

Reagents

Para Utilização em Diagnóstico *In Vitro*

Utilização prevista

O QUANTA Flash DGP IgG é um imunoensaio quimioluminescente (IEQ) para a determinação semiquantitativa de anticorpos IgG péptidos de gliadina antidesamidados (DGP) no soro humano. A presença dos anticorpos IgG anti-DGP, em conjugação com descobertas clínicas e outros testes laboratoriais, pode auxiliar no diagnóstico de pacientes com doença celíaca tanto IgA suficiente como IgA deficiente, assim como da dermatite herpetiforme.

Resumo e explicação do teste

A doença celíaca (DC) é uma enteropatia sensível ao glúten caracterizada por inflamação e esmagamento histológico característico da mucosa intestinal, resultando numa síndrome de má absorção. A etiologia exata da doença permanece desconhecida, à exceção da gliadina, fração solúvel do álcool de glúten do trigo, que é claramente o agente tóxico.^{1,2}

Anteriormente, era feita uma série de biópsias intestinais múltiplas para diagnosticar a DC e distúrbios relacionados. Mais recentemente, a Sociedade Europeia de Gastrenterologia e Nutrição Pediátrica (ESPGAN)³ e vários outros estudos publicados⁴⁻⁶ recomendaram a utilização de marcadores serológicos, como, por exemplo, antigliadina, anti-DGP e anticorpos endomisiais (EMA), para reduzir o número de biópsias intestinais necessárias para realizar um diagnóstico.

Trabalhos recentes revelaram que os anticorpos de doentes com DC se ligam em número muito limitado a epítomos específicos da molécula de gliadina que foram seletivamente desamidados.⁷⁻⁹

Pensa-se que a desamidação é causada pela enzima associada à doença celíaca, transglutaminase do tecido.¹⁰ Com base nas observações anteriores, foram desenvolvidos ensaios que utilizam péptidos de gliadina desamidados. Possuem uma maior precisão de diagnóstico da DC do que os ensaios padrão antigliadina.^{5,11-14}

Uma estratégia de rastreio sensível para a deteção de pessoas com DC em populações em risco inclui testes para anticorpos IgG e IgA de péptidos de gliadina desamidados, uma vez que uma proporção significativa de doentes celíacos são IgA deficientes.¹² Vários estudos mostram uma elevada utilidade clínica desta estratégia de teste.^{15,11-14}

A dermatite herpetiforme (DH) é um problema de pele virulento e crónico. A maioria dos doentes com DH apresenta atrofia das vilosidades jejunais e sensibilidade ao glúten idêntica à encontrada nos casos de DC, e uma dieta rigorosa sem glúten melhora tanto as lesões intestinais como as dermatológicas.^{16,17} Um estudo detetou que os anticorpos anti-DGP são mais comuns do que os anticorpos anti-tTG em doentes com DH.¹⁸

O QUANTA Flash DGP IgG é um teste com desempenho melhorado para a deteção de anticorpos IgG contra um péptido sintético e seletivamente desamidado, derivado de uma proteína do trigo, a gliadina, e, desse modo, permite a deteção de DC, mesmo com a coexistência de deficiência de IgA.

Princípios do procedimento

O péptido de gliadina desamidado sintético está revestido por esferas paramagnéticas, que estão guardadas no cartucho de reagente em condições que conservam o antigénio no seu estado reativo. Quando o cartucho do ensaio está pronto para ser utilizado pela primeira vez, todo o cartucho é invertido várias vezes até à completa mistura dos reagentes. O cartucho de reagente é então carregado no instrumento BIO-FLASH[®].

O instrumento dilui previamente uma amostra de soro do doente 1:17, utilizando lavagem do sistema adicionada a uma tina plástica descartável. Pequenas quantidades de soro do doente diluído, as esferas de DGP e o tampão de ensaio são todos combinados numa segunda tina e misturados. Incuba-se esta tina a 37 °C. As esferas são então magnetizadas e lavadas várias vezes. Adiciona-se então à tina o anticorpo conjugado de isoluminol e incuba-se a 37 °C. Mais uma vez, as esferas são magnetizadas e lavadas repetidamente. O conjugado de isoluminol produz uma reação luminescente quando se adicionam os reagentes “Ativadores” à tina. A luz produzida a partir desta reação é medida como Unidades Relativas de Luz (URL) pelo sistema ótico BIO-FLASH. As URL são proporcionais à quantidade de conjugado de isoluminol ligado que, por sua vez, é proporcional à quantidade de anticorpos anti-DGP ligados ao DGP nas esferas.

O ensaio QUANTA Flash DGP IgG utiliza uma Curva Modelo específica do lote predefinida que é carregada no instrumento através do código de barras do cartucho de reagente. Baseando-se no resultado obtido com dois calibradores, cria-se uma Curva de Trabalho específica do instrumento, que o software utiliza para calcular unidades quimioluminescentes (UQ) a partir do valor da URL obtido para cada amostra.

Reagentes

1. O cartucho de reagente QUANTA Flash DGP IgG contém os reagentes seguintes para 50 determinações:
 - a. Esferas paramagnéticas revestidas de DGP em tampão, contendo estabilizadores de proteína e conservante.
 - b. Tampão de ensaio – cor-de-rosa, contendo tampão salino Tris, Tween 20, estabilizadores proteicos e conservantes.
 - c. Marcador IgG – anticorpo IgG anti-humano marcado a isoluminol em tampão, contendo estabilizadores proteicos e conservante.

Advertências

1. O tampão de ensaio contém um químico (0,02% cloranfenicol) conhecido no Estado da Califórnia por causar cancro.
2. A azida de sódio é utilizada como conservante. A azida de sódio é venenosa e pode ser tóxica se for ingerida ou absorvida pela pele ou pelos olhos. A azida de sódio pode reagir com componentes de canalizações de chumbo ou cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Por esta razão, ao deitar fora os restos de reagentes, é necessário deixar correr água em quantidade abundante para evitar a acumulação de azida.
3. Usar equipamento de proteção individual apropriado para trabalhar com os reagentes fornecidos.
4. Os salpicos de reagentes devem ser limpos imediatamente. Respeitar todas as regulamentações ambientais, nacionais e locais relativas à eliminação de resíduos.

Precauções

1. Este produto destina-se a utilização para diagnóstico *In Vitro*.
2. Este ensaio destina-se apenas a utilização com o instrumento BIO-FLASH.
3. Uma vez aberto, este cartucho de reagente deve guardar-se no carrossel do reagente do instrumento. Deve ter-se cuidado para evitar entornar os reagentes quando se coloca pela primeira vez o cartucho de reagente no instrumento.
4. A contaminação química dos reagentes pode surgir devido a limpeza ou lavagem inadequada do instrumento. Os resíduos de químicos laboratoriais comuns, como formalina, lixívia, etanol ou detergente, podem causar interferência no ensaio. Certifique-se de que segue o procedimento de limpeza recomendado do instrumento, conforme definido no manual do operador do BIO-FLASH.

Condições de conservação

1. Conserve os cartuchos de reagente por abrir a 2-8 °C. Não congele. Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade indicada, quando conservados e manipulados conforme descrito no protocolo.
2. Devem guardar-se no instrumento os cartuchos de reagentes abertos. O software BIO-FLASH monitoriza as datas de validade (durante a utilização) bem como a data de validade do lote do reagente (período de armazenamento) do cartucho do reagente. O sistema não permite a utilização de um cartucho que tenha expirado.

Colheita, preparação e manuseamento de amostras

Este procedimento deve ser efetuado com uma amostra de soro. As amostras de soro com contaminação microbiana, que sofreram tratamento térmico ou contendo partículas visíveis não devem ser utilizadas. Não deve utilizar-se soro muito hemolizado ou itérico. Após a colheita, o soro deve ser separado do coágulo. O documento H18-A4 da CLSI recomenda as seguintes condições de conservação para as amostras:

1. Não conservar as amostras à temperatura ambiente durante mais de 8 horas.
2. Se o teste não for concluído num prazo de 8 horas, guardar a amostra a 2-8 °C.
3. Se o ensaio não for concluído num prazo de 48 horas, ou para transporte da amostra, congelar a -20 °C ou a uma temperatura inferior. As amostras congeladas devem ser bem agitadas depois de descongelarem e antes de serem testadas.

Procedimento

Materiais fornecidos

- 1 Cartucho de reagente QUANTA Flash DGP IgG

Material adicional necessário mas não fornecido

Instrumento BIO-FLASH com computador

Lavagem do Sistema BIO-FLASH (Número de Peça: 3000-8205)

Ativadores BIO-FLASH (Número de Peça: 3000-8204)

Tinas BIO-FLASH (Número de Peça: 3000-8206)

Calibradores QUANTA Flash DGP IgG (Número de Peça: 701171)

Controlos QUANTA Flash DGP IgG (Número de Peça: 701172)

Utilizar o analisador quimioluminescente BIO-FLASH

1. Consulte o manual do operador fornecido com o sistema BIO-FLASH relativamente a instruções de funcionamento pormenorizadas do analisador quimioluminescente BIO-FLASH e do software BIO-FLASH. Para informações adicionais e resolução de problemas com este ensaio, contacte a assistência técnica da INOVA Diagnostics, Inc. no endereço ou através do número de telefone indicados no final deste Folheto de Instruções.
2. Para esvaziar o recipiente de resíduos sólidos, abra a gaveta dos resíduos. Remova o recipiente de resíduos sólidos e elimine adequadamente as tinas usadas. Substitua o recipiente de resíduos sólidos, feche a gaveta dos resíduos e clique em **Yes** na janela **Empty Waste Drawer**.
3. Para substituir os ativadores, clique no botão **Bulks Inventory F9** (superior direito).
 - a. No ecrã **Inventory – Bulks**, clique no botão **Triggers** do lado esquerdo. Aparecerá uma janela nova intitulada **Add Triggers – Remove old bottles**.
 - b. Abra e retire a gaveta dos resíduos do instrumento BIO-FLASH. Elimine quaisquer tinas da gaveta de resíduos secos. Clique em **Yes** na janela **Empty Waste Drawer**. Retire as garrafas ativadoras dos respetivos suportes e clique no botão **Next**. Desaperte as garrafas antigas de ativadores das tampas e substitua por ativadores novos. Certifique-se de que as coloca uma de cada vez, com as tampas com o código de cores correspondente (branca com branca e vermelha com vermelha).
 - c. Siga as instruções na janela nova **Add Triggers – Add Trigger 2 bottle**. Quando o código de barras tiver sido aceite, coloque o Ativador 2 no suporte com o código de cores branco. Clique em **Next**.
 - d. Siga as instruções da janela **Add Triggers – Add Trigger 1 bottle**. Quando o código de barras tiver sido aceite, coloque o Ativador 1 no suporte com o código de cores vermelho. Clique em **Finish**. Volte a colocar a gaveta dos resíduos e feche-a.
4. Para substituir o recipiente da lavagem do sistema, clique no botão **Bulks Inventory F9** (canto superior direito). No ecrã **Inventory – Bulks**, clique no botão **Sys. Rinse**. Na nova janela **Add System Rinse – Remove bottles**, clique em **Next**. Siga as instruções na janela nova **Add System Rinse – Add bottle**. Quando o código de barras tiver sido aceite, se necessário, clique em **Finish**.
5. Para esvaziar o recipiente de resíduos de fluido, a partir do ecrã **Inventory – Bulks**, clique no botão **Fluid Waste**. Retire e elimine os resíduos de fluido. Clique em **Next**. Quando tiver substituído a garrafa vazia, clique em **Finish**.

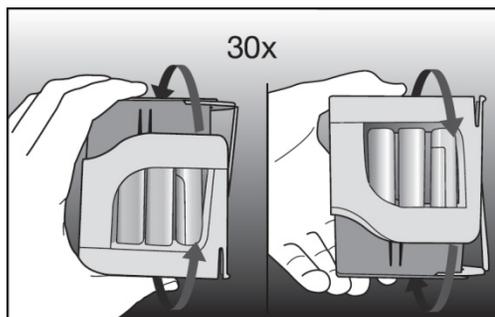
Método

Preparação do cartucho de reagente

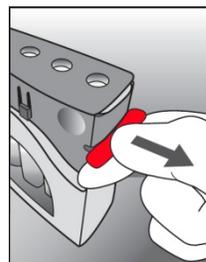
Da primeira vez que utilizar o cartucho de reagente, tem de seguir os passos seguintes para instalar corretamente o cartucho no instrumento BIO-FLASH. Nota: não utilize o cartucho de reagente se observar quaisquer sinais de danos.

Cartucho de reagente QUANTA Flash DGP IgG: as micropartículas ficam depositadas durante o transporte e a conservação e devem ser misturadas para ressuspenderem.

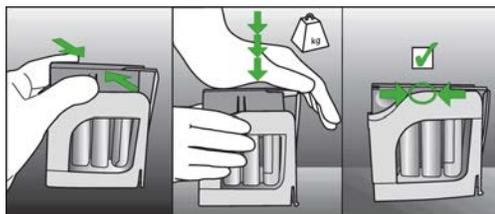
1. Da primeira vez que utilizar o cartucho, inverta suavemente o cartucho 30 vezes, evitando a formação de espuma. Verifique a ressuspensão completa das micropartículas. Se as micropartículas não estiverem totalmente em suspensão, continue a inverter o cartucho até que as micropartículas estejam completamente em suspensão. Se as micropartículas não ficarem em suspensão, **NÃO UTILIZE O CARTUCHO.**



2. Assim que as micropartículas ficarem em suspensão, coloque o cartucho de reagente numa superfície sólida para remover a patilha vermelha. Com uma mão, segure o cartucho de reagente no lugar. Com a outra mão, segure firmemente a patilha vermelha na parte de trás do cartucho de reagente e puxe-a totalmente para fora.



3. Enquanto pressiona as duas patilhas nos lados da tampa perfurada (parte cinzenta), exerça pressão na parte superior do cartucho de reagente até encaixar numa posição bloqueada. As patilhas deverão deixar de estar visíveis. **NÃO VIRE O CARTUCHO ABERTO.**



4. Coloque cuidadosamente o cartucho de reagente em qualquer ranhura aberta no carrossel do reagente do instrumento BIO-FLASH.

Calibração do ensaio

1. Cada lote novo de cartucho de reagente tem de ser calibrado antes da primeira utilização. O software não permitirá utilizar um lote novo até que seja calibrado.
2. Consulte a secção intitulada **QUANTA Flash® DGP IgG Calibrators 701171** deste Folheto de Instruções relativamente a instruções pormenorizadas sobre como calibrar o cartucho de reagente.
3. Quando a calibração tiver sido validada, o lote do cartucho de reagente onde se realizou a calibração está pronto a ser utilizado.

Programação e realização de testes

1. Pressione o botão **Worklist** na parte superior do ecrã e selecione o separador **Racks** no fundo.
2. Selecione o *rack* de amostras a utilizar realçando o *rack* no ecrã ou digitalizando o código de barras com o leitor de código de barras portátil. Digitalize ou escreva o nome da amostra, selecione o tipo de amostra, o tipo de recipiente (tubo/taça) e selecione DGP IgG a partir do painel do ensaio. Repita estes passos para todas as amostras.
3. Carregue as amostras nas posições selecionadas no *rack* de amostras e carregue o *rack* no carrossel de amostras do instrumento.
4. Se todos os materiais necessários estiverem colocados no instrumento, o ícone **Start F4** estará disponível, a verde, na parte superior do ecrã. Pressione o ícone **Start F4** para iniciar o ensaio.

Controlo de qualidade

Os Controlos QUANTA Flash DGP IgG (vendidos em separado - INOVA Número de Item 701172) contêm os Controlos DGP IgG Positivos e Negativos. Consulte a secção intitulada **QUANTA Flash® DGP IgG Controls 701172** do Folheto de Instruções relativamente a instruções pormenorizadas sobre como introduzir todas as informações necessárias de cada controlo no software, bem como sobre o funcionamento dos controlos. Recomenda-se que se testem os controlos pelo menos uma vez nos dias em que se utiliza o ensaio; no entanto, os utilizadores também deverão considerar os requisitos regulamentares locais/nacionais.

Cálculo dos resultados

Para cada lote novo de QUANTA Flash DGP IgG cria-se uma Curva Modelo de seis pontas. Os parâmetros da curva estão codificados no código de barras de cada cartucho de reagente. Durante a calibração, será utilizada uma curva de trabalho específica para o instrumento para converter valores URL em UQ. Pode então classificar-se a reatividade do anticorpo IgG para DGP de acordo com a tabela abaixo.

<u>Reatividade</u>	<u>UQ</u>
Negativa	<20
Positivo Fraco	20-30
Positiva	>30

A reatividade em UQ está diretamente relacionada com o título do anticorpo na amostra do doente. Os aumentos e as diminuições nas concentrações do anticorpo no doente refletir-se-ão numa subida ou descida correspondente em UQ, proporcionalmente à quantidade de anticorpo.

O intervalo de medição analítica (IMA) do ensaio (determinado pelos pontos superiores e inferiores da Curva Modelo) situa-se entre 2,8 UQ e 1936,7 UQ, o que corresponde ao intervalo linear do ensaio. Se o resultado de um doente for inferior a 2,8 UQ, então o sistema BIO-FLASH indicá-lo-á como "<2,8 UQ". Visto ser inferior a 20 UQ, considera-se um resultado negativo. Se o resultado de um doente for superior a 1936,7 UQ, então o sistema BIO-FLASH indicá-lo-á como ">1936,7 UQ". Este é considerado um resultado positivo. O software BIO-FLASH disponibiliza uma opção de Novo teste automático. Se estiver selecionada esta opção, o instrumento retestará automaticamente qualquer amostra que tenha um resultado >1936,7 UQ diluindo-a mais por um fator de 10, colocando o valor medido dentro do IMA. O resultado final será calculado pelo software tendo em conta o fator de diluição adicional. Uma vez que o valor mais elevado que pode ser medido é 1936,7 UQ, o valor mais elevado que pode ser apresentado é 19 367 UQ.

Interpretação dos resultados

Cada laboratório é aconselhado a verificar o intervalo de referência fornecido pelo fabricante e pode estabelecer o seu próprio intervalo normal baseando-se nos seus próprios controlos e na população de doentes, de acordo com os procedimentos estabelecidos pelo mesmo.

Sugere-se que os resultados apresentados pelo laboratório incluam a declaração: “Obtiveram-se os resultados seguintes com o imunoensaio quimioluminescente INOVA QUANTA Flash DGP IgG. Os valores obtidos com métodos de ensaio de diferentes fabricantes não podem ser comparados.”

Limitações do procedimento

1. Nem todos os doentes com DC ou DH são positivos para anticorpos IgG DGP.
2. Os resultados deste ensaio devem ser utilizados em conjunto com as conclusões clínicas e outros testes serológicos.
3. A mistura inadequada dos reagentes antes da primeira utilização pode levar a resultados erróneos.
4. As características de desempenho deste ensaio não foram determinadas para outras matrizes além do soro.

Valores esperados

O resultado esperado na população normal é “negativo”. A prevalência de DC na população de referência que não se encontra em risco é de aproximadamente 1%¹⁹, por isso pode esperar-se resultados positivos ocasionais quando se testam indivíduos saudáveis. Quando amostras de soro de 232 indivíduos aparentemente saudáveis foram testadas com o QUANTA Flash DGP IgG IEQ na INOVA Diagnostics, encontrou-se quatro resultados positivos e um positivo fraco.

Comparação do método com dispositivo implicado

As amostras para a análise de comparação do método incluíram as amostras dos estudos de validação clínica (doentes com DC, sem DC e com DH) que estavam dentro do intervalo de medição analítica do ensaio. Testaram-se estas amostras no QUANTA Flash DGP IgG e no dispositivo implicado ELISA.

Comparação de métodos (N=241)		DGP IgG ELISA			Concordância de Percentagem (Intervalo de segurança de 95%)
		Positivo	Negativo	Total	
QUANTA Flash® DGP IgG IEQ	Positivo	78	26*	104	Concordância Pos. = 95,1% (88,0-98,7%)
	Negativo	4**	133	137	Concordância Neg. = 83,6% (77,0-89,0%)
	Total	82	159	241	Concordância Total = 87,6% (82,7-91,4%)

*Treze amostras são de doentes com DC; três com uma dieta sem glúten. Uma amostra é de um doente suspeito de ter DC que é positivo a IgA anti-DGP. Duas amostras têm gastrite H. pylori, duas têm hepatite viral e uma tem artrite reumatoide. Um doente, com um hemograma baixo, é positivo a IgG anti-h-tTG. As restantes 6 amostras são de indivíduos aparentemente saudáveis; um tinha sintomas gastrointestinais na altura da colheita da amostra; dois são positivos a IgA anti-h-tTG.

**Três amostras são de doentes com DC e uma de um doente com DH.

Sensibilidade e especificidade clínicas

O estudo de validação clínica incluiu 62 amostras de doentes com DC da biblioteca de soros da INOVA (incluindo 7 com deficiência IgA seletiva), 87 controlos de doença não celíaca e 23 amostras de doentes com DH. Um estudo externo independente incluiu 102 amostras de DC (incluindo 9 com deficiência IgA seletiva), 151 amostras de indivíduos sintomáticos à procura de ajuda médica a quem se exclui DC após um exame físico e testes de diagnóstico, e 98 controlos de doença. Todas as amostras foram testadas com o QUANTA Flash DGP IgG. Os resultados foram analisados para calcular a sensibilidade e especificidade para DC (n=148), DC com deficiência IgA seletiva (n=16) e DH (n=23) em separado.

Sensibilidade e especificidade clínicas do ensaio QUANTA Flash DGP IgG em DC:

N=484		Diagnóstico			Análise (Intervalo de segurança de 95%)
		DC	Não DC	Total	
QUANTA Flash® DGP IgG	Positivo	132	9*	141	Sensibilidade = 89,2% (83,0-93,7%)
	Negativo	16**	327	343	Especificidade = 97,3% (95,0-98,8%)
	Total	148	336	484	

* Dois doentes têm gastrite H. pylori, dois têm hepatite viral e um tem artrite reumatoide. As restantes amostras são de indivíduos aparentemente saudáveis; dois são positivos a DGP IgG EIA.

**Entre 13 doentes com dados ELISA, 10 eram DGP IgG EIA negativos.

Sensibilidade e especificidade clínicas do ensaio QUANTA Flash DGP IgG em DC IgA deficiente:

N=352		Diagnóstico			Análise (Intervalo de segurança de 95%)
		DC (IgA deficiente)	Não DC	Total	
QUANTA Flash® DGP IgG	Positivo	9	9	18	Sensibilidade = 56,3% (29,9-80,2%)
	Negativo	7	327	334	Especificidade = 97,3% (95,0-98,8%)
	Total	16	336	352	

Sensibilidade e especificidade clínicas do ensaio QUANTA Flash DGP IgG em DH:

N=359		Diagnóstico			Análise (Intervalo de segurança de 95%)
		DH	Não DH	Total	
QUANTA Flash® DGP IgG	Positivo	16	9*	25	Sensibilidade = 69,6% (47,1-86,8%)
	Negativo	7**	327	334	Especificidade = 97,3% (95,0-98,8%)
	Total	23	336	359	

*Duas amostras têm gastrite H. pylori, duas têm hepatite viral e uma tem artrite reumatoide. As restantes amostras são de indivíduos aparentemente saudáveis; dois são positivos a DGP IgG EIA.

**Cinco amostras eram também negativas a DGP IgG EIA.

Distribuição da população de controlo da doença utilizada no estudo de validação:

Grupo de doentes	N	Negativo	Positivo	Percentagem de positivos
Doença do fígado autoimune	5	5	0	0%
Hepatite viral	31	29	2	6%
Doença inflamatória intestinal (Chron +CU)	17	17	0	0%
Infeção da <i>H. pylori</i>	17	15	2	12%
Alergia alimentar	9	9	0	0%
Doença reumática sistémica	12	12	0	0%
Doença autoimune da tiroide	22	22	0	0%
Doentes com sintomas gastrointestinais	11	11	0	0%
Diabetes mellitus tipo 1	14	14	0	0%
Artrite reumatoide	37	36	1	3%
Outra doença infecciosa (VIH, Sífilis)	10	10	0	0%
Total	185	180	5	3%

Resumo dos valores de sensibilidade e especificidade clínicas em DC de acordo com grupos etários:

Faixa etária	DGP IgG	
	Sensibilidade, %	Especificidade, %
1 mês – 2 anos	66,7	94,6
2 anos – 12 anos	95,6	96,1
12-21 anos	75,0	100,0
>21 anos	89,4	97,8
< 21 anos (total)	88,9	96,4
Total	89,2	97,3

Precisão e reprodutibilidade

A precisão do ensaio QUANTA Flash DGP IgG foi avaliada em 8 amostras contendo várias concentrações de anticorpos IgG DGP de acordo com o CLSI EP5-A2. Abaixo, encontram-se os dados resumidos:

Amostra	Número de réplicas	Média (UQ)	Durante os Testes		Entre Testes		Entre Dias		Total	
			DP (UQ)	CV (%)	DP (UQ)	CV (%)	DP (UQ)	CV (%)	DP (UQ)	CV (%)
1	80	5,8	0,2	3,1%	0,1	2,5%	0,1	2,0%	0,3	4,5%
2	80	16,8	0,5	3,0%	0,1	0,5%	0,2	1,5%	0,6	3,3%
3	80	20,7	0,5	2,5%	0,3	1,3%	0,5	2,2%	0,7	3,6%
4	80	24,6	0,5	1,9%	0,5	1,8%	0,4	1,5%	0,7	3,0%
5	80	85,1	1,9	2,2%	0,8	0,9%	2,5	2,9%	3,2	3,8%
6	80	411,6	7,7	1,9%	6,8	1,6%	9,4	2,3%	13,9	3,4%
7	80	791,0	24,3	3,1%	16,2	2,0%	5,9	0,7%	29,8	3,8%
8	80	1781,4	52,1	2,9%	27,9	1,6%	48,3	2,7%	76,3	4,3%

Para além disso, foram também realizados estudos de precisão em três locais de teste diferentes (INOVA Diagnostics, Inc., e dois locais de teste externos) para avaliar a reprodutibilidade. Dois lotes de reagentes, dois lotes de calibradores e dois operadores foram incluídos como variáveis no local de teste da INOVA. A Reprodutibilidade Total foi calculada com base na precisão durante os testes, entre testes, entre lotes, entre lotes de calibradores, entre operadores e entre locais:

Amostra	Média (UQ)	Número de réplicas	Durante os Testes		Entre Testes		Entre Lotes de Reagentes		Entre Lotes de Calibradores		Entre Operadores		Entre Locais		Total	
			DP (UQ)	CV (%)	DP (UQ)	CV (%)	DP (UQ)	CV (%)	DP (UQ)	CV (%)	DP (UQ)	CV (%)	DP (UQ)	CV (%)	DP (UQ)	CV (%)
Amostra n.º 1	13,4	80	0,3	2,6	0,8	5,9	0,5	4,0	1,0	7,5	0,5	3,6	1,0	8,1	1,8	13,5
Amostra n.º 2	21,0	80	0,5	2,3	1,2	5,5	0,7	3,5	1,5	7,3	0,8	4,0	1,5	7,6	2,7	12,9
Amostra n.º 3	118,9	80	2,8	2,4	5,9	4,9	2,8	2,3	2,8	2,3	4,7	4,0	9,4	8,1	13,0	10,9

Intervalo de Medição Analítica

De acordo com a CLSI EP17-A, o limite de deteção inferior deste ensaio é 469,2 URL, o que está abaixo do intervalo de medição analítica (2,8 UQ). O intervalo de medição analítico, desde 2,8 UQ até 1936,7 UQ, é linear. Realizou-se um estudo de linearidade de acordo com a CLSI EP6-A utilizando seis amostras de soro com várias concentrações de DGP IgG. As seis amostras mostraram linearidade de diluição individualmente e os dados combinados apresentaram os resultados seguintes com regressão linear:

Amostra	Intervalo do Teste (UQ)	Inclinação (95% IS)	Interceção Y (95% IS)	R ²
Todas as Amostras	1,9 a 2565,4	1,03 (1,02 a 1,04)	4,78 (-4,99 a 14,54)	1,00

As amostras positivas com resultados acima do intervalo de medição analítica não mostram efeito de gancho até 4323,7 UQ no ensaio DGP IgG.

Interferência, reatividade cruzada

Não se detetou nenhuma interferência com até 200 mg/dl de hemoglobina, 1000 mg/dl de triglicéridos, 224,3 mg/dl de colesterol, 10 mg/dl de bilirrubina e 500 UI/ml de FR IgM.

Testaram-se cento e oitenta e cinco amostras de doentes com várias doenças autoimunes e infecciosas para avaliar reatividade cruzada. Duas das 31 amostras com hepatite viral, duas das 17 com infeção da H. pylori e uma das 37 com artrite reumatoide eram positivas a DGP IgG IEQ. Em conjunto, cinco das 185 amostras (3%) eram positivas, indicando a falta de reatividade cruzada.

Calibrators

Para Utilização em Diagnóstico *In Vitro*

Utilização prevista

Os Calibradores QUANTA Flash DGP IgG destinam-se a utilização com o imunoensaio quimioluminescente (IEQ) QUANTA Flash DGP IgG. Cada calibrador estabelece um ponto de referência para a curva de trabalho utilizada para determinar valores de Unidades Quimioluminescentes (UQ) na medição de anticorpos IgG anti-DGP em soro.

Resumo e princípios do procedimento

O QUANTA Flash DGP IgG IEQ utiliza uma Curva Modelo específica do lote predefinida que está armazenada no código de barras do cartucho de reagente. Os Calibradores QUANTA Flash DGP IgG estão concebidos para produzir uma Curva de Trabalho específica do instrumento, a partir de parâmetros da Curva Modelo, com um ponto de decisão baseado nas características de desempenho e na avaliação clínica do QUANTA Flash DGP IgG IEQ. Antes da atribuição do valor, testam-se os calibradores em vários instrumentos com diversos lotes de reagentes.

Reagentes

1. Calibrador 1 QUANTA Flash DGP IgG: dois (2) tubos marcados com código de barras, contendo 0,3 ml de reagente pré-diluído pronto a usar. Calibradores contendo anticorpos humanos IgG para DGP em solução tampão, estabilizadores proteicos e conservantes.
2. Calibrador 2 QUANTA Flash DGP IgG: dois (2) tubos marcados com código de barras, contendo 0,3 ml de reagente pré-diluído pronto a usar. Calibradores contendo anticorpos humanos IgG para DGP em solução tampão, estabilizadores proteicos e conservantes.

Advertências

1. Os calibradores contêm um químico (0,02% cloranfenicol) conhecido no Estado da Califórnia por causar cancro.
2. A azida de sódio é utilizada como conservante. A azida de sódio é venenosa e pode ser tóxica se for ingerida ou absorvida pela pele ou pelos olhos. A azida de sódio pode reagir com componentes de canalizações de chumbo ou cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Por esta razão, ao deitar fora os restos de reagentes é necessário deixar correr água em quantidade abundante para evitar a acumulação de azida.
3. Todo o material de origem humana utilizado na preparação dos calibradores deste produto foi testado e deu resultados negativos com métodos aprovados pela FDA para anticorpos de VIH, HBsAg e VHC. Contudo, nenhum teste pode garantir com certeza absoluta a ausência de VIH, VHB, VHC ou outros agentes infecciosos. Portanto, devem manipular-se os Calibradores QUANTA Flash DGP IgG como se fossem qualquer material potencialmente infeccioso.²⁰
4. Usar equipamento de proteção individual apropriado para trabalhar com os reagentes fornecidos.
5. Os salpicos de reagentes devem ser limpos imediatamente. Respeitar todas as regulamentações ambientais, nacionais e locais relativas à eliminação de resíduos.

Precauções

1. Este produto destina-se a utilização para diagnóstico *In Vitro*.
2. Os calibradores QUANTA Flash DGP IgG destinam-se a utilização com o ensaio QUANTA Flash DGP IgG.
3. Não transfira os reagentes calibradores para tubos secundários. O instrumento utiliza os códigos de barras nos tubos para combinar os calibradores com o tipo de ensaio adequado.
4. Após aberto, um tubo calibrador mantém-se bom durante um período de 8 horas quando deixado destapado, inserido no instrumento, após o qual o reagente tem de eliminar-se.
5. A contaminação química dos reagentes pode surgir devido a limpeza ou lavagem inadequada do instrumento. Os resíduos de químicos laboratoriais comuns, como formalina, lixívia, etanol ou detergente, podem causar interferência no ensaio. Certifique-se de que segue o procedimento de limpeza recomendado do instrumento, conforme definido no manual do operador do BIO-FLASH.

Condições de conservação

1. Conserve os calibradores por abrir a 2-8 °C. Não congele. Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade indicada, quando conservados e manipulados conforme descrito no protocolo.
2. Devem eliminar-se os calibradores abertos após 8 horas.

Procedimento

1. Cada lote novo de cartucho de reagente tem de ser calibrado antes da primeira utilização. O software não permitirá utilizar um lote novo até que seja calibrado.
2. Antes da utilização, tem de misturar-se suavemente cada calibrador para garantir a homogeneidade. Evite a formação de espuma, uma vez que as bolhas podem interferir com a deteção do nível do líquido dos instrumentos. Destape cada tubo calibrador e coloque ambos num *rack* de amostras, com os códigos de barras virados para a frente através dos espaços no *rack*. Coloque o *rack* de amostras no carrossel de amostras do instrumento BIO-FLASH e feche a porta. O instrumento lerá os códigos de barras nos tubos calibradores e identificará o cartucho de reagente necessário. Consulte o manual do operador fornecido com o sistema BIO-FLASH relativamente a instruções de funcionamento pormenorizadas do analisador quimioluminescente BIO-FLASH e do software BIO-FLASH.
3. O instrumento testará então cada calibrador em triplicado. Após os Calibradores terem sido testados, o software exigirá a validação da calibração. A partir do ecrã **Instrument Summary**, clique no botão de seta **Choose more options – Ctrl-M (▼)**. Selecione **Calibration Ctrl-F3**. Na janela Calibração, realce o ensaio pretendido e clique em **Details**.
4. Na nova janela **Calibration Details**, selecione a calibração que acabou de ser executada. A Curva Modelo aparece como uma linha tracejada, ao passo que a Curva de Trabalho aparece como uma linha contínua. Se os resultados da calibração forem válidos, aparecerá um botão de validação no canto inferior esquerdo do ecrã. Clique no botão **Validate Calibration**.
5. Quando a calibração tiver sido validada, o lote do cartucho de reagente onde se realizou a calibração está pronto a ser utilizado. Recomenda-se testar os Controlos QUANTA Flash DGP IgG (vendidos separadamente – número de peça 701172) após a calibração de um lote de cartucho de reagente.

Rastreabilidade

Atualmente, não existe nenhuma norma internacional reconhecida para a medição de anticorpos IgG de péptido de gliadina antidesamidado.

Limitações

Estes calibradores estão concebidos para 4 calibrações. O tempo total em que os tubos calibradores podem estar destapados dentro do instrumento é de 8 horas. Se se deixarem os calibradores destapados, dentro do instrumento, durante mais tempo, deverão ser eliminados. Utilizar os mesmos tubos calibradores mais de 8 horas pode originar uma calibração incorreta do ensaio que, por sua vez, pode fornecer resultados errados.

Controls

Para Utilização em Diagnóstico *In Vitro*

Utilização prevista

Utilizam-se os Controlos QUANTA Flash DGP IgG para controlo da qualidade do kit de imunoensaio quimioluminescente (IEQ) QUANTA Flash DGP IgG.

Resumo e princípios do procedimento

Os Controlos QUANTA Flash DGP IgG são constituídos por um Controlo Negativo e um Controlo Positivo. Cada um contém uma quantidade diferente de anticorpos IgG anti-DGP. O Controlo Negativo e o Controlo Positivo são utilizados para monitorizar o desempenho analítico do imunoensaio quimioluminescente QUANTA Flash DGP Screen.

Reagentes

1. Controlo negativo QUANTA Flash DGP IgG: dois (2) tubos marcados com código de barras, contendo 0,5 ml de reagente pronto a usar. Controlos contendo anticorpos humanos IgG para DGP em solução tampão, estabilizadores proteicos e conservantes.
2. Controlo positivo QUANTA Flash DGP IgG: dois (2) tubos marcados com código de barras, contendo 0,5 ml de reagente pronto a usar. Controlos contendo anticorpos humanos IgG para DGP em solução tampão, estabilizadores proteicos e conservantes.

Advertências

1. Os controlos contêm um químico (0,02% cloranfenicol) conhecido no Estado da Califórnia por causar cancro.
2. A azida de sódio é utilizada como conservante. A azida de sódio é venenosa e pode ser tóxica se for ingerida ou absorvida pela pele ou pelos olhos. A azida de sódio pode reagir com componentes de canalizações de chumbo ou cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Por esta razão, ao deitar fora os restos de reagentes é necessário deixar correr água em quantidade abundante para evitar a acumulação de azida.
3. Todo o material de origem humana utilizado na preparação dos controlos deste produto foi testado e deu resultados negativos com métodos aprovados pela FDA para anticorpos de VIH, HBsAg e VHC. Contudo, nenhum teste pode garantir com certeza absoluta a ausência de VIH, VHB, VHC ou outros agentes infecciosos. Portanto, devem manipular-se os Controlos QUANTA Flash DGP IgG como se fossem qualquer material potencialmente infeccioso.²⁰
4. Usar equipamento de proteção individual apropriado para trabalhar com os reagentes fornecidos.
5. Os salpicos de reagentes devem ser limpos imediatamente. Respeitar todas as regulamentações ambientais, nacionais e locais relativas à eliminação de resíduos.

Precauções

1. Este produto destina-se a utilização para diagnóstico *In Vitro*.
2. Os Controlos QUANTA Flash DGP IgG destinam-se a ser utilizados com o ensaio QUANTA Flash DGP IgG.

3. Não transfira os reagentes do controlo para tubos secundários. O instrumento utiliza os códigos de barras nos tubos para identificar o controlo.
4. Uma vez aberto, cada tubo de controlo está em condições de ser utilizado até 15 vezes, com um tempo médio de **10 minutos** inserido no instrumento **por utilização**, durante um total de duas horas e meia.
5. A contaminação química dos reagentes pode surgir devido a limpeza ou lavagem inadequada do instrumento. Os resíduos de químicos laboratoriais comuns, como formalina, lixívia, etanol ou detergente, podem causar interferência no ensaio. Certifique-se de que segue o procedimento de limpeza recomendado do instrumento, conforme definido no manual do operador do BIO-FLASH.

Condições de conservação

1. Conserve os controlos por abrir a 2-8 °C. Não congele. Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade indicada, quando conservados e manipulados conforme descrito no protocolo.
2. Os controlos estão concebidos para 15 utilizações, com um tempo médio de 10 minutos inserido no instrumento por utilização. O tempo total que os tubos de controlo podem estar destapados, inseridos no instrumento, é de 2 horas e meia. Se se deixarem os controlos abertos, colocados no instrumento, por um período total superior a 2 horas e meia, deverão ser eliminados.
3. Para a estabilidade ideal, retire os controlos do sistema imediatamente após a amostragem e guarde-os a 2-8 °C tapados no frasco original.

Procedimento

Para criar novos materiais de CQ para o ensaio DGP IgG:

1. Antes de utilizar Controlos QUANTA Flash DGP IgG pela primeira vez no instrumento, tem de introduzir no software o nome, o lote, a data de validade, o valor (ou dose) e as informações de DP alvo.
2. A partir do ecrã **Instrument Summary**, clique no botão de seta **Choose more options – Ctrl-M (▼)**. Selecione **QC Ctrl-F2**. Clique no botão **New QC Material**.
3. Com cada conjunto de Controlos está incluída uma ficha de dados específica do lote. Introduza primeiro o nome, o número do lote e a data de validade desta folha de dados no software. Em seguida, clique no botão **Add Assay**. Na nova janela, certifique-se de que a caixa **Show All Assays** está assinalada. Selecione o ensaio DGP_IgG da lista e clique em **Add**. Por fim, introduza a dose alvo e o DP alvo. Clique em **Save**. Execute este processo para ambos os controlos.

Para criar um novo lote para materiais de CQ existentes:

1. Antes de utilizar um lote novo de Controlos QUANTA Flash DGP IgG pela primeira vez, tem de introduzir no software o lote, a data de validade, o valor (ou dose) e as informações de DP alvo.
2. A partir do ecrã **Instrument Summary**, clique no botão de seta **Choose more options – Ctrl-M (▼)**. Selecione **QC Ctrl-F2**. Realce o ensaio DGP_IgG na coluna do lado esquerdo. Em seguida, realce o material do controlo adequado à direita (“DGPGN” para o Controlo Negativo ou “DGPGP” para o Controlo Positivo). Clique no botão **New QC Lot**.
3. Com cada conjunto de Controlos está incluída uma ficha de dados específica do lote. Introduza as informações desta ficha de dados no software. Estas deverão incluir o número do lote, a data de validade, a dose alvo e o DP alvo. Se necessário, clique no botão **Add Assay**. Na nova janela, certifique-se de que a caixa **Show All Assays** está assinalada. Selecione o ensaio DGP_IgG da lista e clique em **Add**. Clique em **Save**. Execute este processo para ambos os controlos.

Recomenda-se a utilização dos Controlos QUANTA Flash DGP IgG uma vez por cada dia que se utilize o ensaio; no entanto, os utilizadores também deverão considerar os requisitos regulamentares locais/nacionais.

Antes da utilização, tem de misturar-se suavemente cada controlo para garantir a homogeneidade. Evite a formação de espuma, uma vez que as bolhas podem interferir com a deteção do nível do líquido dos instrumentos. Destape cada tubo de controlo e coloque ambos num *rack* de amostras, com os códigos de barras virados para a frente através dos espaços no *rack*. Coloque o *rack* de amostras no carrossel de amostras do instrumento BIO-FLASH e feche a porta. O instrumento lerá os códigos de barras nos tubos de controlo e identificará o cartucho de reagente necessário. Consulte o manual do operador fornecido com o sistema BIO-FLASH relativamente a instruções de funcionamento pormenorizadas do analisador quimioluminescente BIO-FLASH e do software BIO-FLASH.

Rastreabilidade

Atualmente, não existe nenhuma norma internacional reconhecida para a medição de anticorpos IgG de péptido de gliadina antidesamidado.

Limitações

Estes controlos estão concebidos para 15 utilizações. A etiqueta de cada tubo de controlo tem uma fila de 15 caixas que podem marcar-se para verificar o número de utilizações. O tempo total que os tubos de controlo podem estar destapados, inseridos no instrumento, é de 2 horas e meia. Se se deixarem os controlos abertos, colocados no instrumento, durante mais tempo, deverão ser eliminados.

Referências

1. Trier JS: **Celiac Sprue**. *New England Journal of Medicine* 1991, **325**: 1709-1719.
2. Troncone R and Ferguson A: **Antigliadin antibodies**. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991, **12**: 150-158.
3. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Leigeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. **European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease**. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012, **54**: 136-60.
4. McMillan SA, Haughton DJ, et al.: **Predictive value for coeliac disease of antibodies to gliadin, endomysium and jejunum in patients attending for jejunal biopsy**. *BMJ* 1991, **303**: 1163-1165.
5. Sugai E, Moreno ML et al: **Celiac disease serology in patients with different pre-test probabilities: Is biopsy avoidable?** *World J Gastroenterol* 2010, **16**: 3144-52.
6. Burgin-Wolff A, Gaze H, et al.: **Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease**. *Arch Dis Child* 1991, **66**: 941-947.
7. Osman AA, et al.: **B-Cell epitopes of gliadin**. *Clin Exp Immunol* 2000, **121**: 248-254.
8. Aleanzi M, et al.: **Celiac disease: Antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides**. *Clinical Chemistry* 2001, **47**: 2023-2028.
9. Schwertz E, et al.: **Serologic assay based on gliadin-related nonpeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease**. *Clinical Chemistry* 2004, **50**: 2370-2375.
10. Fleckenstein B, Qiao S-W, et al: **Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides**. *J Biol Chem* 2004, **279**: 17607-16.
11. Prince HE: **Evaluations of the INOVA Diagnostics Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Measuring Serum Immunoglobulins G (IgG) and IgA to Deamidated Gliadin Peptides**. *Clinical and Vaccine Immunology* 2006, **13**: 150-151.
12. Sugai E, et al.: **Accuracy of Testing Antibodies to Synthetic Gliadin-Related Peptides in Celiac Disease**. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2006, **4**: 1112-1117.
13. Kurppa K, Lindfors K, et al: **Antibodies against deamidated gliadin peptides in early stage celiac disease**. *J Clin Gastroenterol* 2010 (epub ahead of print).
14. Volta U, Granito A, et al: **Deamidated gliadin peptide antibodies as a routine test for celiac disease**. *J Clin Gastroenterol* 2010, **44**: 186-90.
15. Collin P, et al.: **Selective IgA deficiency and coeliac disease**. *Scand Journal Gastroenterology* 1992, **27**: 367-371.
16. Smecuol E, et al.: **Permeability, Zonulin Production, and Enteropathy in Dermatitis Herpetiformis**. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2005, **3**: 335-341.
17. Beutner EH, et al.: **Sensitivity and Specificity of IgA-class anti-endomysial antibodies for dermatitis herpetiformis and findings relevant to their pathogenic significance**. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1986, **15**: 464-473.
18. Jaskowski TD, Donaldson MR et al: **Novel screening assay performance in pediatric celiac disease and adult dermatitis herpetiformis**. *JPGN* 2010, **51**: 19-23.
19. Fasano A, Berti I, et al: **Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study**. *Arch Intern Med* 2003, **163**: 286-92.
20. **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories**. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 2009, Fifth Edition.

Símbolos utilizados

	Dispositivo médico para diagnóstico <i>In Vitro</i>
	Consultar as instruções de utilização
	Limite de temperatura
	Não reutilizar
	Riscos biológicos
	Código do lote
	Número de catálogo
	Utilizar até
	Fabricante
	Representante autorizado
	Contém o suficiente para < n > testes
	Controlo Positivo
	Controlo Negativo
	Calibrador 1
	Calibrador 2
	Reciclar a caixa de papel
	Este lado para cima

QUANTA Flash é uma marca comercial registada da INOVA Diagnostics Inc. BIO-FLASH é uma marca comercial registada da Biokit S.A. © 2013

Fabricado por:
INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
Estados Unidos da América
Assistência Técnica (apenas EUA e Canadá): 877-829-4745
Assistência Técnica (Fora dos EUA): 1 858-805-7950
support@inovadx.com

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

621170PRT

Dezembro de 2013
Revisão 2

