REF 41420 ZENIT ra	***ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA***	A.MENARINI diagnostics
INSTRUÇÕES PARA A UTILIZAÇÃO	IVD +2°C +8°C Σ 100	CE

APLICAÇÃO

O teste *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* é um teste imunológico quimiluminescente (CLIA) para a determinação quantitativa, com instrumentação dedicada, *Analisador ZENIT RA*, dos anticorpos específicos de classe IgA dirigidos contra os pépticos desamidados da gliadina em amostras de soro ou de plasma humano (EDTA, Heparina).
Esta dosagem é empregue como auxílio para o diagnóstico de enteropatia por glúten (doença celíaca) e de dermatite herpética de Durhing.

ATENÇÃO: Qualquer decisão medica não poderá basear-se unicamente no resultado deste teste, mas deverá incluir o conjunto de todos os dados clínicos e de laboratório disponíveis.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A doença celíaca (MC), ou intolerância alimentar ao glúten, é uma doença auto-imune, a qual se manifesta em indivíduos geneticamente susceptíveis, accionada por uma dieta rica em cereais, tais como trigo, cevada e centeio[1].
A predisposição genética está principalmente ligada a alguns genes do sistema HLA, em particular aos genótipos DQ2 e DQ8 que estão presentes em 95 a 98 % dos indivíduos celíacos, mas que também se registam numa percentagem entre 20 e 30% na população geral[2,3]. A proporção de MC na população caucásica é de 1:100 aproximadamente, de modo que um indivíduo em cada 30 que seja portador dos alelos codificados dos genes HLA DQ2/DQ8 desenvolve a MC[4,5].
A gliadina é a porção proteica do glúten capaz de accionar o processo auto-imune; o contacto entre os péptidos da gliadina e as células do sistema imunitário da submucosa intestinal pode dar-se em seguimento a uma alteração da permeabilidade intestinal provocada pela zonulina segregada pelos enterócitos. A gliadina é um excelente substrato para a enzima transglutaminase tecidual (t-TG); as acções de desamidação e transamidação nos péptidos gliadínicos pela t-TG, modificam a carga total da molécula permitindo a sua ligação aos antigénios HLA DQ2-DQ8, exprimidos pelas células que apresentam o antigénio, com a formação de um composto HLA DQ2-DQ8/ péptidos desamidados/t-TG. Esse composto é reconhecido pelos linfócitos T CD4[6] que accionam o processo imunológico com a activação dos linfócitos T efectores, produção de citoquinas, proliferação dos linfócitos B e síntese de anticorpos anti-tT-G[7] e anti-

péptidos da gliadina[8,9]. O resultado é um processo inflamatório com diferentes quadros histológicos que chegam até lesões (reversíveis) da mucosa intestinal, tais como a atrofia vilosa.

Os testes serológicos assumem um papel decisivo no diagnóstico da MC e na monitorização da adesão ao tratamento, caracterizado por uma dieta isenta de glúten. Como indicado nas linhas guias internacionais, o primeiro passo no diagnóstico de MC é a execução de um teste para pesquisar auto-anticorpos anti-t-TG de classe IgA em combinação com o teste de dosagem das IgA totais; esta praxei é aconselhada pois os indivíduos com défice absoluto de IgA (IgA ≤ 5 mg/dl)[10] têm um risco relativo de contrair a MC 10 vezes superior à população normal[11].

A elevada sensibilidade e especificidade dos auto-anticorpos anti-transglutaminase IgA, respectivamente de 96 a 98% e de 93 a 95%[12], associada à objectividade e à automação total do teste, fazem com que a pesquisa de anti-t-TG IgA tenha substituído, ao longo dos últimos anos, os outros testes serológicos da MC[13]. A pesquisa dos anti-endomísio (EMA) IgA tem todavia um papel de confirmação importante em todos os soros anti-t-TG IgA positivos, exactamente pela sua elevadíssima especificidade (99 a 100%) dos EMA, apesar de se manterem relevantes os aspectos interpretativos deste teste. Nos défices selectivos de IgA é obrigatória a execução dos anti-t-TG IgG em combinação com os anticorpos anti-péptidos desamidados da gliadina (a-DGP) IgG.

Recentemente, foi demonstrado que os indivíduos celíacos sintetizam anticorpos específicos dirigidos contra alguns péptidos desamidados da gliadina. Os anticorpos anti-DGP demonstram-se muito específicos na identificação dos sujeitos com intolerância ao glúten, ao contrário dos anticorpos anti-gliadina na totalidade, registados em indivíduos saudáveis ou com outras patologias do sistema entérico e, portanto, com especificidade reduzida[14].

Os anticorpos anti-DGP de classe IgA apresentam uma sensibilidade de 86 a 95% e uma especificidade de 91 a 95%, enquanto que os de classe IgG apresentam uma sensibilidade de 84 a 98% e uma especificidade de 95 a 98%; estes desempenhos sugerem a sua utilização nos indivíduos em idade pediátrica[15] nos quais a síntese desses anticorpos parece anteceder a dos anti-transglutaminase IgA. Para além disso, é aconselhada a utilização dos testes para anticorpos anti-DGP, quer da classe IgA, quer da IgG, independentemente da idade, em todos os indivíduos com sintomas indicativos de MC, nos quais os auto-anticorpos t-TG ou EMA estão ausentes ou apresentam títulos baixas[16].

Nos doentes celíacos em dieta isenta de glúten, assiste-se a um decremento progressivo dos anticorpos anti-t-TG e anti-gliadina. A diminuição do título de anticorpos de classe IgG é mais lenta do que a dos anticorpos de classe IgA.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* para a determinação quantitativa das IgA específicas anti-péptidos desamidados da gliadina utiliza um método imunológico indirecto em dois passos, baseado no princípio da quimiluminescência.

O antigénio específico é utilizado para revestir as partículas magnéticas (fase sólida) e um anticorpo anti-IgA humano é marcado com um derivado do éster de acridínio (conjugado).

Durante a primeira incubação, os anticorpos específicos presentes na amostra, nos calibradores ou nos controlos, aderem à fase sólida.
Durante a segunda incubação, o conjugado reage com os anticorpos anti-Gliadina IgA capturados pela fase sólida.

Depois de cada incubação, o material não aderido à fase sólida é removido por aspiração e subsequente lavagem.
A quantidade de conjugado marcado que ficou aderido à fase sólida é avaliada através da activação da reacção de quimiluminescência e medição do sinal luminoso. O sinal criado, exprimido em unidades relativas de luz (RLU, Relative Light Unit), é indicativo da concentração de anticorpos específicos presentes na amostra, nos calibradores e nos controlos.

AUTOMATIZAÇÃO

O *Analisador ZENIT RA* executa automaticamente todas as operações previstas pelo protocolo de dosagem: adiciona no recipiente de reacção as amostras, calibradores, controlos, partículas magnéticas, conjugado e soluções de activação da quimiluminescência; separação magnética e lavagem das partículas; medição da luz emitida.
O sistema calcula os resultados da dosagem para as amostras e para os controlos através de uma curva de calibração memorizada e imprime um relatório que inclui todas as informações relativas à dosagem e ao doente.

MATERIAIS E REAGENTES

Materiais e reagentes fornecidos

REAG	1	MP	2,5 mL

Partículas magnéticas revestidas com antigénio Gliadina (pépticos desamidados específicos) em Tampão Fosfato com proteínas estabilizantes, tensioactivo , Pro-Clin 300 e azida de sódio (< 0,1%) como conservantes.

REAG	2	CONJ	25 mL

Anticorpo policlonal de cabra anti-IgA humanas marcado com um derivado do éster de acridínio (conjugado), em Tampão Fosfato com proteínas estabilizantes e azida de sódio (< 0,1%) como conservante.

REAG	3	DIL	25 mL

Solução Diluente de Amostras: Tampão Fosfato com seroalbumina bovina, um tensioactivo, um corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO_4 como conservantes.

REAG	4	CAL A	1,6 mL

Soro humano com baixa concentração de anticorpos anti-Gliadina IgA em Tampão Fosfato com seroalbumina bovina, um tensioactivo, um corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO_4 como conservantes.

REAG	5	CAL B	1,6 mL

Soro humano com elevada concentração de anticorpos anti-Gliadina IgA em Tampão Fosfato com seroalbumina bovina, um tensioactivo, um corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO_4 como conservantes.

Todos os reagentes estão prontos a usar.
Os reagentes 1, 2 e 3 são embalados em conjunto constituindo um cartucho de reagentes.
As concentrações dos Calibradores são indicadas em UA/mL (Unidades Arbitrárias) e calibradas em relação a um padrão de referência interno. Os valores das concentrações, específicos para cada lote de produto, estão registados no DATA DISK incluído no kit.

DATA DISK

Mini-DVD que contém as informações relativas a todos os produtos da Linha ZENIT RA (Reagentes, Calibradores, Soros de controlo, Reagentes auxiliares) actualizados até ao último lote de produção à excepção dos produtos expirados na data de realização do novo DATA DISK.
Basta conservar o DATA DISK com o número de lote mais elevado para manter actualizadas as informações necessárias para o funcionamento correcto do sistema.

Materiais e reagentes necessários mas não fornecidos no kit

- ZENIT RA Analyzer — Cód. Nº 41400
- ZENIT RA Cuvette Cube — Cód. Nº 41402
  Embalagem de 960 cuvetes.
- ZENIT RA System Liquid — Cód. Nº 41409
  1 garrafa de 0,5 litros de solução 10x.
- ZENIT RA Wash Solution — Cód. Nº 41407
  1 garrafa de 0,5 litros de solução 20x.

- ZENIT RA Trigger Set Cód. Nº 41403
  1 frasco de 250 mL de Trigger A (solução de pré-activação)
  1 frasco de 250 mL de Trigger B (solução de pré-activação)

- ZENIT RA D-SORB Solution Cód. Nº 41436
  Embalagem de 2 garrafas de 1 litro de solução pronta a usar.

- ZENIT RA Cartridge Checking System Cód. Nº 41401

- ZENIT RA Top Cap Set Cód. Nº 41566
  300 tampas superiores para o fecho dos recipientes dos calibradores após a primeira utilização.

Outros Reagentes Aconselhados

ZENIT RA CELIAC CONTROL SET Cód. Nº 41452
3 ampolas de 1,5 mL de soro humano negativo e 3 ampolas de 1,5 mL de soro humano positivo para anticorpos anti-Gliadina.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Os reagentes fornecidos no kit ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA são exclusivamente para uso em diagnóstico in vitro e não para uso in vivo em pessoas ou animais.
Este produto deve ser usado por utilizadores profissionais respeitando rigorosamente as instruções deste documento.
A Menarini não pode ser considerada responsável por perdas ou danos provocados por uma utilização diferente da indicada nas instruções fornecidas.

Precauções de segurança
Este produto contém material de origem animal e, portanto, deve ser manuseado como se contivesse agentes infecciosos.
Este produto contém componentes de origem humana. Todas as unidades de soro, ou plasma, utilizadas para o fabrico dos componentes deste Kit, foram analisadas com métodos FDA aprovados e resultaram não reactivas pela presença de HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 e anti-HIV2.
Todavia, como nenhum método de análise é capaz de garantir a ausência de agentes patogénicos, todo o material de origem humana deve ser considerado potencialmente infectado e manuseado como tal.
Se a embalagem estiver estragada, com derramamento dos reagentes, providenciar à descontaminação da área afectada com uma solução diluída de Hipoclorito de Sódio depois de se ter protegido com dispositivos de protecção individual adequados (bata, luvas, óculos).

Eliminar o material utilizado para a limpeza e os resíduos da embalagem afectados pelo derramamento, de acordo com as normas nacionais para a eliminação de lixos potencialmente infectados.
Alguns reagentes contêm azida de sódio como conservante. Como a azida de sódio pode reagir com o chumbo, cobre e latão revestido de chumbo, formando azidas explosivas nos canos, aconselha-se não deitar reagentes ou resíduos no esgoto mas respeitar as normas nacionais em matéria de eliminação de lixos potencialmente perigosos.

Precauções de utilização
Para assegurar a obtenção de resultados válidos devem ser rigorosamente respeitadas estas instruções de utilização e as indicações do manual de instruções do instrumento.
Os reagentes fornecidos no kit devem ser utilizados exclusivamente com o sistema *ZENIT RA Analyzer*.
Os componentes do cartucho de reagentes não podem ser retirados do cartucho e montados novamente.
Não usar o kit para além do prazo de validade.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Os reagentes fornecidos no kit estão todos prontos a usar.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Conservar os reagentes fornecidos no kit entre 2 e 8°C em posição vertical e às escuras.
Nestas condições, o cartucho de reagente e os calibradores que não tiverem sido abertos estarão estáveis até ao fim do prazo de validade.
O cartucho de reagentes, depois de aberto, poderá ser utilizado por 60 dias, se conservado no frigorífico entre 2 e 8°C
ou a bordo da máquina.
Os calibradores, depois de abertos, poderão ser utilizados por 60 dias, se conservados no frigorífico entre 2 e 8°C e se a permanência a bordo da máquina não ultrapassar as 6 horas por sessão.
Não congelar os reagentes e os calibradores.

PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

A dosagem deve ser executada em amostras humanas de soro e de plasma (EDTA - Heparina).
Desaconselha-se o uso de amostras lipémicas, hemolisadas e turvas.
Se a dosagem for executada mais de 8 horas depois, separar o soro do coágulo ou o plasma, dos glóbulos vermelhos transferindo-os das provetas primárias separação com gel para provetas secundárias sem aditivos.

Antes de serem analisadas, as amostras podem ser conservadas no frigorífico entre 2 e 8°C no máximo por 7 dias.
Se a dosagem for executada mais de 7 dias depois, conservar as amostras congeladas (< - 20°C).
Evitar congelamentos e descongelamentos repetidos.

PROCEDIMENTO

Para obter desempenhos analíticos válidos, respeitar escrupulosamente as instruções do manual de instruções do instrumento.

Carregamento dos reagentes

Os reagentes fornecidos no kit estão todos prontos a usar.
Antes de inserir o cartucho de reagentes no sistema, o recipiente das partículas magnéticas deve ser agitado por rotação horizontal de modo a facilitar a suspensão das partículas. Executar a operação evitando a formação de espuma.
Colocar o cartucho de reagentes na área dos reagentes do analisador, utilizando a respectiva guia e deixar em agitação durante pelo menos 30 minutos antes de usar.
A colocação do cartucho de reagentes determina simultaneamente a leitura do código de barras de identificação. Se o rótulo do cartucho estiver estragado, ou por falta de leitura, os dados de identificação do cartucho de reagentes podem ser introduzidos manualmente.
O analisador mantém automaticamente as partículas magnéticas em agitação contínua.
Se o cartucho de reagentes for retirado do analisador, deve ser conservado na vertical e às escuras entre 2 e 8°C.

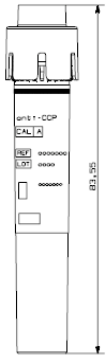
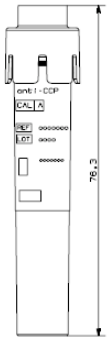
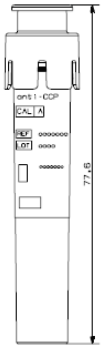
Carregamento dos calibradores e dos controlos

Os calibradores e os controlos ZENIT RA estão prontos a usar. Deixar os calibradores e os controlos a temperatura ambiente durante 10 minutos e agitar delicadamente o conteúdo, manualmente ou com um vortex, evitando a formação de espuma. Não inverter o recipiente e não retirar a tampa perfuradora de fecho (tampa amarela para os calibradores e tampas verdes ou azuis para os controlos).
No caso em que os calibradores, ou os controlos, sejam utilizados pela primeira vez, premir a tampa perfuradora para baixo até ao fim. Deste modo, a membrana que veda o recipiente será perfurada tornando assim possível a colheita do líquido contido no mesmo. O abaixamento total da tampa perfuradora é assinalado pela simultânea cobertura da faixa vermelha situada na parte superior do rótulo (Fig. 1 – Recipiente selado e Recipiente perfurado).
Se os calibradores, ou os controlos, já tiverem sido utilizados, o recipiente terá a tampa superior (tampa branca) e a faixa vermelha do rótulo estará tapada.
Só devem ser carregados no instrumento os recipientes sem tampa superior (tampa branca) e com a faixa vermelha do rótulo tapada (Fig. 1 – Recipiente perfurado).

Introduzir no analisador os calibradores, ou os controlos na área das amostras, depois da leitura do código de barras. Os dados do código de barras também podem ser introduzidos manualmente se o rótulo estiver estragado ou em caso de falta de leitura.
Os valores da concentração de anticorpos IgA anti-Gliadina presente nos calibradores, ou nos controlos, estão registados no DATA DISK e são transferidos automaticamente para o analisador. Em caso de falta de transferência dos dados, é possível introduzi-los manualmente.

No final da sessão, os recipientes dos calibradores e dos controlos devem ser fechados com as respectivas tampas superiores (tampas brancas) e conservados entre 2 e 8°C até serem novamente utilizados (Fig. 1 – Recipiente fechado).
Os calibradores só podem ser utilizados ao máximo quatro vezes.

Figura 1: Desenho do recipiente

Recipiente selado	Recipiente perfurado	Recipiente fechado
		

Carregamento das amostras

Identificar as amostras utilizando o leitor de código de barras e introduzi-las no analisador, no respectivo recipiente. Em caso de falta do código de barras na amostra ou em caso de falta de leitura, os dados de identificação da amostra podem ser introduzidos manualmente.
Seleccionar os parâmetros requeridos de cada amostra.

Calibração

O *Analisador ZENIT RA* utiliza uma curva de calibração memorizada (master curve), criada pelo fabricante para cada lote de cartuchos de reagentes.
Os parâmetros das “master curve”, juntamente aos valores das concentrações dos calibradores, estão memorizados no DATA DISK e são transferidos para a base de dados do analisador.
Os calibradores A e B são utilizados para recalibrar a “master curve” quer em função do analisador utilizado, quer dos reagentes a bordo.
Para executar a recalibração, analisar os dois calibradores A e B em triplicado e os controlos individualmente. Os valores de concentração obtidos com os controlos permitem validar a nova calibração.

Assim que a recalibração da “master curve” tiver sido aceite, e memorizada, todas as amostras seguintes poderão ser analisadas sem outra calibração, excepto nos seguintes casos:

- quando estiver carregado a bordo do analisador um cartucho de reagentes com um lote novo;
- quando os valores dos controlos não estiverem dentro do intervalo de aceitabilidade;
- quando for executada a operação de manutenção do analisador;
- quando tiver expirado a validade da “master curve” recalibrada.

O prazo de validade da “master curve” recalibrada para o kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* é de 15 dias.

A gestão da recalibração é accionada automaticamente pelo analisador.

Dosagem

Premir o botão de início.

1. O sistema aspira 100 µL de Diluente de Amostras, 20 µL de Partículas Magnéticas, 100 µL de Diluente de Amostras e 6 µL de amostra, ou controlo (para os calibradores, o soro positivo é fornecido pré-diluído com o Diluente de Amostras e o volume recolhido é de 106 µL). As soluções e a suspensão aspiradas são distribuídas na cuvete de reacção.
2. A cuvete de reacção é incubada no rotor a 37°C durante 10 minutos.
3. Depois desta fase de incubação, as partículas magnéticas são separadas e lavadas.
4. São distribuídos 200 µL de conjugado na cuvete.
5. A cuvete de reacção é incubada no rotor a 37°C durante 10 minutos.
6. Depois desta última fase de incubação, as partículas magnéticas são separadas e lavadas e a cuvete é transferida para a câmara de leitura.
7. A quantidade de conjugado aderido à fase sólida, exprimida em RLU, é directamente proporcional à concentração de IgA anti-Gliadina presente na amostra.
8. As respostas obtidas são interpoladas na curva de calibração e transformadas em concentrações.

As amostras com valores de concentração mais elevados do limite superior do intervalo de medição podem ser diluídas e testadas novamente. O novo valor obtido é multiplicado pelo factor de diluição utilizado para obter o resultado final.

CONTROLO DE QUALIDADE

Para assegurar a validade da dosagem, devem ser medidos soros de controlo com níveis diferentes de concentração (pelo menos um soro negativo e um soro positivo) cada dia em que se executa a dosagem.

Se o seu laboratório requer, para a verificação dos resultados da dosagem, um uso mais frequente, ou um número mais elevado de controlos, seguir as operações de controlo de qualidade estabelecidas.

Se forem utilizados os soros de controlo ZENIT RA, os valores médios esperados e os limites de aceitabilidade são os indicados no DATA DISK também presente na embalagem dos controlos.

Se forem utilizados soros de controlo diferentes, é necessário, antes da sua utilização, definir os valores esperados com reagentes e sistema ZENIT RA.
Se o valor dos controlos não estiver dentro do intervalo de aceitabilidade especificado, os respectivos resultados da dosagem são inválidos e essas amostras devem ser analisadas novamente.
Neste caso é necessário executar uma recalibração antes da repetição da dosagem.

CÁLCULO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Cálculo dos resultados

A concentração dos anticorpos IgA anti-Gliadina presente nas amostras em exame é calculada automaticamente pelo sistema. Os valores podem ser visualizados no ecrã ou imprimidos.
As concentrações são exprimidas em UA/mL.
O cálculo da concentração na amostra é efectuado através da leitura da resposta obtida por cada amostra numa curva de calibração elaborada com um sistema de "fitting" logístico de quatro parâmetros (4PL, Y ponderado), corrigida periodicamente em função das respostas obtidas na dosagem dos calibradores.

Para mais informações sobre o sistema de cálculo dos resultados, consultar o manual de instruções do sistema.

Interpretação dos resultados

O intervalo de medição da dosagem *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* é de: 0,0 a 200 UA/mL.
Os valores inferiores a 0,0 UA/mL são valores extrapolados e podem ser indicados como "iguais a 0,0 UA/mL".
Os valores superiores a 200 UA/mL podem ser indicados como "superiores a 200 UA/mL", ou testados novamente após a devida diluição.
Os resultados das amostras podem ser interpretados do seguinte modo:

(UA/mL)	Interpretação
< 10	A amostra é considerada Negativa pela presença de IgA anti-Gliadina
≥ 10	A amostra deve ser considerada Positiva pela presença de IgA anti-Gliadina

Os valores acima mencionados devem ser considerados como valores indicativos. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios intervalos de referência.

LIMITES DA DOSAGEM

Para efeitos de diagnóstico, os resultados obtidos com o kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* e o sistema *ZENIT RA Analyzer* devem ser utilizados em conjunto com os outros dados clínicos e de laboratório à disposição do médico.

A contaminação bacteriana das amostras e a inactivação ao calor podem influenciar o resultado da dosagem.
Os anticorpos heterófilos presentes nas amostras de soro humano podem reagir com os reagentes à base de imunoglobulinas, provocando interferências nas dosagens imunológicas in vitro. Estas amostras podem dar lugar a valores anormais, se analisados com o kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA*.

VALORES PREVISTOS

Foram analisadas as amostras de 100 dadores seleccionados casualmente para verificar a presença de anticorpos IgA anti-Gliadina.
Destas amostras, 1 deu resultado positivo e 99 negativo, com um valor médio de 1,3 UA/mL e um desvio padrão de 1,11 UA/mL.
Com os resultados obtidos foi calculado o "Limit of Blank" (LoB = o valor mais elevado que podemos esperar numa série de amostras que não contenham o analito). O "Limit of Blank", determinado como 95º da percentagem de população negativa, resultou igual a 3,2 UA/mL com o Lote de reagentes 2 2.

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

Foi testado um total de 62 amostras celíacas no primeiro diagnóstico, confirmadas por exame histológico, e 90 amostras não celíacas (60 dadores e 30 doentes afectados por patologias inflamatórias e funcionais do intestino) com o kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA*. Todas as amostras apresentavam uma concentração de IgA totais, determinada com o método imunonefelométrico, compreendida no intervalo de normalidade.
Na população presumivelmente negativa (não celíacos) estudada, 5 amostras, pertencentes ao grupo com patologias intestinais, deram resultados positivos e 85 amostras deram resultados negativos:

- **Especificidade do diagnóstico: 94,4%**

Na população presumivelmente positiva (celíacos) estudada, 14 amostras deram resultados negativos e 48 amostras deram resultados positivos:

- **Sensibilidade do diagnóstico: 77,4%**

Em função dos resultados da especificidade e da sensibilidade de diagnóstico, o **acordo diagnóstico é de 87,5%**.

DESEMPENHO

Advertência: os dados apresentados não representam as especificações de funcionamento do kit, mas constituem a evidência experimental em como o kit funciona dentro dessas especificações no modo previsto pelo fabricante.

Precisão e Reprodutibilidade

A precisão e a reprodutibilidade do kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* foram avaliadas utilizando um protocolo baseado nas linhas guia do documento EP5-A2 dos Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

A ***precisão*** foi calculada analisando os resultados de 20 repetições de cinco soros (um negativo e quatro positivos com diferentes concentrações de anti-Gliadina IgA) executados com dois lotes de reagentes diferentes na mesma sessão experimental.
A concentração do soro anti-Gliadina IgA negativo (N4) deu um resultado compreendido no intervalo de 1,6 a 3,0 UA/mL e de 0,9 a 2,8 UA/mL respectivamente com o Lote de reagentes 1 e 2.

Na Tabela estão indicados os resultados obtidos com os 4 soros positivos.

Amostra	Reagentes Lote nº	Concentração média (UA/mL)	SD	CV %
P1	1	17,7	0,80	4,5
	2	18,1	0,65	3,6
P2	1	28,1	0,72	2,6
	2	29,1	0,82	2,8
P3	1	49,9	2,01	4,0
	2	56,5	1,49	2,6
P4	1	111,6	6,36	5,7
	2	110,6	2,51	2,3

A ***reprodutibilidade*** foi calculada analisando os resultados da determinação de quatro soros (um negativo e três positivos com diferentes concentrações de anti-Gliadina IgA) executada individualmente com dois lotes de reagentes diferentes, em 15 sessões diferentes.
A concentração do soro anti-Gliadina IgA negativo (N4) deu um resultado compreendido no intervalo de 1,8 a 4,4 UA/mL e de 0,7 a 2,5 UA/mL respectivamente com o Lote de reagentes 1 e 2.

Na Tabela estão indicados os resultados obtidos com os 3 soros positivos.

Amostra	Reagentes Lote nº	Concentração média (UA/mL)	SD	CV %
P1	1	17,1	1,06	6,2
	2	17,4	0,41	2,4
P2	1	27,3	1,38	5,1
	2	27,8	0,99	3,6
P3	1	47,4	2,77	5,8
	2	52,3	1,50	2,9

Linearidade das Diluições

A precisão das diluições do kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* foi avaliada utilizando um protocolo baseado nas linhas guia do documento EP6-A dos Clinical and Laboratory Standards (CLSI).
Foram doseadas diluições escalares de 3 soros de concentração elevada de IgA anti-Gliadina, executadas com o Diluente de Amostras.
Os resultados deste estudo estão resumidos na tabela seguinte.

Amostra	Factor de diluição	Concentração medida (UA/mL)	Concentração prevista (UA/mL)	Recuperação %
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 qualquer modo torna-se necessário sublinhar que nem todos os soros, quando medidos em diluições diferentes, podem dar resultados lineares dentro do intervalo de medição dependendo o resultado não só da concentração mas também da afinidade dos anticorpos presentes na amostra.

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA*, exprimida como ***limite de detecção*** *(Limit of Detection – LoD:* ou seja a menor quantidade de analito que o método é capaz de medir*)* foi determinada utilizando um protocolo baseado nas linhas guia do documento EP17-A dos Clinical and Laboratory Standards (CLSI) e a fórmula para o cálculo LoD = LoB + C_β SD_s (onde LoB representa o valor do "Limit of Blank", SD_s o desvio padrão previsto pela distribuição da amostra a baixa concentração e C_β deriva do 95º da percentagem de distribuição padrão de Gauss).

Foram utilizadas 4 amostras de baixa concentração de analito, determinadas uma só vez com dois Lotes de reagentes diferentes em 15 sessões diferentes.

O Limite de detecção do kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* foi igual a 5,2 UA/mL.

Os valores do limite de detecção, juntamente com as considerações de carácter clínico e com os resultados de comparação com métodos de referência, contribuíram para a definição do valor de cut-off.

Especificidade Analítica: Interferências

Um estudo baseado nas linhas guia do documento EP7-A2 do CLSI demonstrou que os desempenhos da dosagem não são influenciados pela presença na amostra de substâncias potencialmente interferentes, indicadas na tabela seguinte, até à concentração experimentada.

Substâncias Potencialmente Interferentes	Concentração máxima experimentada

Bilirrubina livre	20 mg/dL
Bilirrubina conjugada	28 mg/dL
Hemoglobina	1000 mg/dL
Ácidos gordos	3000 mg/dL

Desaconselha-se o uso de amostras lipémicas, hemolisadas ou turvas..

Efeito de saturação em doses elevadas

Alguns métodos imunológicos empregues para a determinação de amostras que contêm o analito em concentrações extremamente elevadas podem fornecer níveis aparentes de analito subestimados (Efeito hook).

O método utilizado no kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA*, sendo um método com duas incubações, não sofre esse efeito.

Uma amostra com concentração extremamente elevada (acima do intervalo de medição) de IgA anti-Gliadina confirmou a ausência de efeito "hook" até à concentração de 5.500 UA/mL.

Sensibilidade e Especificidade Relativas

A presença de anticorpos anti-Gliadina IgA foi determinada utilizando o kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgA* e um método de dosagem ELISA disponível no comércio em 136 amostras.

As amostras analisadas pertenciam a doentes celíacos com primeiro diagnóstico, doentes celíacos em dieta, doentes celíacos e não celíacos com défice de IgA e doentes normais.

5 amostras deram lugar a resultados divergentes entre a dosagem ZENIT RA e a dosagem disponível no comércio.

*A **concordância relativa*** resultou assim igual a 96,3% (131/136).

*A **sensibilidade relativa*** resultou igual a 92,9% (26/28).

*A **especificidade relativa*** resultou igual a 97,2% (105/108).

BIBLIOGRAFIA

1. Stern M, Cicilitira P, van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Mendez E, et al. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. Eur J Gastroenterology Hepatol 2001; 13:741-7.
2. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. Gastroenterology 1993; 105:910-22.
3. Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M, Louka AS, Clot F, Percopo S, et al. HLA-DQ relative risk for celiac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. Tissue Antigens 2004; 63: 562-7.
4. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. Lancet 1994; 342:200-3.
5. Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, et al. Prevalence of coeliac disease among children in Finland. N Engl J Med 2003; 348: 2517-24.
6. Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Jung G, Fleckenstein B, Sollid LM. Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. J Immunol 2005; 175: 254-61.

7. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nat Med 1997; 3: 797-801.

8. Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, Garcilazo S, 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)

Distribuido por
A. Menarini Diagnosticos, Lda
Quinta da Fonte - Edifi cio D. Manuel I, 2° B
2770-203 Paço de Arcos
Tel. +351 210 93 00 00 - Fax +351 210 93 00 01
www.menarinidiag.pt