

Anti peptidi Gliadina deamidati (DGP) IgA

Determinazione quantitativa degli anticorpi IgA contro i peptidi di Gliadina deamidati (DGP) nel siero o nel plasma umano.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



Σ = 96 test

REF E-21D

DESTINAZIONE D'USO

Il kit **Anti peptidi Gliadina deamidati (DGP) IgA** è un test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida sviluppato per la determinazione quantitativa degli anticorpi di classe IgA diretti contro i peptidi di Gliadina deamidati (DGP), presenti nel siero o nel plasma umano.

Il kit **Anti peptidi Gliadina deamidati (DGP) IgA** è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il morbo celiaco, noto anche come enteropatia sensibile al glutine, è innanzitutto una malattia dell'organismo infantile. E' causata da una reazione di ipersensibilità in risposta alla gliadina, una proteina presente in molti cereali. Questa allergia alimentare non mediata da IgE porta a disturbi massivi di malassorbimento ed è caratterizzata dalla totale atrofia dei villi e iperplasia delle cripte dell'intestino superiore. Di conseguenza i pazienti affetti da morbo celiaco devono mantenere una dieta priva di glutine per il resto della loro vita. Le gliadine sono proteine che contengono una elevata quantità di aminoacidi prolina e glutamina. Queste proteine appartengono al tessuto nutriente dei chicchi di grano, avena, orzo e segale ed è responsabile delle proprietà di cottura delle farine.

A causa della possibilità di determinare in modo altamente sensibile e specifico la presenza nel siero di anticorpi anti-DGP di classe IgG e IgA, è possibile evitare procedure invasive quali la biopsia. In passato si eseguivano numerose biopsie su pazienti con sospetto morbo celiaco, dopo un periodo di dieta priva di glutine e anche dopo una specifica challenge di glutine. È stato provato che il titolo degli anticorpi anti-DGP correla molto bene con l'aspetto morfologico della mucosa dell'intestino superiore. E' un dato molto ben documentato che il livello degli anticorpi anti-DGP si riduce molto rapidamente dopo che si è iniziata una dieta prova di glutine e aumenta immediatamente dopo la reintroduzione del glutine nella dieta. Pertanto il test sierologico rappresenta un metodo affidabile per il monitoraggio dei pazienti, in particolare bambini e adolescenti, per verificare se si attengono alla dieta priva di glutine.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test **Anti peptidi Gliadina deamidati (DGP) IgA** si basa sul legame degli anticorpi presenti nei calibratori, nei controlli o nei campioni prediluiti dei pazienti con peptidi sintetici di Gliadina deamidati (DGP) adsorbiti sulla superficie interna dei pozzetti. Dopo 30 minuti di incubazione la micropietra viene lavata con tampone di lavaggio per la rimozione delle componenti del siero che non hanno reagito. Una

soluzione di immunoglobuline anti-human IgA coniugate con perossidasi riconosce gli anticorpi di classe IgA legati agli antigeni immobilizzati. Dopo 30 minuti di incubazione l'eccesso di coniugato enzimatico che non si è legato specificamente viene rimosso mediante tampone di lavaggio. Si aggiunge ai pozzetti una soluzione substrato cromogenica contenente TMB. Dopo 15 minuti di incubazione si blocca lo sviluppo del colore mediante aggiunta della soluzione stop. Il colore della soluzione diventa giallo. La quantità di colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgA presenti nel campione originale.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

- Anti DGP Calibrators** (5 flaconi, 1,2 mL ciascuno)
Tampone fosfato 0,1 M NaN₃ < 0,1%, siero umano
CAL0
CAL1
CAL2
CAL3
CAL4
- Controls** (2 flaconi, 1,2 mL ognuno, pronti all'uso)
Tampone fosfato 0,1 M NaN₃ < 0,1%, siero umano
Controllo Negativo
Controllo Positivo
- Sample diluent** (1 flacone, 100 mL)
Tampone fosfato 0,1 M NaN₃ < 0,1%
- Conjugate** (1 flacone, 15 mL)
Anti h-IgA coniugato con perossidasi di rafano (HRP), BSA 0,1%, Proclin < 0,0015%
- DGP Coated Microplate**
(1 micropietra breakable con DGP adsorbiti)
- TMB Substrate** (1 flacone, 15 mL)
3,3',5,5'-tetrametilbenzidina 0,26 g/L, perossido di idrogeno 0,05%, proclin < 0,0015%
- Stop Solution** (1 flacone, 15 mL)
Acido solforico 0,15 M
- 10X Conc. Wash Solution** (1 flacone, 50 mL)
Tampone fosfato 0,2 M, proclin < 0,0015%

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit
Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare
Dispensatori automatici.
Lettore per micropietre (450 nm).

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori e i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN_3) o di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/ H_2O_2 a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.

- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- **ATTENZIONE: il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni;** si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica,** si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; **questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso.**
A tale scopo Intermedical rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₄)

Dal momento che non sono disponibili preparazioni di riferimento internazionale per gli anticorpi anti DGP, il sistema di misurazione è calibrato in unità relative arbitrarie. I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	15	30	60	240

Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2÷8°C.

6.2. Preparazione del campione

Le matrici di elezione per la determinazione degli anticorpi anti DGP sono siero o plasma umano. **Tutti i campioni di siero o plasma devono essere prediluiti 1:100 con sample diluent**; per esempio 10 µL di campione possono essere diluiti con 990 µL di sample diluent.

I pazienti non devono necessariamente essere a digiuno e non è richiesta alcuna preparazione particolare. Raccogliere il sangue mediante prelievo venoso in un vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule per centrifugazione.

I campioni possono essere conservati refrigerati a 2-8°C per almeno 5 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi fino a 6 mesi i campioni dovrebbero essere congelati a -20°C. Per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti, i campioni dovrebbero essere aliquotati. Emolisi e presenza di bilirubina non hanno effetti evidenti sulla determinazione.

I Controlli sono pronti all'uso.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (10x) con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni. Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.**
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₄), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campione /Controlli	Bianco
Calibratori C ₀ -C ₄	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 30 minuti a temperature ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. RISULTATI

7.1. Curva di calibrazione

Per Anti-DGP IgA il metodo di scelta per il trattamento dei risultati è una elaborazione 4 parametri con assi lin-log per densità ottica e concentrazione rispettivamente. Inoltre si possono utilizzare un'approssimazione spline e coordinate log-log. Tuttavia si raccomanda di utilizzare una curva Lin-Log.

Innanzitutto occorre calcolare la media delle densità ottiche relative ai calibratori. Utilizzare un foglio di carta lin-log e tracciare le densità ottiche medie di ogni calibratore verso la rispettiva concentrazione. Disegnare la curva che approssima nel modo migliore tutti i punti di calibrazione. I punti dei calibratori possono anche essere collegati con segmenti di linea retta. La concentrazione dei campioni incogniti può essere determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

Risultati tipici (da considerare solo come esempio)

La tabella sotto riportata mostra dei risultati tipici per il test Anti-DGP IgA. I dati sono da considerarsi esemplificativi e non dovrebbero essere utilizzati per il calcolo dei risultati.

N	OD1	OD2	mean	C1	C2	mean	CV%
CAL0	0,013	0,009	0,011	0,18	0,00	0,09	141,42
CAL1	0,205	0,206	0,206	14,93	15,00	14,96	0,36
CAL2	0,401	0,405	0,403	29,89	30,20	30,04	0,73
CAL3	0,794	0,770	0,782	60,96	59,01	59,99	2,30
CAL4	2,558	2,710	2,634	231,2	249,0	240,1	5,26

8. VALORI DI RIFERIMENTO

In uno studio sui valori normali eseguito con campioni di siero provenienti da donatori sani sono stati determinati i seguenti intervalli di normalità con il test Anti-DGP-IgA:

	Anti DGP IgA (AU/mL)
Negativo	< 15
Dubbia interpretazione	15 - 30
Positivo	> 30

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

I risultati positivi dovrebbero essere verificati relativamente allo stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione relativa alla terapia dovrebbe essere presa individualmente. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri intervalli normale e patologico di Anti-DGP sierica.

8.1. Specificità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 69 sieri (di cui 29 positivi e 40 negativi) hanno mostrato una specificità del 97,6%.

8.2. Sensibilità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 69 sieri (di cui 29 positivi e 40 negativi) hanno mostrato una sensibilità del 100,0%.

8.3. Limite di Rilevabilità

La minor concentrazione di anti-DGP IgA che può essere distinta dal Calibratore 0 è inferiore a 0,74 AU/mL con limite di confidenza del 95%.

8.4. Precisione e riproducibilità

8.4.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando 16 volte due diversi sieri con valori situati dentro il range di lavoro della curva di calibrazione. La variabilità intra-assay è ≤ 5,8%

8.4.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la determinazione di due differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi e/o con diverse combinazioni di lotti di reagenti. La variabilità inter-Assay è ≤ 10,2%.

9. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Chartrand LJ, Seidman EG. Celiac disease is a lifelong disorder. Clin.Invest.Med., Vol. 19, 357-361, 1996
2. Cornell HJ. Coeliac disease: A review of the causative agents and their possible mechanisms of action. Amino Acids, Vol. 10, 1-19, 1996
3. Cronin CC, Feighery A, Ferriss JB, Liddy C, Shanahan F, Feighery C. High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. Am.J Gastroenterol., Vol. 92, 2210-2212, 1997
4. Jokinen J, Peters U, Maki M, Miettinen A, Collin P. Celiac sprue in patients with chronic oral mucosal symptoms. J Clin.Gastroenterol., Vol. 26, 23-26, 1998
5. Taminiau JA. Celiac disease. Curr.Opin.Pediatr., Vol. 8, 483-486, 1996
6. Williams CN. Celiac disease: past, present and future. Can.J Gastroenterol., Vol. 11, 647-649, 1997

Contatti:

InterMedical S.r.l. Via A.Genovesi,13 80010
Villaricca (NA) ITALY - Tel. +39 81 330 27 05
Fax +39 81 330 14 53
P. IVA 03426331215
e-mail *product specialist* :
mail@intermedical.it



INTERMEDICAL s.r.l.
Via A. Genovesi,13
80010 Villaricca(Na)-ITALY



Anti Deamidated Gliadin Peptide (DGP) IgA

Quantitative determination of IgA class antibodies against deamidated Gliadin peptides (DGP) in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

INTENDED USE

Anti-Deamidated Gliadin Peptide (DGP) IgA kit is a solid phase enzyme immunoassay (ELISA) designed for the quantitative measurement of IgA class antibodies directed against deamidated Gliadin peptides (DGP) in human serum or plasma.

Anti-Deamidated Gliadin Peptide (DGP) IgA is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Celiac disease, also known as gluten sensitive enteropathy is primarily a disease of the infant organism. It is caused by a hypersensitivity reaction in response to gliadin, a protein being present in many cereals. This, non IgE mediated food allergy leads to massive malabsorption disturbances and is characterized by a complete atrophy of the villi and a hyperplasia of the crypts of the upper intestine.

Accordingly patients suffering from celiac disease must maintain a gluten free diet for the rest of their life.

Gliadins are proteins containing high amounts of the amino acids prolin and glutamine. These proteins belong to the nutritive tissue of the grain seeds of wheat, oat, barley and rye and are responsible for the baking properties of the flour.

Due to the possibilities of the highly specific and sensitive serological determination of IgA and IgG antibodies against DGP the invasive procedures of biopsies can be given up. In the past several biopsies have been done with patients when celiac disease was suspected, after a period of a gluten-free diet and also after a specific gluten challenge. DGP antibodies titer has been proved to correlate very well with the morphological appearance of the mucosa of the upper intestine. It has been well documented that DGP antibodies level fall very quickly after a gluten free diet has begun and rise immediately after restoring gluten to the diet. Thus the serological test represents a reliable method to monitor patients, and in particular children and teenagers, for their adherence to the gluten-free diet.

2. PRINCIPLE

Anti-Deamidated Gliadin Peptide (DGP) IgA test is based on the binding of present antibodies in calibrators, controls or prediluted patient samples on the syntetic deamidated Gliadin peptides (DGP) coated on the inner surface of the wells. After a 30 minutes incubation the microplate is washed with wash buffer for removing non-reactive serum components.

An anti-human-IgA horseradish peroxidase conjugate solution recognizes IgA class antibodies bound to the immobilized antigens. After a 30 minutes incubation

any excess enzyme conjugate, which is not specifically bound is washed away with wash buffer.

A chromogenic substrate solution containing TMB is dispensed into the wells. After 15 minutes of incubation the color development is stopped by adding the stop solution. The solutions color changes into yellow. The amount of color is directly proportional to the concentration of IgA antibodies present in the original sample.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Anti-DGP Calibrators (5 vials, 1.2 mL each)

Phosphate buffer 0.1 M, NaN₃ < 0.1%, human serum
 CAL0
 CAL1
 CAL2
 CAL3
 CAL4

2. Controls (2 vials, 1.2 mL each, ready to use)

Phosphate buffer 0.1 M, NaN₃ < 0.1%, human serum
 Negative Control
 Positive Control

3. Sample Diluent (1 vial, 100 mL)

Phosphate buffer 0.1 M, NaN₃ < 0.1%

4. Conjugate (1 vial, 15 mL)

Anti h-IgA conjugated with horseradish peroxidase (HRP), BSA 0.1%, Proclin < 0.0015%

5. DGP Coated Microplate

(1 breakable microplate coated with DGP)

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 0.26 g/L, hydrogen peroxide 0.05%, proclin < 0,0015%

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulfuric acid 0.15 M

8. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 0.2M, proclin < 0,0015%

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm)

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators and the Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN₃) or Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may**

be contaminated by external agents if not used properly; therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.**

For this purpose, Intermedical supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.

- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemeic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₄)

Since no international reference preparation for Anti-DGP antibodies is available, the assay system is calibrated in relative arbitrary units. The Calibrators are ready to use and have the following concentration:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	15	30	60	240

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of the Sample

For determination of Anti-DGP human serum or plasma are the preferred sample matrixes.

All serum and plasma samples have to be prediluted with sample diluent 1:100; for example

10 µL of sample may be diluted with 990 µL of sample diluent.

The patients need not to be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation.

Samples may be stored refrigerated at 2-8°C for at least 5 days. For longer storage of up to six months samples should be stored frozen at -20°C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted.

Neither Bilirubin nor Hemolysis have significant effect on the procedure.

The Controls are ready to use.

6.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of each vial of the buffered wash solution concentrate (10X) with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C. In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.**
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Calibrator C ₀ -C ₄	100 µL		
Controls		100 µL	
Diluted Sample		100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently Read the absorbance (E) at 450 nm against Blank within 5 minutes.			

7. RESULTS

7.1. Calibration curve

For Anti-DGP IgA a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice. Smoothed-Spline Approximation and log-log coordinates are also suitable. However, we recommend using a Lin-Log curve.

First calculate the averaged optical densities for each calibrator well. Use lin-log graph paper and plot the averaged optical density of each calibrator versus the concentration. Draw the best fitting curve approximating the path of all calibrator points. The calibrator points may also be connected with straight line segments. The concentration of unknowns may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

Typical Results (example only)

The figures below show typical results for Anti-DGP IgA. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

N	OD1	OD2	mean	C1	C2	mean	CV%
CAL0	0.013	0.009	0.011	0.18	0.00	0.09	141.42
CAL1	0.205	0.206	0.206	14.93	15.00	14.96	0.36
CAL2	0.401	0.405	0.403	29.89	30.20	30.04	0.73
CAL3	0.794	0.770	0.782	60.96	59.01	59.99	2.30
CAL4	2.558	2.710	2.634	231.2	249.0	240.1	5.26

8. REFERENCE VALUES

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with the Anti-DGP tests:

	Anti DGP IgA (AU/mL)
Negative	< 15
Equivocal	15 - 30
Positive	> 30

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of serum Anti-DGP.

8.1. Specificity

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 69 sera (29 of them positive sera and 40 negative sera) shows a 97.6% specificity.

8.2. Sensitivity

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 69 sera (29 of them positive sera and 40 negative sera) shows a 100% sensitivity.

8.3. Detection limit

The lowest concentration of anti-DGP IgA that can be distinguished from Calibrator 0 is less than 0.74 AU/mL with a confidence limit of 95%.

8.4. Precision and reproducibility

8.4.1. Intra-Assay

Within run variation was determined by replicate 16 times two different sera with values in the range of calibration curve. The within assay variability is \leq 5.8%.

8.4.2. Inter-Assay

Between run variation was determined by replicate the measurements of two different control sera with different lots of kits and/or different mix of lots of reagents. The between assay variability is \leq 10.2%.

9. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Chartrand LJ, Seidman EG. Celiac disease is a lifelong disorder. Clin.Invest.Med., Vol. 19, 357-361, 1996
2. Cornell HJ. Coeliac disease: A review of the causative agents and their possible mechanisms of action. Amino Acids, Vol. 10, 1-19, 1996
3. Cronin CC, Feighery A, Ferriss JB, Liddy C, Shanahan F, Feighery C. High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. Am.J Gastroenterol., Vol. 92, 2210-2212, 1997
4. Jokinen J, Peters U, Maki M, Miettinen A, Collin P. Celiac sprue in patients with chronic oral mucosal symptoms. J Clin.Gastroenterol., Vol. 26, 23-26, 1998
5. Taminiau JA. Celiac disease. Curr.Opin.Pediatr., Vol. 8, 483-486, 1996
6. Williams CN. Celiac disease: past, present and future. Can.J Gastroenterol., Vol. 11, 647-649, 1997

Contact:

InterMedical S.r.l. Via A.Genovesi,13 80010 Villaricca
(NA) ITALY - Tel. +39 81 330 27 05 Fax +39 81 330 14
53

P. IVA 03426331215

e-mail *product specialist* :

mail@intermedical.it



INTERMEDICAL s.r.l.
Via A. Genovesi,13
80010 Villaricca(Na)-ITALY



	Intermedical	
	PACKAGING INFORMATION SHEET	

IT
Spiegazione dei simboli









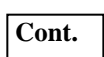

GB
Explanation of symbols

FR
Explication des symboles

ES
Significado de los simbolos

DE
Verwendete Symbole

PT
Explicação dos simbolos

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação			

	Intermedical	
	PACKAGING INFORMATION SHEET	

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intra-assy elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation