

# **AESKULISA<sup>®</sup>**

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

# INSTRUCTION MANUAL

**AESKULISA DGP-Check**

Ref 3515







Product Ref.	3515
Product Desc.	DGP-Check
Manual Rev. No.	002 : 2013-10-10

## Manual de Instruções

### Conteúdo

---

1	Utilização .....	1
2	Aplicações clínicas e princípio do ensaio .....	1
3	Componentes do Kit .....	2
4	Armazenamento e validade .....	2
5	Avisos e medidas de precaução .....	3
6	Recolha da amostra, manipulação e armazenamento .....	4
7	Procedimento do teste .....	4
8	Interpretação quantitativa e qualitativa.....	7
9	Dados Técnicos .....	8
10	Dados do teste / Características do teste.....	8
11	Bibliografia .....	11



## 1 Utilização

**AESKULISA DGP-Check** é um teste imunoenzimático em fase sólida com péptidos específicos de gliadina sintéticos deamidados para a determinação combinada quantitativa e qualitativa completa de anticorpos IgA e IgG contra péptidos específicos de gliadina deamidada no soro humano.

O teste serve para o diagnóstico da doença celíaca (enteropatia por sensibilidade ao glúten).

## 2 Aplicações clínicas e princípio do ensaio

A enteropatia por sensibilidade ao glúten (ESG) ou doença celíaca caracteriza-se por uma atrofia das vilosidades do intestino delgado, provocando um achatamento da mucosa. Causa desta doença é uma intolerância patológica contra a gliadina, que é a fracção solúvel em álcool do glúten, um componente do trigo, do centeio e da cevada.

A doença é induzida pela ingestão de glúten. Como terapia tem de ser cumprida uma dieta livre em glúten durante toda a vida, porque os sintomas voltam a aparecer se for novamente ingerido glúten. A doença está associada à HLA, >95% dos doentes têm DQ2 codificado pelo DQA1\*0501 e DQB1\*0201. A manifestação da doença ocorre em todas as faixas etárias, contudo com maior frequência durante os primeiros anos da infância, parcialmente já em neonatos. A incidência situa-se entre 1/4000 até 1/300 na Europa.

O diagnóstico realiza-se por fim pela prova da mucosa lisa típica mediante biopsia do intestino delgado, acompanhado por marcadores serológicos. Anticorpos contra gliadina e transglutaminase tecidual (tTG) são de grande importância neste âmbito. A tTG foi identificada como sendo o antígeno alvo dos EMA. EMA são os anticorpos que se ligam ao endomísio, um componente extracelular dos músculos lisos, e a sua prova no teste de imunofluorescência indirecta (IFT) era até agora uma ferramenta importante para o diagnóstico da doença celíaca.

Os anticorpos anti-gliadina da subclasse IgG e IgA encontram-se com elevada frequência em soros de doentes com doença celíaca, contudo são menos específicos que os auto-anticorpos contra tTG e EMA.

Os exames recentes revelaram, que anticorpos dos pacientes da doença celíaca dirigidos contra gliadina ligam um número muito limitado de epítopes específicos nas moléculas de gliadina. Além disso é a ligação dos anticorpos anti-gliadina intensificada com a deaminação selectiva de gliadina pela transglutaminase tecidual (tTG). Por isso os sistemas de testes, que utilizam péptidos deaminados e definidos, revelam uma exactidão diagnóstica maior, que os testes anti-gliadina habituais.

A determinação de anticorpos IgG contra PGD (e/ou tTG) é especialmente importante para aqueles 2 a 5% de doentes com deficiência de IgA, por estes não serem detectados na determinação com testes de anticorpos da subclasse IgA.

Em neonatos, a determinação de anticorpos contra gliadina como parâmetro serológico reveste-se de uma importância especial, já que os auto-anticorpos contra tTG e EMA não estão presentes nessa idade.

### Princípio do teste

As provas de soro, diluídas a 1:101, são incubadas nos poços que estão revestidas com o antígeno específico. Neste passo os anticorpos específicos do soro do doente, se presentes, unem-se ao antígeno na placa; partes de soro não ligadas são eliminadas na etapa de lavagem seguinte. Depois são adicionadas imunoglobulinas anti-humanas, que se encontram marcadas com peroxidase de rábano (conjugado). Durante uma incubação elas unem-se ao complexo antígeno-anticorpo previamente formado, e as imunoglobulinas não ligadas são eliminadas na etapa de lavagem seguinte. A prova de anticorpos ligados efectua-se através de uma reacção colorimétrica (azul) enzimática do substrato, que é parada com ácido diluído (mudança da cor para amarelo). A intensidade de cor do cromogénio depende da quantidade de conjugado ligado ao complexo antígeno-anticorpo, sendo dessa forma directamente proporcional à concentração inicial dos respectivos anticorpos na amostra do paciente.

### 3 Componentes do Kit

<b>DILUIR ANTES DE USAR</b>				
Item	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição/Conteúdo
Tampão de amostra (5x)	1 x 20ml	Branco	Amarelo	concentrado 5x Tris, cloreto de sódio (NaCl), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Tampão de lavagem (50x)	1 X 20ml	Branco	Verde	concentrado 50x Tris, NaCl, Tween 20, azido de sódio < 0.1% (conservante)
<b>PRONTO A USAR</b>				
Item	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição/Conteúdo
Controlo negativo	1 x 1,5ml	Verde	Incolor	Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Controlo positivo	1 x 1,5ml	Vermelho	Amarelo	Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Calibrador Cut-off	1 x 1,5ml	Azul	Amarelo	Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Calibradores	6 x 1,5ml	Branco	Amarelo *	Concentração de cada calibrador: 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml. Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Conjugado, IgA/G	1 x 15ml	Branco	Vermelho	Contém: Imunoglobulinas anti-humanas marcadas com peroxidase de rábano (BSA)
Substrato TMB	1 x 15ml	Preto	Incolor	Tetrametilbenzidina estabilizada e peróxido de hidrogénio (TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Solução de paragem	1 x 15ml	Branco	Incolor	Ácido clorídrico 1M
Microplaca	12x8 poços	N/A	N/A	Fraccionáveis. Revestimento ver ponto 1.
* Intensidade da cor aumenta com a concentração				
<b>MATERIAIS NECESSÁRIOS</b>				
Fotómetro para microplacas com filtro óptico para 450 nm, opcionalmente com filtro de referência opcional de 620 nm (600-690 nm). Material de vidro (cilindro 100-1000 ml), tubos de ensaio para as diluições. Agitador de tubos tipo Vortex, micropipetas (10,100, 200, 500, 1000 µl) ou multipipeta ajustável (100-1000µl). Aparelho de lavagem para microplacas (repetição 300 µl, pipeta multicanal ou sistema automatizado), papel de filtro. Os nossos testes foram concebidos para serem utilizados com água purificada segundo a definição da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP 26 – NF 21) e da Farmacopeia Europeia (Eur.Ph. 4. <sup>a</sup> ed.).				

### 4 Armazenamento e validade

Todos os reagentes e a microplaca devem ser guardados nas suas embalagens originais a 2-8°C/35-46°F. Soluções diluídas são estáveis durante 1 mês a 2-8°C/35-46°F. Devem ser cumpridas as datas de validade indicadas na embalagem e nos rótulos dos diferentes componentes.

Não usar componentes do kit que estejam fora do prazo de validade Evite a exposição da solução de substrato TMB a luz intensa. Guarde as microplacas sempre fechadas dentro da sua película de embalagem, junto com o dessecante.

## 5 Avisos e medidas de precaução

### 5.1 Risco para a saúde

**ESTE PRODUTO DEVE SER USADO EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO.** A aplicação tem de ser realizada por pessoal que tenha sido especialmente instruído e formado no uso de métodos de diagnóstico in vitro. Apesar de este produto não ser considerado como particularmente tóxico ou perigoso em condições de utilização, ver o que se segue para máxima segurança:

#### ***Recomendações e medidas de precaução***

Dado que alguns componentes do kit contêm reagentes potencialmente perigosos, estes podem causar uma irritação dos olhos e da pele.

**ATENÇÃO:** Calibradores, controlos e tampões contêm azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) como conservante.  $\text{NaN}_3$  pode ter efeito tóxico, se for ingerido ou absorvido através da pele ou dos olhos.  $\text{NaN}_3$  pode formar azidas metálicas altamente explosivas em contacto com canos de chumbo ou cobre. Para evitar concentrações de azida ao remover estas soluções deve-se passar com água em grande quantidade. É favor observar as prescrições locais/nacionais para descontaminação.

**Ao trabalhar com o kit não comer, beber ou fumar. Não pipetar com a boca. Usar luvas descartáveis.**

Os reagentes contidos neste produto, de origem humana (controlos e calibradores), demonstraram ser negativos após análise de antígeno de superfície da hepatite B (HbsAg), hepatite C e HIV 1 e 2. Contudo, em produtos de origem humana nunca se pode excluir com certeza definitiva a existência dos agentes patogénicos mencionados, outros ou de agentes eventualmente desconhecidos ou ainda não diagnosticados. Por isso os controlos, calibradores e soros dos doentes devem ser considerados tranDGP Checkissores potenciais de infecções e manuseados segundo as prescrições legais vigentes no seu país.

O kit contém material de origem animal conforme indicado no índice, manuseie segundo as prescrições legais vigentes no seu país.

### 5.2 Avisos gerais

Caso as informações sobre o produto, incluindo a rotulagem, tiverem erros ou estiverem incorrectas, contactar o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

Componentes de diferentes lotes e apetrechos de teste não devem ser trocados, porque isso poderá levar a uma adulteração dos resultados.

Todos os componentes do kit devem atingir a temperatura ambiente ( $20\text{-}32^\circ\text{C}/68\text{-}89,6^\circ\text{F}$ ) e ser bem agitados antes do teste.

É impreterível seguir o protocolo prescrito para a realização do teste.

**Incubação: Para a realização automática de testes recomendamos uma temperatura de  $30^\circ\text{C}/86^\circ\text{F}$ .**

Nunca exponha os componentes do kit a temperaturas superiores a  $37^\circ\text{C}/98,6^\circ\text{F}$ .

Pipete a solução de substrato sempre com pontas de pipeta novas para evitar contaminações. Proteja a solução de substrato de luz intensa. Nunca pipete o a solução do conjugado com pontas de pipeta que estejam contaminadas com outros reagentes.

**Um diagnóstico clínico definitivo não se deve basear somente nos resultados do teste realizado, mas deve ser elaborado pelo médico, tendo em conta todos os resultados clínicos e de laboratório. O diagnóstico deve ser impreterivelmente confirmado com diferentes métodos diagnósticos.**

## 6 Recolha da amostra, manipulação e armazenamento

---

Recomenda-se a utilização de amostras de soro colhidas na altura. A extracção de sangue deve seguir os requerimentos de protocolo do seu país. Não utilize amostras de soro ictéricas, lipémicas, hemolizadas ou contaminadas por bactérias.

Em caso de amostras turvas, as partículas devem ser centrifugadas a baixa velocidade (<1000 x g). As amostras de sangue devem ser tomadas em tubos limpos, secos e vazios. Após a separação, as amostras de soro devem ser utilizadas nas primeiras 8 horas, guardadas num local bem fechado até 48 horas a 2-8°C/35-46°F, se for necessário um armazenamento mais prolongado, devem ser congeladas a -20°C/-4°F.

## 7 Procedimento do teste

---

### 7.1 Preparação

#### **Diluição de reagentes concentrados:**

Dilua o tampão de amostra concentrado 1:5 com água destilada (p.ex. 20 ml mais 80 ml)

Dilua o tampão de lavagem concentrado 1:50 com água destilada (p.ex. 20 ml mais 980 ml).

Para evitar erros, sugerimos a marcação das tampas dos vários calibradores.

#### **Diluição das amostras dos doentes:**

Dilua e misture as amostras de soro 1:101 com tampão de amostra (1x),

p.ex. 1000 µl tampão de amostra + 10 µl de soro.

#### **Lavagem:**

São necessários 20 ml de tampão de lavagem diluído (1x) para 8 poços ou 200 ml para 96 poços p.ex. 4 ml de concentrado mais 196 ml de água destilada.

#### **Lavagem automatizada:**

Para a colocação em serviço do instrumento e o volume morto deve, ser consideradas quantidades adicionais de tampão de lavagem.

#### **Lavagem manual:**

Remova cuidadosamente o líquido ao bater a placa sobre papel filtrante. Pipete 300 µl de tampão de lavagem diluído em cada poço, espere 20 segundos. Repita o procedimento mais duas vezes.

#### **Microplacas:**

Retire os poços não usados, armazenando-os a 2-8°C/35-46°F de forma bem fechada dentro da película da embalagem, junto com o dessecante.

## 7.2 Schéma de pipetage

Sugerimos a pipetagem de calibradores, controlos e amostras da seguinte forma:

Pour une interprétation quantitative					Pour une interprétation qualitative				
	1	2	3	4...		1	2	3	4...
<b>A</b>	Cal A	Cal E	P1		<b>A</b>	NC	P2		
<b>B</b>	Cal A	Cal E	P1		<b>B</b>	NC	P2		
<b>C</b>	Cal B	Cal F	P2		<b>C</b>	CC	P3		
<b>D</b>	Cal B	Cal F	P2		<b>D</b>	CC	P3		
<b>E</b>	Cal C	PC	P3		<b>E</b>	PC	...		
<b>F</b>	Cal C	PC	P3		<b>F</b>	PC	...		
<b>G</b>	Cal D	NC	...		<b>G</b>	P1	...		
<b>H</b>	Cal D	NC	...		<b>H</b>	P1	...		

CalA: calibrator A

CalD: calibrator D

PC: positive control

P1: patient 1

CalB: calibrator B

CalE: calibrator E

NC: negative control

P2: patient 2

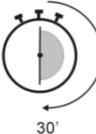
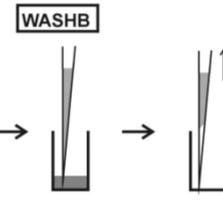
CalC: calibrator C

CalF: calibrator F

CC: cut-off calibrator

P3: patient 3

## 7.3 Passos de teste

Pas so	Descrição
1.	Verifique se as preparações do passo 7.1 acima foram realizadas antes da pipetagem.
2.	Utilize os passos que se seguem de acordo com os resultados de interpretação quantitativa/qualitativa pretendidos:
<b>CONTROLOS E AMOSTRAS</b>	
3.	 <p>Pipete para os poços conforme descrito no ponto 7.2 acima, 100 µl de um dos seguintes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Calibradores (CAL.A a CAL.F) para interpretação <b>QUANTITATIVA</b> ou</li> <li>Calibrado Cut-off (CC) para interpretação <b>QUALITATIVA</b></li> </ol> <p>e 100 µl de cada um dos seguintes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Controlo negativo (NC) e Controlo positivo (PC) e</li> <li>Soro diluído dos pacientes (P1, P2...)</li> </ul>
4.	 <p>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.</p>
5.	 <p>Lave 3 vezes com 300 µl de tampão de lavagem 1:50 diluído.</p>



### CONJUGAR

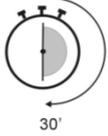
6.

**CONJ**



Pipete 100 µl de conjugado em cada poço.

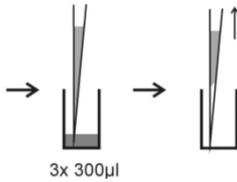
7.



Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.

8.

**WASHB**



Lave 3 vezes com 300 µl de tampão de lavagem 1:50 diluído.

### SUBSTRATO

9.

**SUB**



Pipete 100 µl de substrato TMB em cada poço.

10.

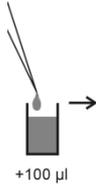


Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F, protegida de luz intensa.

### PARAGEM

11.

**STOP**



Pipete 100 µl da solução de paragem dentro de cada poço, na meDGP Checka sequência da pipetagem do substrato.

12.

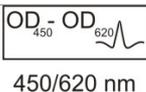


Incube durante 5 minutos, no mínimo.

13.

Agite cuidadosamente a placa durante 5 segundos.

14.



Leia a densidade óptica a 450 nm dentro de 30 minutos (recomendável a 450/620 nm).

## 8 Interpretação quantitativa e qualitativa

A **interpretação quantitativa** realiza-se com base numa curva padrão, em que a densidade óptica dos calibradores (eixo y) é traçada contra a concentração em U/ml (eixo x). É recomendada uma escala log/lin e um ajuste de 4 parâmetros para a interpretação. Com base na curva é determinada a concentração de anticorpos em U/ml a partir da densidade óptica da amostra.

Gama Normal	Duvidosos	Resultados positivos
< 16 U/ml	16 - 24 U/ml	>24 U/ml

### Exemplo de interpretação

Este exemplo **NÃO** pode ser usado para interpretar os resultados dos pacientes

Calibradores IgA/G	DO 450/620 nm	CV % (Variância)
0 U/ml	0,053	0,3
3 U/ml	0,176	1,4
10 U/ml	0,350	2,3
30 U/ml	0,622	3,9
100 U/ml	1,203	1,9
300 U/ml	2,000	6,6

### Exemplo de cálculo

Paciente	Replicado (OD)	Valor médio (OD)	Resultado (U/ml)
P 01	0,925/0,985	0,955	50,5
P 02	0,491/0,489	0,490	20,1

As amostras acima da gama do calibrador mais elevado devem ser referidas como >Max. Devem ser diluídas conforme necessário voltar a realizar o ensaio. As amostras abaixo da gama do calibrador devem ser referidas como < Min.

Consulte o certificado de controlo junto para dados específicos do lote. Laboratórios médicos devem realizar um controlo de qualidade interno, utilizando controlos próprios e/ou um „pool“ de soros interno segundo os regulamentos da UE.

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais, com base nas suas próprias técnicas, controlos, equipamento e população de doentes.

No caso dos valores dos controlos não cumprirem os critérios, o teste é inválido e deverá ser repetido.

Devem verificar-se as seguintes questões técnicas: Prazo de validade dos reagentes (preparados), condições de armazenamento, pipetas, aparelhos, fotómetro, condições de incubação e métodos de lavagem.

Se os itens testados mostrarem valores aberrantes ou qualquer tipo de desvio ou se os critérios de avaliação não forem cumpridos sem causa plausível, contactar o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

Na **interpretação qualitativa** efectua-se a comparação da densidade óptica (DO) da amostra dos doentes com a densidade óptica do calibrador cut-off. Se a densidade óptica da amostra do doente se situar na gama de +/-20% do calibrador cut-off, então deve ser considerada como valor limite. Em caso de uma DO mais elevada, a amostra do doente é considerada positiva, amostras com DOs mais baixas são consideradas negativas.

<b>Negativo:</b>	DO doente <	0,8 x DO cut-off
<b>Dudosos:</b>	0,8 x DO cut-off ≤	DO doente ≤ 1,2 x DO cut-off
<b>Positivo:</b>	DO doente >	1,2 x DO cut-off

## 9 Dados Técnicos

Amostra:	soro
Volume de amostra:	10 µl de amostra diluída a 1:101 com tampão de amostra 1x
Tempo total de incubação:	90 minutos à temperatura 20-32°C/68-89,6°F
Intervalo de calibração:	0-300 U/ml
Sensibilidade analítica:	1,44 U/ml
<b>Intervalo que pode ser reportado:</b>	<b>1,84 – 300 U/ml</b>
Armazenamento:	a 2-8°C/35-46°F utilize apenas os frascos originais
Número de determinações:	96 tests

## 10 Dados do teste / Características do teste

### 10.1 Sensibilidade analítica

Testar o buffer de amostra 60 vezes no AESKULISA DGP-Check dá um limite de vazio de 0,202 U/ml e 8 amostras negativas baixas para 8 vezes dão um limite de detecção de 1,44 U/ml.

### 10.2 Método de comparação

As microplacas estão revestidas com peptídeos sintéticos, desamidados, derivados de gliadina. Não foi verificada qualquer reactividade cruzada com outros anticorpos.

Foram testados um total de 216 amostras de adultos e pediátricas (para composição, ver a tabela) no AESKULISA DGP-Check e um dispositivo predicado que reage no intervalo que pode ser reportado. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte (foram excluídas amostras do intervalo que pode ser reportado da comparação, mas foram incluídas na validação clínica abaixo):

DGP-Check	AESKULISA	Predicado	
Diagnóstico	POS (>24)	POS	Total
CD	59 (96,7%)	54 (88,5%)	61
Def. CD IgA	14 (93,3%)	15 (100%)	15
CD suspeito	25 (67,6%)	33 (89,2%)	37
Def. CD suspeito IgA	1 (50%)	0 (0%)	2
DH	27 (81,8%)	31 (93,9%)	33
Controlo não DH/CD	3 (5,4%)	2 (3,6%)	56
soro diluído	1 (8,3%)	8 (66,7%)	12
<b>Total</b>	<b>130 (60,2%)</b>	<b>143 (66,2%)</b>	<b>216</b>

DGP-Check		predicado		
		POS (>20)	Neg (≤20)	Total
AESKU	Pos (>24)	122	8	130
	Neg (≤24)	21	65	86
	<b>Total</b>	<b>143</b>	<b>73</b>	<b>216</b>

Acordo positivo	95% C.I.	
85,31% (122/143)	78,59%	90,19%
Acordo negativo		
89,04% (65/73)	79,84%	94,34%
Acordo geral		
86,57% ((122+65)/216)	81,38%	90,49%

(\*) Os acordos foram calculados em relação a resultados equivocados como resultados negativos e positivos baixos, assim como positivos.

Das 22 amostras (desconsiderando 7 amostras diluídas discrepantes) com resultados discrepantes, o AESKULISA superou o dispositivo predicado em 7 casos, com base em informação adicional, como biopsia EMA e resultados de ensaios DGP de outras classes de imunoglobulina.

### 10.3 Avaliação clínica

A sensibilidade diagnóstica de 94,4% e a especificidade de diagnóstico de 97,7% foram calculadas através da utilização de 289 amostras: O CD e DH acima e não DH/CD e auto-imune, controlam amostras que ignoram os resultados para as amostras suspeitas diluídas e com deficiência de IgA (para composição, ver tabela abaixo).

DGP-Check	AESKU	
Grupo de doença	POS (>24)	Total
Controlos auto-ímmunes*	0(0%)	73
CD	77(97,5%)	79
Def. CD IgA	15(93,8%)	16
DH	59(90,8%)	65
Controlos (não DH/CD)	3(5,4%)	56
<b>Total</b>	<b>154(53,3%)</b>	<b>289</b>

(\*) contém amostras adicionais apenas determinadas no AESKULISA e não determinadas no dispositivo predicado e amostra que exibiam uma elevada positividade do intervalo mensurável.

DGP-Check	Diagnóstico		
	POS	NEG	Total
POS>24	151	3	154
NEG ≤24	9	126	135
Total	160	129	289

Sensibilidade de diagnóstico*	95% C.I.	
94,38% (151/160)	89,66%	97,01%
Especificidade de diagnóstico*		
97,67% (126/129)	93,39%	99,21%

\*os resultados equivocados foram considerados negativos

## 10.4 Linearidade

Os soros escolhidos foram testados com este kit e concluiu-se que se diluem de forma linear com um soro negativo de acordo com CLSI EP06-A. Porém, devido à natureza heterogênea dos anticorpos humanos, pode haver amostras que não seguem esta regra.

Composição		Alto			Médio			Baixo		
Amostra pos.	Amostra neg.	Valor médio [U/ml]	Previsto [U/ml]	Recuperação [%]	Valor médio [U/ml]	Previsto [U/ml]	Recuperação [%]	Valor médio [U/ml]	Previsto [U/ml]	Recuperação [%]
100,0%	0,0%	392,5	392,5	100,0%	156,5	156,5	100,0%	14,8	14,8	100,0%
87,5%	12,5%	326,5	343,4	95,1%	131,1	136,9	95,8%	11,2	12,9	86,9%
75,0%	25,0%	287,3	294,4	97,6%	120,4	117,3	102,6%	10,5	11,1	94,6%
67,5%	32,5%	241,0	264,9	90,9%	88,3	105,6	83,6%	7,6	10,0	75,9%
50,0%	50,0%	199,8	196,3	101,8%	78,1	78,2	99,8%	6,5	7,4	88,6%
37,5%	62,5%	159,8	147,2	108,6%	58,5	58,7	99,7%	4,5	5,5	82,0%
25,0%	75,0%	79,2	98,1	80,7%	36,5	39,1	93,3%	3,5	3,7	94,4%
12,5%	87,5%	26,9	49,1	54,8%	11,2	19,6	57,0%	1,2	1,8	62,4%

Tendo estes dados em conta, o intervalo linear para o AESKULISA DGP-Check é desde 1,84 U/ml a 300 U/ml.

## 10.5 Precisão

Para determinar a precisão do ensaio, a variabilidade (intra, inter-ensaio e lote-para-lote) foi avaliada ao examinar a sua capacidade de reprodução em cinco amostras de soro, seleccionadas para representarem um intervalo sobre a curva padrão, em 8 repetições em 5 operações. A variabilidade lote-para-lote foi avaliada ao medir cinco amostras de soro em 8 repetições em 3 lotes diferentes.

Variabilidade inter-ensaio			Variabilidade intra-ensaio			Variabilidade lote-para-lote		
N.º de amostra	Valor médio (U/ml)	CV (%)	N.º de amostra	Valor médio (U/ml)	CV (%)	N.º de amostra	Valor médio (U/ml)	CV (%)
1	11,5	12,2	1	11,53	10,8	1	10,4	12,4
2	18,9	12,2	2	18,88	10,3	2	20,3	10,6
3	28,8	13,0	3	28,83	12,5	3	30,3	11,0
4	64,0	12,0	4	63,98	8,2	4	62,1	8,1
5	128,0	14,4	5	128,01	7,1	5	127,0	8,1

Os critérios de aceitação são  $\leq 15\%$  para amostras positivas,  $\leq 15\%$  para amostras equívocas e  $\leq 25\%$  para amostras negativas.

## 10.6 Calibração

Devido à não existência de uma calibração de referência internacional, este ensaio está calibrado em unidades arbitrárias (U/ml).



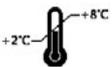
## 10.7 Intervalo normal

Os anticorpos DGP-A estão relatados em até 10% e os anticorpos DGP-G em até 13,7% da população normal.

Foram testadas 133 amostras de sangue aleatórias para verificar os anticorpos DGP-Check. Dessas; 116 estavam entre a faixa etária de 16-45 anos e 17 tinham mais de 46 anos; incluíam um número semelhante de homens e mulheres. Uma amostra (0,8%) foi positiva, seis (4,5%) foram equívocas, com a amostra mais elevada em 28,4 unidades e as restantes amostras foram negativas. O valor médio das amostras foi de 8,2 unidades, com um desvio padrão de 4,4 unidades. O valor médio é 3,6 desvios padrão abaixo do limite de positividade de 24 unidades.

## 11 Bibliografia

- Schwartz E, et al.:** Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. *Clinical Chemistry* 50: 2370-5, 2004.
- Osman AA, et al.:** B-Cell epitopes of gliadin. *Clin Exp Immunol* 121: 248-254, 2000.
- Mothes T.:** Deamidated gliadin peptides as targets for celiac disease-specific antibodies. *Adv Clin Chem.* 44: 35-63, 2007
- Aleanzi M, et al.:** Celiac disease: Antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clinical Chemistry* 47: 2023-8, 2001.
- Richter T, et al.:** Determination of IgG and IgA antibodies against native gliadin is not helpful for the diagnosis of coeliac disease in children up to 2 years old. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 55: 21-5, 2012
- Leffler DA, Schuppan D.:** Update on serologic testing in celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 105: 2520-4, 2010.
- Kurppa K, et al.:** Antibodies against deamidated gliadin peptides in early-stage celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 45: 673-8, 2011.
- Vermeersch P, et al.:** Diagnostic performance of IgG anti-deamidated gliadin peptide antibody assays is comparable to IgA anti-tTG in celiac disease. *Clin Chim Acta.* 411: 931-5, 2010
- Prause C, et al.:** Antibodies against deamidated gliadin as new and accurate biomarkers of childhood coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 49: 52-8, 2009
- Naiyer AJ, et al.:** Comparison of commercially available serologic kits for the detection of celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 43: 225-32, 2009
- Fasano, A.** Surprises from Celiac Disease. *Scientific American.* 2009
- Ivarsson, A., et al.:** Breast-feeding protects against celiac disease. *Am.J.Clin.Nutr.* 75, 914-921, 2002
- Lagerqvist, C., et al.:** Antigliadin immunoglobulin A best in finding celiac disease in children younger than 18 months of age. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 47, 428-435. 2008
- Liu, E. et al.:** Natural history of antibodies to deamidated gliadin peptides and transglutaminase in early childhood celiac disease. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 45, 293-300. 2007
- Losowsky, M.S.** A history of coeliac disease. *Dig.Dis.* 26, 112-120. 2008
- Maglio, M. et al.:** Serum and intestinal celiac disease-associated antibodies in children with celiac disease younger than 2 years of age. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 50, 43-48. 2010
- Not, T. et al.:** Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *ScandJ Gastroenterol* 33, 494-498. 1998
- Salmi, T.T., et al.:** Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. *Gut* 55, 1746-1753. 2006
- Schuppan, D., et al.:** Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology.* 137, 1912-1933. 2009
- Vermeersch, P. et al.** Diagnostic performance of IgG anti-deamidated gliadin peptide antibody assays is comparable to IgA anti-tTG in celiac disease. *Clin.Chim.Acta* 411, 931-935. 2010

<b>IVD</b>	- Diagnosi in vitro - Pour diagnostic in vitro - In Vitro Diagnostikum - Para uso Diagnóstico in vitro	- For in vitro diagnostic use - Para uso diagnóstico in vitro - In Vitro Διαγνωστικό κέζο
<b>REF</b>	° Numero d'ordine ° Référence Catalogue ° Bestellnummer ° Número de catálogo	° Catalogue number ° Numéro de catálogo ° Αριθμός παραγγελίας
<b>LOT</b>	° Descrizione lotto ° Lot ° Chargen Bezeichnung ° Lote	° Lot ° Lote ° Χαραθρηρική κός παρηίδας
<b>CE</b>	° Conformità europea ° Déclaration CE de Conformité ° Europäische Konformität ° Declaração CE de Conformidade	° EC Declaration of Conformity ° Declaración CE de Conformidad ° Εορφηπ αθρή ζ ακθφλτα
	° 96 determinazioni ° 96 tests ° 96 Bestimmungen ° 96 Testes	° 96 tests ° 96 pruebas ° 96 προζ δθρηρική κοί
	° Rispettare le istruzioni per l'uso ° Voir les instructions d'utilisation ° Gebrauchsanweisung beachten ° Ver as instruções de uso	° See instructions for use ° Ver las instrucciones de uso ° Λάθρη ε οπύ ε ηρη οδεγίες τηρής ες
	° Da utilizzarsi entro ° Utilise avant le ° Verwendbar bis ° Utilizar antes de	° Use by ° Utilizar antes de ° Χρήζε κέρρη
	° Conservare a 2-8°C ° Conserver à 2-8°C ° Lagerung bei 2-8°C ° Conservar entre 2-8°C	° Store at 2-8°C (35-46°F) ° Conserver a 2-8°C ° Φαιάζε ζ ετηρής ηρησ 2-8°C
	° Prodotto da ° Fabriqué par ° Hergestellt von ° Fabricado por	° Manufactured by ° Fabricado por ° Καηαζ θεσάδαηηαπύ
<b>CO-CAL</b>	° Calibratore cut-off ° Etalon Seuil ° Grenzwert Kalibrator ° Calibrador de cut-off	° Cut off Calibrator ° Calibrador de cut-off ° Ορηθθός ορηός Αληθρηαζ ηήρηη ηαζ κολόκεζεεζ
<b>CON+</b>	° Controllo positivo ° Contrôle Positif ° Positiv Kontrolle ° Controllo positivo	° Positive Control ° Control Positivo ° Θεηθθός ορηός είε γη οσ
<b>CON-</b>	° Controllo negativo ° Contrôle Négatif ° Negativ Kontrolle ° Controllo negativo	° Negative Control ° Control Negativo ° Αρηε ηθθός ορηός είε γη οσ
<b>CAL</b>	° Calibratore ° Etalon ° Kalibrator ° Calibrador	° Calibrator ° Calibrador ° Αληθρηαζ ηήρηη ηαζ κολόκεζεεζ
<b>RC</b>	° Recupero ° Corrélation ° Wiederfindung ° Recuperação	° Recovery ° Recuperado ° Αλάθρη ζε
<b>CONJ</b>	° Coniugato ° Conjugé ° Konjugat ° Conjugado	° Conjugate ° Conjugado ° Σύδωσκα
<b>MP</b>	° Micropiastro rivestita ° Microplaque sensibilisée ° Beschichtete Mikrotiterplatte ° Microplaca revestida	° Coated microtiter plate ° Microplaca sensibilizada ° Επηθωσ κ κέλε κ θρηρηάθηα
<b>WASHB 50x</b>	° Tampone di lavaggio ° Tampon de Lavage ° Waschpuffer ° Solução de lavagem	° Wash buffer ° Solución de lavado ° Ραζ κ ή ηθθό δ ήηη οκα πύ ζεεζ
<b>SUB</b>	° Tampone substrato ° Substrat ° Substratpuffer ° Substrato	° Substrate buffer ° Tampón sustrato ° Ραζ κ ή ηθθό δ ήηη οκα οπηζ ηηώκαηρη
<b>STOP</b>	° Reagente bloccante ° Solution d'Arrêt ° Stopreagenz ° Solução de paragem	° Stop solution ° Solución de parada ° Αληθρηαζ ηήρηη δ ηηθηπηής αληθρηαζ ες
<b>SB 5x</b>	° Tampone campione ° Tampon Echantillons ° Probenpuffer ° Diluente de amostra	° Sample buffer ° Tampón Muestras ° Ραζ κ ή ηθθό δ ήηη οκα δεηηκ άηηρη