente en agitación continua las partículas magnéticas. En caso de retirar el cartucho de reactivos del instrumento, conservarlo en posición vertical, a oscuras y a temperatura de 2-8 °C.

Cargar calibradores y controles

Los calibradores y controles ZENIT RA están listos para usar. Dejarlos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Agitar suavemente el contenido, manualmente o mediante vortex, evitando que se forme espuma. No invertir el recipiente y no quitar el tapón perforador de cierre (tapón amarillo para calibradores y tapón verde o azul para controles).

Cuando se usan los calibradores o controles por primera vez, hay que presionar el tapón perforador hacia abajo hasta llegar al tope. De este modo, se perfora la membrana que sella el recipiente y se podrá extraer el líquido que contiene. Si el tapón perforador ha sido presionado correctamente, quedará oculta la banda de color rojo que hay en la parte superior de la etiqueta (Véase la figura 1: recipiente sellado y recipiente perforado).

Si los calibradores o controles ya han sido utilizados, el recipiente tendrá un tapón superior de cierre (tapón blanco) y la banda roja de la etiqueta estará oculta.

En el instrumento se han de cargar únicamente los recipientes sin tapón superior (tapón blanco) y con la banda roja oculta (Véase figura 1: recipiente perforado).

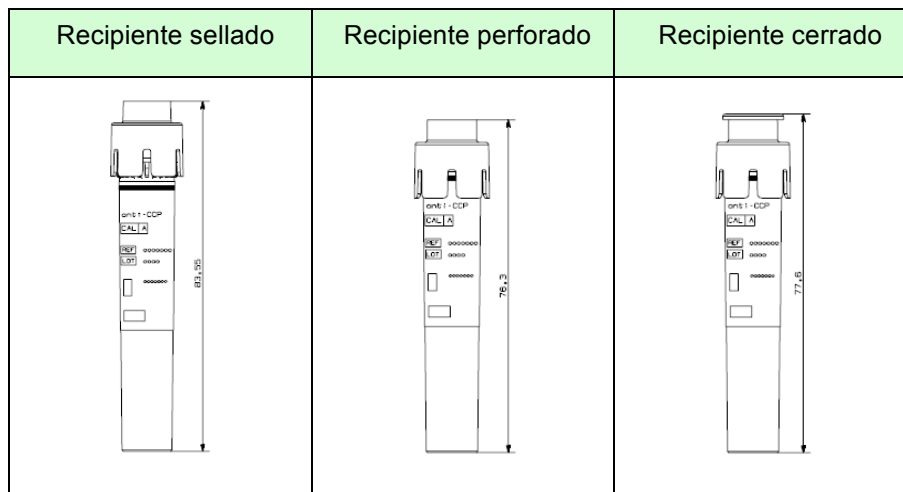
Introducir en el instrumento los calibradores o controles en el área específica del instrumento, después de leer el código de barras. Si la etiqueta estuviera dañada, o si la misma no fuera leída, los datos del código de barras se pueden introducir manualmente.

Los valores de concentración de anticuerpos IgA anti-gliadina de los calibradores o controles están registrados en el disco de datos y se transfieren automáticamente al analizador. Si los mismos no fueran transferidos, se los puede introducir manualmente.

Al terminar la sesión, los recipientes de calibradores y controles se han de cerrar con sus tapones superiores (tapones blancos) y se conservarán a 2-8 °C hasta utilizarlos nuevamente (figura 1: recipiente cerrado).

Los calibradores pueden utilizarse hasta un máximo de cuatro veces.

Figura 1: diseño del recipiente



Cargar las muestras

Identificar las muestras con el lector de código de barras y colocarlas en el instrumento en el recipiente específico. Si faltara el código de barras en la muestra, o si el mismo no fuera leído, los datos identificadores de la muestra se pueden introducir manualmente.

Para cada muestra, seleccionar los parámetros requeridos.

Calibración

El instrumento *ZENIT RA Analyzer* utiliza una curva de calibración memorizada (curva maestra), generada por el fabricante para cada lote de cartuchos de reactivos.

Los parámetros de la curva maestra, juntamente con los valores de concentración de los calibradores, están memorizados en el disco de datos y se transfieren a la base de datos del instrumento.

Los calibradores A y B se utilizan para recalibrar la curva maestra tanto en función del instrumento utilizado como de los reactivos cargados en la máquina.

Para efectuar la recalibración, analizar por triplicado los dos calibradores A y B, y una sola vez los controles. Los valores de concentración obtenidos con los controles permiten validar la nueva calibración.

Una vez aceptada y memorizada la recalibración de la curva maestra, todas las muestras sucesivas se pueden analizar sin volver a calibrar, excepto en los siguientes casos:

- cuando en el instrumento se carga un cartucho de reactivos de un lote nuevo;
- cuando los valores de los controles no están dentro del intervalo de aceptabilidad;
- cuando se efectúa el proceso de mantenimiento del instrumento;
- cuando ha caducado la validez de la curva maestra recalibrada.

La validez de la curva maestra recalibrada para el kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* es de 15 días.

El instrumento gestiona automáticamente la recalibración.

Análisis

Presionar el botón de puesta en marcha.

1. El sistema aspira 100 µl de diluyente de muestras, 20 µl de partículas magnéticas, 100 µl de diluyente de muestras y 6 µl de muestra o control (para los calibradores, el suero positivo se suministra ya diluido con el diluyente de muestra; el volumen aspirado es de 106 µl). Las soluciones y la suspensión aspiradas se dispensan en la cubeta de reacción.
2. La cubeta de reacción se incuba en el rotor a 37 °C durante 10 minutos.
3. Concluida esta fase de incubación, se separan y lavan las partículas magnéticas.
4. En la cubeta se dispensan 200 µl de conjugado.
5. La cubeta de reacción se incuba en el rotor a 37 °C durante 10 minutos.
6. Concluida esta última fase de incubación, se separan y lavan las partículas magnéticas y se traslada la cubeta a la cámara de lectura.
7. La cantidad de conjugado ligado a la fase sólida, expresada en RLU, es directamente proporcional a la concentración de anti-gliadina IgA presente en la muestra.
8. Las respuestas obtenidas se interpolan en la curva de calibración y se convierten en concentraciones.

Las muestras con valores de concentración superiores al límite más alto del intervalo de medición se pueden diluir y volver a analizar. Para calcular el resultado final, el nuevo valor obtenido se multiplica por el factor de dilución utilizado.

CONTROL DE CALIDAD

Para garantizar la validez del análisis, cada día en que se efectúan análisis es necesario medir sueros de control de diferentes niveles de concentración (por lo menos un suero negativo y uno positivo).

Si para la verificación de los resultados del análisis el laboratorio de pertenencia exige un uso más frecuente o un número mayor de controles, síganse los procedimientos de control de calidad establecidos en el laboratorio en cuestión.

Si se utilizan los sueros de control ZENIT RA, los valores medios esperados y los límites de aceptabilidad están indicados en el disco de datos incluido en el paquete de controles.

En caso de que se utilizaran sueros de control diferentes, antes de usarlos es necesario definir los valores esperados con reactivos y sistema ZENIT RA.

Si el valor de los controles no estuviera dentro de los límites de aceptabilidad especificados, los resultados del análisis no son válidos y es necesario volver a analizar las muestras correspondientes.

En este caso, antes de la repetición del análisis se ha de efectuar una nueva calibración.

CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Cálculo de resultados

El sistema calcula automáticamente la concentración de anticuerpos anti-gliadina IgA presente en las muestras examinadas. Los valores se visualizan tanto leyéndolos en pantalla como imprimiéndolos.

Las concentraciones se expresan en UA/ml.

El cálculo de la concentración de analito en la muestra se efectúa a través de la lectura de la respuesta obtenida para cada muestra, en una curva de calibración elaborada mediante un sistema de ajuste logístico de cuatro parámetros (4PL, Y ponderado), periódicamente corregida en función de las respuestas obtenidas en el análisis de los calibradores.

Para informaciones detalladas sobre cómo el sistema calcula los resultados, consúltese el manual operativo del sistema.

Interpretación de resultados

Los límites de mensurabilidad del ensayo *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* son: 0,0 – 200 UA/ml.

Los valores inferiores a 0,0 UA/ml son valores extrapolados y se pueden indicar como "iguales a 0,0 UA/ml".

Los valores superiores a 200 UA/ml se pueden indicar como "superiores a 200 UA/ml", o bien volver a analizar las muestras después de diluirlas convenientemente.

Los resultados de las muestras se pueden interpretar como sigue:

(UA/ml)	Interpretación
< 10	La muestra se considerará negativa a la presencia de anti-gliadina IgA
≥ 10	La muestra se considerará positiva a la presencia de anti-gliadina IgA

Dichos valores son sólo indicativos. Cada laboratorio deberá establecer sus propios límites de referencia.

LIMITACIONES DEL ANÁLISIS

Para formular un diagnóstico, los resultados obtenidos con el kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* y el sistema *ZENIT RA Analyzer* se han de evaluar conjuntamente con los demás datos clínicos y de laboratorio a disposición del médico.

La contaminación bacteriana de las muestras y la inactivación por calor pueden influir en el resultado del análisis.

Los anticuerpos heterófilos presentes en las muestras de suero humano pueden reaccionar con los reactivos a base de inmunoglobulina, provocando interferencias en los inmunoensayos *in vitro*. Muestras con estas características pueden dar valores anormales al ser analizadas con el kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA*.

VALORES ESPERADOS

Se analizaron las muestras de 100 donantes seleccionados al azar para verificar la presencia de anticuerpos anti-gliadina IgA.

De esas muestras, 1 resultó positiva y 99 negativas, con un valor medio de 1,3 UA/ml y una desviación estándar de 1,11 UA/ml.

Con los resultados obtenidos se calculó el límite de blanco (LdB = el resultado más alto que podemos esperar en una serie de muestras que no contienen el analito). El límite de blanco, establecido como percentil 95 de la población negativa, resultó equivalente a 3,2 UA/ml con el lote de reactivos nº 2.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

Con el kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* se analizó un total de 62 muestras de celíacos diagnosticados por primera vez y confirmados por examen histológico, y 90 muestras de no celíacos (60 donantes y 30 pacientes afectados de patologías inflamatorias y funcionales del intestino). La concentración de IgA totales de las muestras se estableció con método inmunonefelométrico y todas estaban dentro de los límites de normalidad.

En la población supuestamente negativa (no celíacos) estudiada, 5 muestras del grupo con patologías intestinales resultaron positivas, mientras que 85 muestras resultaron negativas:

- **Especificidad diagnóstica: 94,4 %**

En la población supuestamente positiva (celíacos) estudiada, 14 muestras resultaron negativas y 48 positivas:

- **Sensibilidad diagnóstica: 77,4 %**

Según los resultados de especificidad y sensibilidad diagnóstica, el **acuerdo diagnóstico es del 87,5 %**.

RENDIMIENTO

Advertencia: los datos que presentamos no representan las especificaciones de funcionamiento del kit, sino que constituyen evidencia experimental de cómo funciona el kit dentro de dichas especificaciones del modo previsto por el fabricante.

Precisión y reproducibilidad

La precisión y la reproducibilidad del kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* se evaluaron aplicando un protocolo basado en las directivas del documento EP5-A2 de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

La **precisión** se calculó analizando los resultados de 20 repeticiones de 5 sueros (uno negativo y cuatro positivos con diferentes concentraciones de anti-gliadina IgA) efectuadas con dos lotes diferentes de reactivos durante una misma sesión de análisis.

La concentración del suero anti-gliadina IgA negativo (N4) estuvo comprendida en el intervalo de 1,6 a 3,0 UA/ml y de 0,9 a 2,8 UA/ml respectivamente con los lotes de reactivos nº 1 y 2.

En la tabla se indican los resultados obtenidos con los 4 sueros positivos.

Muestra	Nº de lote de reactivos	Concentración media (UA/ml)	DE	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 **reproducibilidad** se calculó analizando los resultados de la determinación de cuatro sueros (uno negativo y tres positivos con diferentes concentraciones de anti-gliadina IgA) efectuada una sola vez con dos lotes diferentes de reactivos, en 15 sesiones diferentes.

La concentración del suero anti-gliadina IgA negativo (N4) estuvo comprendida en el intervalo de 1,8 a 4,4 UA/ml e de 0,7 a 2,5 UA/ml respectivamente con los lotes de reactivos nº 1 y 2.

En la tabla se indican los resultados obtenidos con los 3 sueros positivos.

Muestra	Nº lote de reactivo	Concentración media (UA/ml)	DE	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

Linealidad de las diluciones

La linealidad de las diluciones del kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* se evaluó aplicando un protocolo basado en las directivas del documento EP6-A de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

Se dosificaron diluciones escalonadas de 3 sueros con concentración alta de anti-gliadina IgA, efectuadas con el diluyente de muestras.

En la siguiente tabla se muestran los resultados del estudio.

Muestra	Factor de dilución	Concentración medida (UA/ml)	Concentración esperada (UA/ml)	Recuperación %
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

De todos modos, es necesario subrayar que no todos los sueros, cuando se los mide en diluciones diferentes, pueden dar resultados lineales dentro del intervalo de mensurabilidad, pues el resultado no depende sólo de la concentración sino también de la afinidad de los anticuerpos presentes en la muestra.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA*, expresada en cuanto **límite de detección** (*LdD*: la cantidad más pequeña de analito que el método puede medir), se evaluó aplicando un protocolo basado en las directivas del documento EP17-A de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) y la fórmula de cálculo $LdD = LdB + C_{\beta} DE_s$ (donde *LdB* representa el valor de límite de blanco, *DE_s* la desviación estándar estimada de la distribución de la muestra de baja concentración, y *C_β* deriva del percentil 95 de la distribución estándar de Gauss).

Se utilizaron 4 muestras de baja concentración de analito, determinadas separadamente con dos lotes de reactivos diferentes, en 15 análisis diferentes.

El límite de detección del kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* resultó equivalente a 5,2 UA/ml.

Los valores del límite de detección, junto con consideraciones de carácter clínico y los resultados de comparación con métodos de referencia contribuyeron a la definición del valor cut-off.

Especificidad analítica: interferencias

Un estudio basado en las directivas del documento EP7-A2 del CLSI demostró que el rendimiento del análisis no se ve influido por la presencia en la muestra de las sustancias potencialmente interferentes enumeradas en la tabla siguiente, hasta la concentración experimentada.

Sustancias potencialmente interferentes	Máxima concentración experimentada
Bilirrubina libre	20 mg/dl
Bilirrubina conjugada	28 mg/dl
Hemoglobina	1000 mg/dl
Ácidos grasos	3000 mg/dl

Se aconseja no analizar muestras lipémicas, hemolizadas o turbias.

Efecto de saturación en dosis elevadas

Algunos métodos inmunológicos utilizados para determinar muestras que contienen el analito en concentraciones sumamente altas pueden dar niveles aparentes de analito bajo (efecto *hook*).

El método utilizado en el kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA*, por ser un método de dos incubaciones, no resiente de dicho efecto.

Una muestra con concentración sumamente alta (por encima de los límites de medición) de anti-gliadina IgA confirmó la ausencia de efecto *hook* hasta una concentración de 5.500 UA/ml.

Sensibilidad y especificidad relativas

La presencia de anticuerpos anti-gliadina IgA se determinó analizando 136 muestras tanto con el kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* como con un ensayo ELISA disponible en comercio.

Las muestras pertenecían a pacientes celíacos diagnosticados por primera vez, pacientes celíacos sometidos a dieta, pacientes celíacos y no celíacos con deficiencia de IgA y pacientes normales.

En 5 de las muestras, los resultados fueron discordantes entre el análisis *ZENIT RA* y el análisis disponible en comercio.

La **concordancia relativa** resultó del 96,3 % (131/136).

La **sensibilidad relativa** resultó del 92,9 % (26/28).

La **especificidad relativa** resultó del 97,2 % (105/108).

BIBLIOGRAFÍA

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, Waggener 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

Distribuido por

Menarini Diagnosticos S.A.

Avda del Maresme, 120 - 08918 Badalona - Barcelona

Tel. +34 93 50 71 000 - Fax +34 93 27 80 215

www.menarinidiag.es