

# NADAL<sup>®</sup> Celiac Disease (tTG) (test cassette)

REF 790001



<b>DE</b>	Gebrauchsanweisung	p. 2	<b>PL</b>	Sposób użycia	p. 24
<b>EN</b>	Instruction for use	p. 7		Symbols	p. 32
<b>FR</b>	Instructions d'utilisation	p. 11		Our Teams	p. 32
<b>ES</b>	Instrucciones de uso	p. 15			
<b>IT</b>	Istruzioni per l'uso	p. 19			



nal von minden GmbH

Carl-Zeiss-Strasse 12  
47445 Moers  
Germany

Tel: +49 (2841) 99820-0  
Fax: +49 (2841) 99820-1

Friedenstrasse 32  
93053 Regensburg  
Germany

Tel: +49 941 29010-0  
Fax: +49 941 29010-50

[www.nal-vonminden.com](http://www.nal-vonminden.com)  
[info@nal-vonminden.com](mailto:info@nal-vonminden.com)

Directors:  
Sandra von Minden  
Roland Meißner  
Thomas Zander

Commercial reg. Kleve  
HRB 5679  
Steuer-Nr. 244/133/00130  
UST-ID-Nr. DE 189 016 086

### 1. Verwendungszweck

Der **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test** ist ein einfacher immunchromatographischer Test, welcher zum Nachweis von Antikörpern (IgA/IgG/IgM) gegen gewebsspezifische Transglutaminase (tTG), dem hauptsächlichen Autoantigen endomysialer Antikörper, in Vollblut oder Serum dient.

### 2. Einleitung und Diagnostische Bedeutung

Celiac Disease (CD) ist eine Darmerkrankung (Enteropathie), welche durch die Unverträglichkeit von Gluten, einem Protein das in Weizen-, Gersten- und Roggenprodukten enthalten ist, verursacht wird. Bei genetisch prädisponierten Menschen verursacht die wiederholte Aufnahme dieses Proteins unter Umständen eine schwerwiegende Läsion der Darmschleimhaut. Die Diagnose von CD stützt sich dabei auf charakteristische histologische Veränderungen, wie z.B. Krypten-Hyperplasie mit vollständiger oder unvollständiger Atrophie intestinaler Villi, die anhand von Darmbiopsien festgestellt werden können. Jedoch stellen serologische Tests, wie der Nachweis zirkulierender anti-Gliadin, anti-tTG und anti-endomysialer Antikörper eine weniger invasive und kostengünstigere Alternative zur Diagnosestellung dar.

### 3. Testprinzip

Im Blut von CD-Patienten vorhandene anti-tTG Antikörper reagieren mit Latexpartikeln, die mit rekombinanter humaner tTG konjugiert sind. Dieser Komplex aus Latexpartikel, tTG und anti-tTG Antikörper läuft durch einen chromatographischen Prozess auf den Reaktionsbereich zu. Dieser Bereich enthält rekombinante humane tTG, die mit dem Komplex reagiert und eine rote Linie entstehen lässt.

### 4. Bestandteile der Testpackung

- 10 NADAL® Celiac Disease (tTG) Testkassetten
- 10 Sterile Lanzetten
- 10 Mikropipetten (20 µl)
- 1 Verdünnungspuffer (3 ml)

### 5. Zusätzlich benötigte Materialien

- Zentrifuge (nur für Serum)
- Stoppuhr

### 6. Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Lagern Sie die Komponenten des **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests** in der Originalverpackung gekühlt bei 2°C bis 8°C. Das Haltbarkeitsdatum ist auf der Außenhülle der Testverpackung angegeben. Verwenden Sie die einzelnen Komponenten nicht nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums.

### 7. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für die professionelle *in vitro* Diagnostik.
- Patientenproben können infektiöse Substanzen enthalten und sollten als potentiell gefährliches biologisches Material behandelt und entsorgt werden.
- Tauschen Sie keine Komponenten zweier Kits mit unterschiedlichen Lotnummern aus.
- Lassen Sie alle Komponenten des Kits sowie die Proben Raumtemperatur erreichen, da kalte Reagenzien und Proben die Funktionalität des Tests reduzieren. Gewöhnlich genügen 20-30 Minuten aus um die Raumtemperatur zu erreichen.

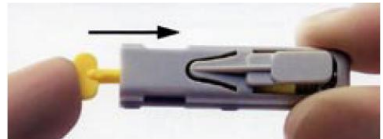
- Benutzen Sie keine Kits nach Überschreiten des angegebenen Haltbarkeitsdatums.
- Auch bei Beschädigung der Packung kann das Kit, sofern keine der enthaltenen Komponenten beschädigt ist, verwendet werden.
- Es ist wichtig die richtige Menge Probenmaterial zu verwenden. Falls weniger als angegeben zugegeben wird kann es vorkommen, dass kein Ergebnis erscheint, da der Reaktionsbereich nicht erreicht wurde. Wird ein größeres Volumen als angegeben verwendet, so kann es zu einer schwächeren Anzeige der Linie kommen, weil die Probe verdünnt vorlag.
- Das benutzte Produkt sollte nach aktueller Gesetzgebung entsorgt werden.
- Verwenden Sie den Test nicht, falls bereits vor der Nutzung eine farbige Linie im Ergebnisfeld zu sehen ist.

### 8. Probennahme, -Vorbereitung und Lagerung

#### Probennahme

- Der Test wurde für die Nutzung mit frischen, nicht-hämolytierten Blutproben konstruiert, die mit den im Kit enthaltenen Mikropipetten gesammelt werden sollen.
- Das Blut sollte aus der Fingerkuppe des Zeigefingers, Mittelfingers oder Ringfingers entnommen werden.
- Reinigen Sie die Fingerspitze mit Alkohol und lassen Sie den Finger lufttrocknen.
- Drücken Sie die den gelben Protektor der sterilen Lanzette in Richtung des Inneren der Lanzette bis Sie ein „Klick“ hören (1).
- Drehen Sie den Protektor um diesen zu brechen, abzunehmen und die Lanzettennadel freizulegen (2).
- Drehen Sie die Handinnenfläche nach oben, positionieren Sie das offene Ende der Lanzette auf dem gesäuberten Finger und drücken Sie auf den Auslöser (3).
- Entsorgen Sie die Lanzette in einem entsprechenden Behälter für scharfe Gegenstände.

(1)



(2)



(3)



**Probenlagerung**

- Serumproben können für einen Tag im Kühlschrank gelagert werden.

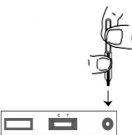
**9. Testdurchführung****I. Vorbereitung**

Bringen Sie alle Komponenten des **NADAL® Celiac Disease (tTG)** Tests vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur. Entnehmen Sie die Testkassette aus der versiegelten Verpackung und legen Sie sie auf eine saubere und ebene Oberfläche.

Entnehmen Sie eine Blutprobe wie in Kapitel 8 unter „Probennahme“ beschrieben.

**II. Durchführung des Tests****Vollblutprobe mit Benutzung der Mikropipette**

1. Halten Sie den Finger tiefer als den Ellbogen und reiben Sie die Hand vom Handgelenk zur Handfläche und zum Finger um einen runden Tropfen auf dem Einstichpunkt zu bilden.
2. Wischen Sie den ersten Blutstropfen mit einem sterilen Tuch oder Watte ab.
3. Sammeln Sie die Blutprobe mit einer unbenutzten sterilen Mikropipette, indem Sie den Tropfen mit der Spitze der Mikropipette berühren. Halten Sie dabei die Mikropipette horizontal und lassen Sie das Ventilationsloch frei. **Drücken Sie nicht die Mitte der Mikropipette zusammen um das Blut zu sammeln!**
4. Füllen Sie die Mikropipette bis zur Markierung auf (ca. 20 µl). Vermeiden Sie Lufteinschlüsse!
5. Geben Sie die Blutprobe unmittelbar nach der Probennahme aus der Mikropipette in das runde Probenfeld der Testkassette, um Koagulation in der Pipette zu vermeiden. Positionieren Sie dazu die Mikropipette vorsichtig im Zentrum des kreisförmigen Fensters (in der Abbildung mit einem Pfeil gekennzeichnet). Decken Sie dann das Ventilationsloch mit dem Finger ab und drücken Sie vorsichtig auf den oberen Bereich der Pipette.



6. **Warten Sie 30 bis 60 Sekunden**, bis das Blut aufgesogen wurde und fügen Sie dann **zwei Tropfen (100 µl) Verdünnungspuffer** in dasselbe Fenster (halten Sie dabei das Tropffläschchen vertikal).
7. Starten Sie die Stoppuhr und lesen Sie das Ergebnis nach **10 Minuten** ab.

**Vollblutprobe ohne Benutzung der Mikropipette**

1. Geben Sie **20 µl Blut** in das runde Probenfeld (in der Abbildung mit einem Pfeil gekennzeichnet).

2. Warten Sie **30 bis 60 Sekunden**, bis das Blut aufgesogen wurde; fügen Sie dann **zwei Tropfen (100 µl) Verdünnungspuffer** in dasselbe Fenster (halten Sie dabei das Tropffläschchen vertikal).
3. Starten Sie die Stoppuhr und lesen Sie das Ergebnis nach **10 Minuten** ab.

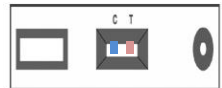
**Serumprobe**

1. Bereiten Sie eine **1:10 Verdünnung des Serums** mit dem Verdünnungspuffer vor. (Bsp.: 15 µl Serum + 135 µl Puffer). Mischen Sie die hergestellte Verdünnung durch wiederholtes Pipettieren.
2. Füllen Sie **Tropfen für Tropfen 125 µl der Serumverdünnung** in das runde Probenfeld ein.
3. Starten Sie die Stoppuhr und lesen Sie das Ergebnis nach **10 Minuten** ab.

**10. Testauswertung****Positiv**

**Zwei erkennbare Linien werden sichtbar.**

Eine blaue Linie erscheint im Kontrollbereich (C) und eine rötliche Linie im Testbereich (T). Die Farbintensität der Linien kann aufgrund der



Antikörperkonzentration unterschiedlich ausfallen.

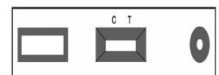
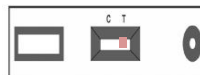
**Negativ**

**Nur die blaue Linie im Kontrollbereich (C) wird sichtbar.** Es erscheint keine sichtbare rötliche Linie im Testbereich (T).

**Ungültig**

**Die blaue Kontrolllinie (C) wird nicht ausgebildet.**

In diesem Fall ist das Ergebnis ungültig, selbst wenn die rötliche Linie im Testbereich erscheint. Abweichungen von der korrekten Testdurchführung oder ein zu geringes Probevolumen können die Ursache hierfür sein. Überprüfen Sie noch einmal die Testdurchführung auf mögliche Fehler und wiederholen Sie die Untersuchung mit einer neuen Testkassette. Taucht das Problem erneut auf, setzen Sie sich bitte mit uns in Verbindung.



**Hinweis:** Jede Linie, die nach 10 Minuten erscheint, hat keine diagnostische Aussagekraft mehr.

**Die endgültige Diagnose sollte nicht nur auf dem Ergebnis eines Tests basieren. Die Diagnose sollte in Verbindung mit anderen Testdaten und der Überprüfung klinischer Symptome gestellt werden.**

**11. Qualitätskontrolle**

Der **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test** beinhaltet eine interne Funktionskontrolle (Kontrolllinie), die anzeigt, ob eine



ausreichende Probenmenge aufgetragen bzw. die Chromatographie korrekt abgelaufen ist. Kontrollstandards sind im Lieferumfang des **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests** nicht enthalten. Dennoch ist es zu empfehlen, dass im Rahmen einer guten Laborpraxis Positiv- und Negativkontrollen untersucht werden, um die Testdurchführung und die korrekte Testleistung zu überprüfen.

12. Grenzen des Tests

- Der vorliegende Test liefert lediglich ein qualitatives Ergebnis. Bei der Auswertung sollte keine quantitative Interpretation anhand der Farbindensität der Testlinie getroffen werden.
- Testergebnisse sollten generell zusammen mit klinischen Symptomen des Patienten und anderen Testdaten interpretiert werden.
- Für den korrekten Testablauf ist es wichtig die korrekte (angegebene) Menge Blut zu verwenden und die Reaktionszeit zu kontrollieren, um keine falschen Ergebnisse zu erhalten.

13. Leistungsmerkmale des Tests

Sensitivität und Spezifität

**Evaluation 1:** Eine prospektive Studie unter der Aufsicht von Dr. Carmen Ribes Koninckx umfasste 150 untersuchte Patienten, bei denen eine Darmbiopsie zu diagnostischen Zwecken bei verschiedenen pädiatrischen Gastroenterologen durchgeführt wurde. Die anti-tTG Antikörper wurden dabei parallel mittels ELISA/EIA und dem **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test** nachgewiesen. Von den 150 untersuchten Patienten waren 26 mit normaler Histologie (Kontrollen), 122 mit Marsh 3 Läsion und 2 mit Marsh 2 Läsion (Patienten mit CD). Das Blut wurde aus dem Finger entnommen und unmittelbar danach verwendet.

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Patienten mit CD (n = 124)			
<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)/ELISA Übereinstimmung = 93.15%</b>			
		<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)</b>	
		Positiv (110)	Negativ (14)
<b>ELISA</b>	Positiv (114)	108	6
	Negativ (10)	2*	8
Kontrollpatienten (n = 26)			
<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)/ELISA Übereinstimmung = 80%</b>			
		<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)</b>	
		Positiv (2)	Negativ (24)
<b>ELISA</b>	Positiv (5)	1	4
	Negativ (21)	1	20

\*IgA Defizit

Die Wirksamkeit der verschiedenen Methoden CD nachzuweisen ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

	<i>Sensitivität</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Wirksamkeit</i>
<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)</b>	89%	92.5%	89.3%
<b>IgA-tTG (EIA)</b>	91.9%	80%	90%

**Evaluation 2:** Eine weitere Studie wurde bei Kindern zwischen 5 und 9 Jahren durchgeführt, die aus verschiedenen Gründen zum Kinderarzt gingen, ohne die Kenntnis ob CD vorliegt. Unter Leitung von Dr. Carmen Ribes Koninckx wurde die Studie bei 34 Pädiatern in 11 verschiedenen Zentren in der Umgebung Valencias durchgeführt. Den Kindern wurden einige Tropfen Blut entnommen um anti-tTG Antikörper mithilfe des **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests** nachzuweisen.

Bei einem positiven Testergebnis wurde zusätzlich venöses Blut abgenommen und das Ergebnis mithilfe des EliA-ImmunoCAP 100 (Phadia) überprüft.

Insgesamt wurden 850 Tests mit dem **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test** durchgeführt, dabei wurden 7 positive Ergebnisse erhalten:

- 4 stark positive Testergebnisse mit Werten >100 U/ml im Phadia Test und mit histologischen Veränderungen (Darmbiopsie), die auf CD deuteten.
- 3 schwach positive Testergebnisse ergaben Phadia-Werte von 38 U/ml und 36 U/ml sowie ein negatives Testergebnis in venösem Vollbut. Bei einem Patienten (38 U/ml) ergab eine Kontrolle zwei Monate später einen starken Anstieg dieses Wertes (>100 U/ml) sowie eine positive Darmbiopsie. Der zweite Patient (36 U/ml) besaß eine Verwandte ersten Grades mit diagnostizierter CD und wird weiterhin beobachtet.

In dieser Studie (n=850) mit 5 bestätigten Fällen von CD, lag eine Inzidenz von 1:170 vor; die auf 1:141 steigen könnte, falls die ausstehenden serologischen Kontrollen des zweiten Patienten positiv werden. In einer Menge von 10.647 Kindern selben Alters, welche von den Teilnehmern der Studie untersucht wurden, waren 23 bekannte Fälle von CD und damit eine Inzidenz von 1:463.

Auf jeden der bekannten Fälle von CD in dieser Altersgruppe kommen 2,7 Fälle von stiller/atypischer CD. Rechnet man die erhaltenen Ergebnisse hoch (in den Proben: 5:850 = 1:170; in der gesamten nicht-CD Population: 10624:170 = 62) und addiert die 23 bekannten Fälle von CD, so erhält man eine Prävalenz von 85 Fällen in dieser Population. Dies ergibt eine CD Inzidenz von 1:125 in diesem Alter.

Die erhaltenen Resultate zeigen, dass der **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test** als CD Screening Methode sehr nützlich sein kann.

**Evaluation 3:** Diese Evaluation beinhaltete 101 Blutproben (untersucht mit **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**) und deren Serumproben (untersucht mit Alphadia Immunodot Gliadin-

tTG Dot Kit) von CD-Patienten, Verwandten von CD-Patienten und Patienten mit gastrointestinalen Symptomen (Diarrhö, Unterernährung, abdominale Schmerzen, etc.).

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt:

		Alphadia ImmunoDot	
		Positiv (11)	Negativ (90)
<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)</b>	Positiv (12)	11	1
	Negativ (89)	0	89
<b>Gesamtübereinstimmung: 99%</b>			
Übereinstimmung Sensitivität: >99%			
Übereinstimmung Spezifität: 98.9%			

**Evaluation 4:** Die Sensitivität und Spezifität des **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests** wurden durch die Analyse von 49 Blutproben evaluiert: 18 Patienten mit Verdacht auf CD und 31 negative Patienten (mit CD und auf glutenfreier Diät oder mit anderen Erkrankungen). Die Studie wurde von Eurospital organisiert und durch ein Benchmark CD Krankenhaus in Italien durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

		Eurospital	
		Positiv (18)	Negativ (31)
<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)</b>	Positiv (17)	17	0
	Negativ (32)	1	31
Sensitivität: 94.4%			
Spezifität: 100%			
PPV (positive predictive value): 100%			
NPV (negative predictive value): 96.9%			

### Präzision

#### Intra-Assay Präzision

Mit einer Lot des **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests** wurden 10 Sensitivitätskurven (Verdünnungsreihe einer Serum-Positivkontrolle) erstellt. Die Analysen wurden von der gleichen Person an einem Tag durchgeführt. Die erhaltenen Ergebniskurven waren ähnlich, was auf eine hohe Intra-Assay Präzision des **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests** schließen lässt.

#### Inter-Day Präzision

Mit einer Lot **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test** wurde an 10 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils einen Sensitivitätskurve erstellt (Verdünnungsreihe einer Serum-Positivkontrolle). Die Analysen wurden immer von derselben Person durchgeführt und führten an jedem Tag zu ähnlichen Ergebnissen, was die

hohe Inter-Day Präzision des **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests** zeigt.

#### Inter-Labor Präzision

Mit einer Lot des **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests** wurden drei Sensitivitätskurven erstellt (Verdünnungsreihe einer Serum-Positivkontrolle). erstellt. Die Analysen wurden von drei technischen Assistenten am selben Tag durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse glichen sich, was eine hohe Inter-Labor Präzision des **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests** zeigt.

#### Inter-Lot Präzision

Mit 3 Lots des **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests** wurde jeweils eine Sensitivitätskurve erstellt (Verdünnungsreihe einer Serum-Positivkontrolle). Die Analysen wurden von einer Person durchgeführt und lieferten mit allen drei Lots ähnliche Ergebnisse, was die hohe Inter-Lot Präzision des **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests** widerspiegelt.

### Hook-Effekt

Als Hook-Effekt bezeichnet man den Effekt der entsteht, wenn durch sehr hohe Konzentrationen des zu detektierenden Analyten eine Abschwächung oder gar ein negatives Ergebnis angezeigt wird. Viele positive Proben (Serum und Blut) wurden getestet ohne dass eine Abnahme der Testlinienintensität im Falle einer hohen anti-tTG Antikörperkonzentration beobachtet werden konnte.

### Kreuzreaktionen

Mit vielen **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests** wurden Kreuzreaktionen mit im Blut häufig vorkommenden Substanzen untersucht. Die Substanzen wurden mit der in der Tabelle angegebenen Ausgangskonzentration der Pufferlösung hinzugefügt. Anschließend wurde eine Sensitivitätskurve erstellt. Zwei negative Kontrollseren wurden dabei mitgeführt.

Substanz	Ausgangs-konzentration	Verdünnungs-mittel	Konzentration im Puffer
Aspirin	50 mg/ml	Ethanol	2,5 mg/ml
Koffein	10 mg/ml	Wasser	0,5 mg/ml
Ibuprofen	8 mg/ml	Wasser	0,4 mg/ml
Ethanol	500 mg/ml	Wasser	50 mg/ml
Folsäure	0,4 mg/ml	Wasser	0,02 mg/ml
Nikotinsäure	20 mg/ml	Wasser	1 mg/ml
Hämoglobin	15 mg/ml	Wasser	0,75 mg/ml
hCG	250000 mUI/ml	Wasser	500 mUI/ml
EDTA	20 mg/ml	Wasser	1 mg/ml

<b>Substanz</b>	<b>Ausgangs- konzentration</b>	<b>Verdünnungs- mittel</b>	<b>Konzentration im Puffer</b>
Natriumcitrat	0,2 M	Wasser	0,01M
Heparin	500 mg/ml	Wasser	50 mg/ml

**Keine der untersuchten Substanzen hatte Auswirkungen auf die Funktion des NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests.**

#### 14. Referenzen

1. Zhang J. et al. "Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP". The Journal of Biological Chemistry (1998) 273 (4): 2288-2295.
2. Sárdy M. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy". Clinical Chemistry (1999) 45 (12): 2142-2149.
3. Sorell L. et al. "One-step immunochromatographic assay for screening of celiac disease". Lancet (2002) 359: 945-946.
4. Drago S. et al. "Recent developments in the pathogenesis, diagnosis and treatment of celiac disease". Expert Opinion in Therapy Patents (2002) 12 (1): 45-51.
5. Hansson T. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase for diagnosis and follow-up of childhood coeliac disease". Pediatric Research (2002) 51 (6): 700-705.
6. Ferre-López, S. et al. "A reliable generation of immunochromatographic sticks for both t-TG and AGA screening in Coeliac Disease". Clinical Gastroenterology and Hepatology (2004) 2 (6): 480-484.
7. Jennings J. et al. "New developments in celiac disease". Current Opinion in Gastroenterology (2003) 19 (2): 118-129.

Rev. 1, 2012-01-23 SS

### 1. Intended Use

The **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test** is an easy-to-use immunochromatographic test designed for the detection of antibodies (IgA/IgG/IgM) against human tissue transglutaminase (tTG), the main autoantigen recognized by anti-endomysial antibodies, in whole blood or serum.

### 2. Introduction and Clinical Significances

Celiac Disease (CD) is an intestinal disorder (enteropathy) caused by a permanent intolerance to gluten, a protein that is a component of wheat, barley and rye products. In genetically susceptible people the repeated ingestion of this protein may cause serious lesions of the intestinal mucosa. The diagnosis of CD is based on characteristic histological changes, such as crypt hyperplasia with complete or incomplete atrophy of intestinal villi, observed in intestinal biopsies. However, serological tests such as detection of circulating anti-gliadin, anti-tTG and anti-endomysial antibodies represent less invasive and cheaper analysis methods to detect this disease.

### 3. Principle of the Test

Anti-tTG antibodies present in the blood of patients having celiac disease react with latex particles conjugated with human recombinant tTG. These complexes formed of latex particles, tTG and anti-tTG antibodies, migrate through a chromatographic process towards the reaction area. This area contains human recombinant tTG, which reacts with the complex, generating a red line.

### 4. Reagents and Materials Supplied

- 10 NADAL® Celiac Disease (tTG) test cassettes
- 10 Sterile lancets
- 10 Collection pipettes (20 µl)
- 1 Dilution buffer (3 ml)

### 5. Additional Required Materials

- Centrifuge (for serum only)
- Timer

### 6. Storage & Stability

Store the components of the **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test** kit cooled at 2°C to 8°C in the original packaging. The expiry date is indicated on the pouch. Do not use the components beyond the expiry date!

### 7. Warnings and Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic only
- Patient samples may contain infectious agents and should be treated and discarded as potentially dangerous biological materials.
- Do not exchange components from kits with different lot numbers.
- Allow all kit components and samples to reach room temperature as cold reagents and samples can reduce the functionality of the test. About 20-30 minutes are usually sufficient for reaching room temperature.
- Do not use kit components beyond the expiration dates.
- If the package is broken, the product can still be used as long as none of the components have been damaged.
- It is important to add the correct amount of blood in each test. If less than indicated is used, the chromatography may

not work because the sample may not reach the reaction area; if there is too much, the reagent may be diluted and produce a weak line.

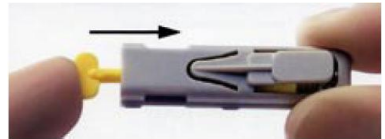
- The used product should be discarded as indicated by current legislation.
- Do not use the test if a coloured line appears in the result area before you start to use it.

### 8. Specimen Collection and Preparation

#### Sample Collection

- The test was designed for use with fresh, non-hemolyzed blood samples to be collected with the kit collection pipettes.
- The blood should be taken from the fingertip of the index finger, middle finger or ring finger.
- Clean the fingertip with alcohol and let it air dry.
- Push the yellow protector of the sterile lancet towards the lancet until you hear a "click" (1).
- Twist the protector to break it and take it off to free the lancet needle (2).
- Turn the hand palm up, place the open end of the lancet on the cleaned finger and press the activating pad (3).
- Discard the lancet in an appropriate container for sharp objects.

(1)



(2)



(3)



#### Specimen Storage

Serum samples can be stored in the fridge for one day.

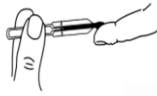
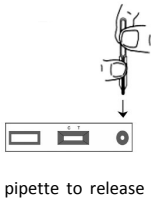
### 9. Procedure of the Test

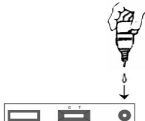
#### I. Preparation

Bring all components of the **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test** kit to room temperature before testing. Take the test cassette out of the sealed pouch and place it on a clean and even surface. Take a blood sample as described in chapter 8 "sample collection".

## II. Test Procedure

### Whole blood with use of the collection pipette

1. Hold the finger lower than the elbow and rub the hand from wrist to palm to finger to form a round drop on the puncture site.
2. Wipe away the first drop of blood with a sterile cloth or cotton.
3. Collect the blood sample with a new sterile collection pipette (20 µl) by touching the blood drop with the tip of the collection pipette. Keep the pipette horizontally and don't close the ventilation hole. **Do not press the central body of the pipette to collect a blood sample!**

4. Fill the collection pipette to the line. Avoid air inclusion!
5. Immediately place the blood sample in the round sample well of the test cassette to prevent coagulation in the pipette. Position the collection pipette carefully in the center of the sample well (marked with an arrow), then cover the pipette ventilation hole with a finger and gently press the upper part of the pipette to release the blood sample.
 

6. Wait for **30 to 60 seconds** until the blood is absorbed, then add **two drops (100 µl) of dilution buffer** to the same window (hold the dropper bottle vertically)
 

7. Start the timer and read the result after **10 minutes**.

### Whole blood without use of the collection pipette

1. Put **20 µl** blood into the round sample well (marked with an arrow).
2. Wait for **30 to 60 seconds** until the blood is absorbed, then add **two drops (100 µl) of dilution buffer** to the same window (hold the dropper bottle vertically)
3. Start the timer and read the result after **10 minutes**.

### Serum sample

1. Prepare a **1:10 dilution of serum with the dilution buffer** (for example 15 µl serum + 135 µl dilution buffer) and mix thoroughly by repeated pipetting.
2. Add **125 µl of the serum dilution** drop by drop to the round sample well (marked with an arrow).
3. Start the timer and read the result after **10 minutes**.

## 10. Interpretation of the Results

### Positive result

#### Two distinct lines appear.

A blue line appears in the control region (C) and a red line in the test region (T). The colour intensity of the lines may vary due to the antibody concentration.



### Negative result

#### Only the blue line in the control region (C) appears.

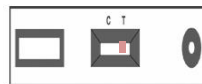
There is no visible red line in the test region (T).



### Invalid result

#### No blue control line (C) appears.

In this case the result is invalid even if the red line appears in the test region (T). Deviations from the correct test procedure or an insufficient sample volume can be the cause. Please check the test procedure for possible errors and repeat the test with a new test cassette. If the problem continues, please contact us.



**Note:** Every line that appears after 10 minutes has no diagnostic value anymore.

**The final diagnosis should be based on more than this test result. You should be taking into account other test data and clinical symptoms of the patient.**

## 11. Quality Control

There is an internal control included in the **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**. The blue line which appears in the control line region (C) is considered as the internal procedural control. It confirms sufficient specimen volume and that the chromatography was completed. Control standards are not supplied with the **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test kit**; yet, it is recommended that positive and negative controls be tested as a good laboratory practice to confirm the test procedure and to verify proper test performance.

## 12. Limitations

- This test provides a qualitative result only. Don't do any quantitative interpretation due to the colour intensity of the test line.
- Test results are to be interpreted together with clinical symptoms of the patient and other test data available.
- To perform a correct testing it is important to use the correct amount of blood and to check the reaction time to don't receive any false results.



13. Performance Characteristics

Sensitivity and Specificity

**Evaluation 1:** A prospective study was carried out under the direction of Dr Carmen Ribes Koninckx, including all the patients on whom an intestinal biopsy was performed for diagnostic purposes in various units of Paediatric Gastroenterology. Anti-TG antibodies were determined simultaneously by ELISA/EIA and by **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**.

A total of 150 patients received analyses, 26 with normal histology (controls), plus 122 with Marsh 3 lesions and 2 with Marsh 2 lesions (patients having celiac disease). The blood was drawn by finger prick and used immediately.

The results are presented in the table below:

Patients with CD (n = 124)			
NADAL® Celiac Disease (tTG)/ELISA Concordance = 93.15%			
		NADAL® Celiac Disease (tTG)	
		Positive (110)	Negative (14)
ELISA	Positive (114)	108	6
	Negative (10)	2*	8
Control Patients (n = 26)			
NADAL® Celiac Disease (tTG)/ELISA Concordance = 80%			
		NADAL® Celiac Disease (tTG)	
		Positive (2)	Negative (24)
ELISA	Positive (5)	1	4
	Negative (21)	1	20

\*IgA Deficit

The efficacy of the different methods in diagnosing CD is presented in the table below:

	Sensitivity	Specificity	Efficacy
NADAL® Celiac Disease (tTG)	89%	92.5%	89.3%
IgA-tTG (EIA)	91.9%	80%	90%

**Evaluation 2:** A transversal population study was carried out on children from 5 to 9 years old, not known to have CD, who visited their pediatrician for any reasons. Under the direction of Dr Carmen Ribes Koninckx, the study was carried out by 34 pediatricians from 11 different centers in the Valencia metropolitan area.

After informed consent was received, some drops of blood were drawn by capillary puncture to determine anti-tTG

antibodies using the **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**. If the test was positive, the result was checked by ELIA-ImmunoCAP 100 (Phadia) after drawing blood by venipuncture.

A total of 850 tests using **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test** were evaluated, obtaining 7 positive results:

- Four strong positives with values >100 U/ml in the Phadia test and with intestinal biopsies showing histological alterations compatible with CD.
- Three weak positives: Two results with Phadia test values of 38 U/ml and 36 U/ml. The first of these two cases presented very strong elevation (>100 U/ml) in a control 2 months later; an intestinal biopsy was therefore performed, the results also being compatible with CD. The second case has a first-degree relative diagnosed with CD and is pending developmental serologic control. In the third weak positive case, the venous blood determination was negative.

In the study sample (n=850), with 5 confirmed cases, a CD incidence of 1/170 was found; this could rise to 1/141 if the patient pending serologic control turns out to have the disease. In the population of 10,647 children of the same age range controlled by the study participants, there were 23 known cases of celiac disease; CD incidence was therefore 1/463.

For each case of previously-known celiac disease in this age range, 2.7 cases of silent/atypical CD have been detected. Extrapolating the results obtained (in the sample: 5/850 = 1/170; in the total non-CD population: 10624/170 = 62) and adding the known cases (23), we obtain a total prevalence of 85 cases in this population. This yields a CD incidence for this age of 1/125.

The results obtained in this study demonstrate that the **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test** is highly useful for possible CD screening programs.

**Evaluation 3:** This evaluation covered 101 blood samples (analyzed with **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**) and the respective sera samples (Alphadia Immunodot Gliadin-tTG Dot Kit) from CD patients, relatives of patients with CD and patients with gastrointestinal symptoms (diarrhea, malnutrition, abdominal pain and so on).

The results are presented in the table below:

		Alphadia ImmunoDot	
		Positive (11)	Negative (90)
NADAL® Celiac Disease (tTG)	Positive (12)	11	1
	Negative (89)	0	89

Concordance percent: 99%

Sensitivity concordance: >99%

Specificity concordance: 98.9%

**Evaluation 4:** The **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test** sensitivity and specificity were evaluated by analyzing 49 blood samples: 18 patients suspected of having CD, 31 negative patients (with CD and on gluten-free diet, or with other pathologies).

Organized by Eurospital, the study was carried out in a benchmark CD hospital in Italy.

The results are presented in the table below:

		Eurospital	
		Positive (18)	Negative (31)
<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)</b>	Positive (17)	17	0
	Negative (32)	1	31
Sensitivity: 94.4%			
Specificity: 100%			
Positive Predictive Value: 100%			
Negative Predictive Value: 96.9%			

### Precision

#### Intra-Assay Precision

With one lot of **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**, 10 sensitivity curves (serial dilutions of a positive control serum) were performed. The analyses were performed by the same person on the same day. The results obtained in all the curves were similar, which demonstrates the high intra-assay precision of the **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**.

#### Inter-Day Precision

With one lot of **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**, a sensitivity curve (serial dilutions with a positive control serum) was performed for 10 consecutive days. The analyses were carried out by the same person, obtaining similar results each day, which demonstrates the high inter-day precision of the **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**.

#### Inter-Laboratory Precision

With one lot of **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**, 3 sensitivity curves (serial dilutions of a positive control serum) were performed. The analyses were performed by three technicians on the same day. The results obtained in the three cases were similar, which demonstrates the high inter-laboratory precision of the **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**.

#### Inter-Lot Precision

With three lots of **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**, a sensitivity curve (serial dilutions of a positive control serum) was performed. The analyses were carried out by the same technician, obtaining similar results with all three lots, which demonstrates the high inter-lot precision of the **NADAL® Celiac Disease (tTG) Test**.

### Hook Effect

The Hook effect is the effect produced when, in the presence of high concentrations of the analyte to detect, a decrease in the signal occurs, positive samples even turning negative.

Many positive samples (sera and blood) have been tested without observing a decrease in the intensity of the test line in case of higher concentrations of anti-tTG antibodies. Therefore, no Hook effect was observed.

### Cross reactions

With a lot of **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests**, several interference substances that are likely to be in blood were examined. The interference substances were added to the buffer in the final amount that is shown in the table and a sensitivity curve was performed. Two negative control sera were examined as well.

<b>Substance</b>	<b>Initial Concentration</b>	<b>Diluent</b>	<b>Concentration in buffer</b>
Aspirin	50 mg/ml	Ethanol	2,5 mg/ml
Caffeine	10 mg/ml	Water	0,5 mg/ml
Ibuprofen	8 mg/ml	Water	0,4 mg/ml
Ethanol	500 mg/ml	Water	50 mg/ml
Folic acid	0,4 mg/ml	Water	0,02 mg/ml
Nicotinic acid	20 mg/ml	Water	1 mg/ml
Haemoglobin	15 mg/ml	Water	0,75 mg/ml
hCG	250000 mUI/ml	Water	500 mUI/ml
EDTA	20 mg/ml	Water	1 mg/ml
Sodium citrate	0,2 M	Water	0,01M
Heparin	500 mg/ml	Water	50 mg/ml

None of the analyzed substances affected the proper performance of the **NADAL® Celiac Disease (tTG) Tests**.

### 14. References

- Zhang J. et al. "Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP". The Journal of Biological Chemistry (1998) 273 (4): 2288-2295.
- Sárdy M. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy". Clinical Chemistry (1999) 45 (12): 2142-2149.
- Sorell L. et al. "One-step immunochromatographic assay for screening of celiac disease". Lancet (2002) 359: 945-946.
- Drago S. et al. "Recent developments in the pathogenesis, diagnosis and treatment of celiac disease". Expert Opinion in Therapy Patents (2002) 12 (1): 45-51.
- Hansson T. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase for diagnosis and follow-up of childhood coeliac disease". Pediatric Research (2002) 51 (6): 700-705.
- Ferre-López, S. et al. "A reliable generation of immunochromatographic sticks for both t-TG and AGA screening in Coeliac Disease". Clinical Gastroenterology and Hepatology (2004) 2 (6): 480-484.
- Jennings J. et al. "New developments in celiac disease". Current Opinion in Gastroenterology (2003) 19 (2): 118-129.

Rev. 1, 2012-01-23 AO

## 1. Domaine d'application

Le test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG** est un test rapide par immunochromatographie pour la détection d'anticorps (IgA/IgG/IgM) dirigés contre la transglutaminase, l'auto-antigène principal ciblé par l'anticorps anti-endomysium, dans le sang total ou le sérum.

## 2. Introduction et signification diagnostique

La maladie cœliaque (MC) est une entéropathie causée par une intolérance au gluten ou à sa protéine, la gliadine, présente dans les produits à base de blé, d'orge et de seigle. Chez les personnes prédisposées génétiquement, l'ingestion de cette protéine provoque des lésions graves de la muqueuse intestinale. Le diagnostic de la maladie cœliaque peut être établi en observant les changements histologiques caractéristiques par le biais de biopsies intestinales. Les tests sérologiques représentent cependant une méthode moins invasive et moins coûteuse pour la détection d'anticorps anti-gliadine, anti-transglutaminase tissulaire (tTG) et anti-endomysium.

## 3. Principe du test

Les anticorps anti-tTG présents dans le sang de patients atteints de la maladie cœliaque réagissent avec des particules de latex conjuguées à de la tTG humaine recombinée. Ces complexes, formés par des particules colloïdales tTG/anti-tTG Igs, passent dans la zone réactive par chromatographie. Cette zone contient de la tTG humaine recombinée, laquelle réagit avec le complexe de particules colloïdales tTG/anti-tTG Igs faisant apparaître une ligne colorée.

## 4. Réactifs et matériel fourni

- 10 Cassettes NADAL® Maladie de Cœliaque tTG
- 10 Lancettes stériles
- 10 Pipettes (20 µl)
- 1 solution de dilution (3 ml)

## 5. Matériel supplémentaire non fourni

- 1 Centrifugeuse (pour le sérum uniquement)
- 1 Chronomètre

## 6. Conservation et stockage

Conserver le test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG** en milieu réfrigéré, à 2-8°C. La date de conservation est indiquée sur l'emballage du kit. Ne pas utiliser après la date de péremption.

## 7. Avertissements et précautions

- Uniquement pour une utilisation *in vitro*
- Les échantillons peuvent contenir des substances infectieuses et doivent être manipulés et éliminés comme matériel biologique potentiellement dangereux.
- Ne pas échanger les composants de deux kits avec des numéros de lot différents.
- Ramener tous les composants du kit et les échantillons à température ambiante car les réactifs et échantillons froids peuvent réduire la fonctionnalité du test. En général, 20 à 30 minutes suffisent pour atteindre la température ambiante.
- Ne pas utiliser de kits dont la date limite de conservation a expiré.

- Si l'emballage est endommagé, le kit peut tout de même être utilisé tant que tous les composants contenus sont intacts.
- Il est important de doser la bonne quantité de sang dans le test. Si le volume utilisé est inférieur à celui indiqué, il se peut qu'aucun résultat n'apparaisse puisque la zone réactive n'est pas atteinte. Si le volume utilisé est supérieur à celui indiqué, il se peut que la ligne apparaisse faiblement puisque le réactif serait alors dilué.
- Le produit utilisé doit être éliminé selon la législation actuelle.
- Ne pas utiliser le test si une ligne de couleur apparaît dans la fenêtre de résultat avant son utilisation.

## 8. Recueil, préparation et conservation des échantillons

### Recueil de l'échantillon

- Le test est conçu pour une utilisation avec des échantillons de sang frais, non hémolysés. Le kit comprend des pipettes pour recueillir les gouttes de sang.
- Le sang doit être prélevé au bout de l'index, du majeur ou de l'annulaire.
- Nettoyer le bout du doigt à l'alcool et le laisser sécher à l'air libre.
- Appuyer sur la protection jaune vers l'intérieur de la lancette jusqu'à ce qu'un « clic » retentisse (1).
- Faire tourner la protection pour la casser, le retirer et libérer l'aiguille de la lancette (2).
- Tourner la paume de la main vers le haut et piquer le doigt avec une lancette stérile. Positionner l'extrémité de la lancette sur le doigt et appuyer sur le déclencheur (3).
- Éliminer la lancette dans un récipient pour objets acérés.
- Le test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG** peut aussi être utilisé avec des échantillons de plasma ou de sérum.

1



2



3



## Conservation de l'échantillon

- Les échantillons peuvent être conservés une journée en milieu réfrigéré.

## 9. Exécution du test

### I. Préparation

Ramener les différents éléments du kit et l'échantillon à température ambiante. Sortir la cassette de son emballage et la déposer sur une table ou sur toute autre surface horizontale.

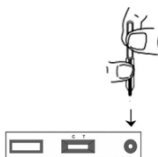
### II. Procédure

#### Échantillon de sang prélevé à l'aide de la pipette fournie

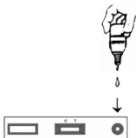
- Maintenir le doigt plus bas que le coude, masser la paume de la main et presser plusieurs fois le doigt.
- Ne pas utiliser la première goutte. Essuyer la goutte avec un papier stérile ou du coton).
- Recueillir l'échantillon de sang avec une pipette propre (20 µl). Pour cela, toucher la goutte avec le bout de la pipette. Tenir alors la pipette à l'horizontale et libérer le trou d'aération. Ne pas presser la pipette en son milieu pour recueillir le sang par capillarité.



- Remplir la micropipette jusqu'à la ligne indiquée. Éviter la formation de bulles d'air.
- Mettre l'échantillon de sang immédiatement sur la cassette. Positionner la pipette sur le centre du puits de dépôt rond (marqué d'une flèche). Boucher ensuite le trou d'aération avec le doigt et appuyer doucement sur la zone supérieure de la pipette. Le prélèvement de l'échantillon et l'exécution du test doivent être réalisés rapidement pour éviter une coagulation dans la micropipette.



- Attendre **30-60 secondes** pour que le sang soit aspiré ; ajouter ensuite **2 gouttes (100 µl) de solution de dilution** dans le puits de dépôt (maintenir la micropipette à la verticale).



- Lire le résultat **après 10 minutes**.

#### Échantillon de sang prélevé sans la pipette fournie

- Ajouter **20 µl de sang** dans le puits de dépôt marqué d'une flèche.
- Attendre **30-60 secondes** pour que le sang soit aspiré ; ajouter ensuite **2 gouttes (100 µl) de solution de dilution** dans le puits de dépôt (maintenir la micropipette à la verticale).

- Lire le résultat **après 10 minutes**.

#### Échantillon de sérum

- Préparer une dilution à **1/10 du sérum avec la solution de dilution**. Par exemple : 15µl de sérum + 135µl de solution de dilution. Bien mélanger en pipétant plusieurs fois.
- Ajouter au goutte-à-goutte **125 µl de cette dilution** dans le puits de dépôt.
- Lire le résultat **après 10 minutes**.

## 10. Interprétation des résultats

### Positif :

**Deux lignes distinctes apparaissent.** Une ligne bleue apparaît dans la zone de contrôle (C) et une ligne rouge apparaît dans la zone de test (T). L'intensité de la couleur peut varier en fonction de la concentration en anticorps.

### Négatif :

**Seule la ligne de contrôle bleue apparaît** dans la fenêtre de résultat. Aucune ligne rouge n'apparaît dans la zone de test (T).

### Résultat non valide :

**La ligne de contrôle bleue n'apparaît pas.** Le résultat du test est invalide, que la ligne de test rouge apparaisse ou non. Une mauvaise manipulation ou un volume d'échantillon insuffisant peuvent être la cause d'un résultat invalide. Recommencer le test en suivant scrupuleusement la notice. Si le problème persiste, contacter votre distributeur.

**Remarque :** Une ligne apparaissant après 10 minutes n'a plus aucune valeur diagnostique.

**Le diagnostic final ne doit pas se baser sur le résultat d'un seul test. Le diagnostic doit être réalisé en corrélation avec d'autres analyses et les symptômes cliniques.**

## 11. Contrôle qualité

Le test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG** inclut une procédure de contrôle interne, sous la forme de la ligne de contrôle bleue apparaissant dans la zone de contrôle (C). Son apparition confirme que le volume d'échantillon est suffisant et que la chromatographie s'est déroulée correctement. Les contrôles standards ne sont pas fournis avec le kit **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG**. Selon les bonnes pratiques de laboratoires, il est recommandé d'utiliser les contrôles externes pour vérifier les bonnes performances du test.

## 12. Limites du test

- Il s'agit d'un test qualitatif. Lors de l'interprétation, il ne faut utiliser l'intensité de couleur de la ligne positive comme critère d'évaluation quantitative.
- Les résultats de tests doivent être utilisés avec d'autres données cliniques et résultats de tests.
- Il est important d'utiliser le volume correct de sang et de contrôler le temps de la réaction pour éviter les faux résultats.

### 13. Caractéristiques de performance du test

#### Sensibilité et spécificité

**Évaluation n°1 :** une étude prospective dirigée par Dr. Carmen Ribes Koninckx a été réalisée comprenant tous les patients ayant subi une biopsie intestinale à des buts diagnostiques chez différents gastro-entérologues pédiatriques. Anticorps anti-TG simultanément détectés par ELISA/EIA et le test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG**.

150 patients ont été examinés dont 26 avec une histologie normale (contrôles), 3 avec une lésion Marsh 3 et 2 avec une lésion Marsh 2 (patients avec maladie cœliaque). Le sang a été prélevé sur le doigt et utilisé immédiatement.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Patients avec maladie cœliaque			
Concordance <b>NADAL® Maladie de Cœliaque tTG</b> /ELISA = 93.15%			
		<b>NADAL® Maladie de Cœliaque tTG</b>	
		Positif (110)	Négatif (14)
<b>ELISA</b>	Positif (114)	108	6
	Négatif (10)	2*	8
Patients de contrôle			
Concordance <b>NADAL® Maladie de Cœliaque tTG</b> /ELISA = 80%			
		<b>NADAL® Maladie de Cœliaque tTG</b>	
		Positif (2)	Négatif (24)
<b>ELISA</b>	Positif (5)	1	4
	Négatif (21)	1	20

\*déficit IgA

L'efficacité des diverses méthodes de détection de la MC est représentée dans le tableau suivant.

	Sensibilité	Spécificité	Efficacité
NADAL® Maladie de Cœliaque tTG	89%	92.5%	89.3%
IgA-tTG (EIA)	91.9%	80%	90%

**Évaluation n° 2 :** une autre étude a été réalisée auprès d'enfants entre 5 et 9 ans ayant consulté un pédiatre pour diverses raisons sans savoir qu'il s'agissait de la MC. Sous la direction du Dr. Carmen Ribes Koninckx, l'étude a été réalisée auprès de 34 pédiatres dans 34 centres différents dans les environs de Valence (Espagne). Après réception de la déclaration de consentement, quelques gouttes de sang ont été prélevées pour détecter des anticorps anti-tTG à l'aide du test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG**.

Si le test était positif, du sang veineux a été prélevé et le résultat contrôlé à l'aide d'ELISA-ImmunoCAP 100 (Phadia). Si ce résultat était également positif, l'enfant a été envoyé chez un gastro-entérologue pédiatrique.

Au total, 850 tests **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG** ont été réalisés parmi lesquels 7 résultats étaient positifs :

- 4 fortement positifs avec des taux >100 U/ml avec le test Phadia et avec des changements histologiques dans la biopsie intestinale démontrant la maladie cœliaque.
- 3 faiblement positifs. 2 taux Phadia, 38 et 36 U/ml. Le patient du premier de ces deux taux a présenté une forte hausse de ce taux lors d'un contrôle deux mois plus tard. (>100U/ml) ; pour cette raison, une biopsie intestinale a été réalisée et a confirmé la MC. Dans le second cas, le patient a un parent du premier degré avec le MC. Dans le troisième cas de taux faible, le résultat de test avec du sang veineux était négatif.

Dans cette étude (n=850) avec 5 cas confirmé de MC, il y avait un taux d'incidence de 1/170 ; celui-ci peut augmenter à 1/141 si les contrôles sérologiques restant devaient s'avérer positifs. Dans un groupe de 10647 enfants du même âge examinés dans le cadre de l'étude, 23 étaient des cas connus de MC ; il en découle un taux d'incidence de 1/463.

Dans les cas déjà connus de maladie cœliaque de cette classe d'âge, 2,7 cas de MC atypiques ont été découverts. Si l'on fait une estimation des résultats acquis (dans les échantillons : 5/850 = 1/170 ; dans toute la population sans MC : 10624/170 = 62), alors on obtient une prévalence de 85 cas dans cette population. Cela donne un taux d'incidence de MC de 1/125 dans cet âge.

Les résultats obtenus montrent que le test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG** peut être très utile en tant que méthode possible de détection de la MC.

**Évaluation n° 3 :** cette évaluation comprend 101 échantillons de sang (**NADAL® Maladie de Cœliaque tTG**) et leurs échantillons de sérum (kit AlphaDia Immunodot gliadine-tTG) de patients MC, de parents de patients avec la MC et de patients avec des symptômes gastro-intestinaux (diarrhée, sous-alimentation, douleurs abdominales).

Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant :

		ImmunoDot	
		Positif (11)	Négatif (90)
<b>NADAL® Maladie de Cœliaque tTG</b>	Positif (12)	11	1
	Négatif (89)	0	89
Pourcentage de concordance : 99%			
Concordance sensibilité : >99%			
Concordance spécificité : 98.9%			

**Évaluation n° 4 :** La sensibilité et la spécificité du test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG** ont été évaluées par l'analyse de 49 échantillons de sang : 18 patients avec suspicion de MC, 31 patients négatifs. Organisée par Eurospital, l'étude a été réalisée auprès d'un hôpital-référence de MC en Italie.

Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant :

		Eurospital	
		Positif (18)	Négatif (31)
<b>NADAL® Maladie de Cœliaque tTG</b>	Positif (17)	17	0
	Négatif (32)	1	31
Sensibilité : 94.4% Spécificité : 100% Valeur prédictive positif : 100% Valeur prédictive négatif : 96.9%			

## Précisions

### Précision intra-série

10 courbes de sensibilité (une série de dilutions de contrôles de sérums positifs) ont été réalisées avec un lot du test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG**. Les analyses ont été réalisées par la même personne le même jour. Les courbes de résultats obtenues se ressemblent démontrant la haute précision du test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG** entre les tests.

### Précision inter-jour

Une courbe de sensibilité (une série de dilutions de contrôles de sérums positifs) a été réalisée avec un lot de Test **NADAL® Cœliaque tTG** sur 10 jours consécutifs. Les analyses ont été réalisées par la même personne. Les résultats se ressemblent et démontrent ainsi la haute précision d'un jour à l'autre du test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG**.

### Précision inter-laboratoire

Trois courbes de sensibilité (une série de dilutions de contrôles de sérums positifs) ont été réalisées avec un lot de Test **NADAL® Cœliaque tTG**. Les analyses ont été réalisées le même jour par trois techniciens différents. Les résultats obtenus se ressemblent démontrant la haute précision du test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG** entre les tests.

### Précision inter-lot

Des courbes de sensibilité (une série de dilutions de contrôles de sérums positifs) ont été réalisées avec 3 lots de Simple CD3WB. Les analyses ont été réalisées par le même technicien. Celui-ci obtint le même résultat avec les trois lots reflétant la haute précision du test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG** entre différents lots.

## Effet crochet (effet hook)

Par « effet crochet », on entend l'effet survenant lorsque le résultat est affaibli ou lorsqu'un résultat positif vire au négatif en raison d'une concentration trop élevée de l'analyte recherché. Ainsi un échantillon de concentration élevé peut apparaître plus faible voire négatif.

Beaucoup d'échantillons positifs (sérum et sang) ont été testés sans observer de perte d'intensité de couleur de la ligne de test dans un cas de forte concentration d'immunoglobine anti-tTG.

## Réactions croisées

Les réactions croisées ont été analysées avec des substances souvent présentes dans le sang en utilisant un lot du test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG**. Les substances ont été ajoutées à la solution de dilution dans les concentrations indiquées dans le tableau. Une courbe de sensibilité a ensuite été établie.

Deux contrôles de sérum négatifs ont été testés.

Substance	Concentration finale	Diluant	Concentration dans la solution de dilution
aspirine	50 mg/ml	éthanol	2,5 mg/ml
caféine	10 mg/ml	eau	0,5 mg/ml
ibuprofène	8 mg/ml	eau	0,4 mg/ml
éthanol	500 mg/ml	eau	50 mg/ml
acide folique	0,4 mg/ml	eau	0,02 mg/ml
nicotine	20 mg/ml	eau	1 mg/ml
hémoglobine	15 mg/ml	eau	0,75 mg/ml
hCG	250000 mUI/ml	eau	500 mUI/ml
EDTA	20 mg/ml	eau	1 mg/ml
citrate de sodium	0,2 M	eau	0,01 M
héparine	500 mg/ml	eau	50 mg/ml

Aucune des substances analysées n'a affectée les performances du test **NADAL® Maladie de Cœliaque tTG**.

## 14. Bibliographie

- 1) Zhang J. et al. "Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP". The Journal of Biological Chemistry (1998) 273 (4): 2288-2295.
- 2) Sárdy M. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy". Clinical Chemistry (1999) 45 (12): 2142-2149.
- 3) Sorell L. et al. "One-step immunochromatographic assay for screening of celiac disease". Lancet (2002) 359: 945-946.
- 4) Drago S. et al. "Recent developments in the pathogenesis, diagnosis and treatment of celiac disease". Expert Opinion in Therapy Patents (2002) 12 (1): 45-51.
- 5) Hansson T. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase for diagnosis and follow-up of childhood coeliac disease". Pediatric Research (2002) 51 (6): 700-705.
- 6) Ferre-López, S. et al. "A reliable generation of immunochromatographic sticks for both t-TG and AGA screening in Coeliac Disease". Clinical Gastroenterology and Hepatology (in press)
- 7) Jennings J. et al. "New developments in celiac disease". Current Opinion in Gastroenterology (2003) 19 (2) : 117-129.

Rev. 2, 2013-06-27 AS

### 1. Uso Previsto

El test **NADAL® Celiacos (tTG)** es un test inmunocromatográfico diseñado para detección en sangre humana de anticuerpos (IgA/IgG/IgM) contra transglutaminasa tisular humana (tTG), principal autoantígeno reconocido por los anticuerpos antiendomisiales, en sangre completa o suero.

### 2. Introducción y significado clínico

La enfermedad celiaca es una enfermedad intestinal causada por una intolerancia permanente al gluten, una proteína que se encuentra en productos hechos de trigo, cebada, centeno y avena. En personas genéticamente susceptibles la ingesta continuada de esta proteína puede causar serias lesiones de la mucosa intestinal. Su diagnóstico se basa cambios histológicos característicos, tales como hiperplasia de las criptas con atrofia completa o parcial de las vellosidades que recubren el intestino e interferencias en la absorción de nutrientes, observada en biopsias intestinales. Sin embargo, pruebas serológicas como la detección de anticuerpos circulantes anti gliadina, anti-tTG y antiendomisiales son métodos de análisis menos invasivos y más económicos para detectar esta enfermedad.

### 3. Principios del test

Los anticuerpos anti-tTG presentes en la sangre de los pacientes celiacos reaccionan con partículas de látex conjugadas con tTG recombinante humana. Estos complejos, formados por partículas de látex, tTG y anticuerpos anti-tTG, migran cromatográficamente hacia el área de reacción. Esta área contiene tTG recombinante humana que reacciona con el complejo, generando una línea roja.

### 4. Reactivos y materiales provistos

- 10 test cassettes NADAL® Celiacos (tTG)
- 10 lancetas estériles
- 10 pipetas de recogida (20 µl)
- 1 buffer de dilución (3 ml)

### 5. Otros materiales necesarios

- Centrifugador (para suero sólo)
- Temporizador

### 6. Almacenamiento y conservación

Almacene los componentes del test de **NADAL® Celiacos (tTG)** refrigerados entre 2°C y 8°C en el embalaje original. La fecha de caducidad está indicada en el sobre. No utilice estos componentes más allá de la fecha de caducidad.

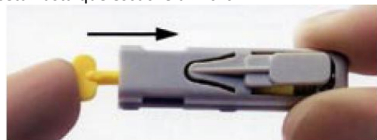
### 7. Advertencias y precauciones

- Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras de los pacientes (sangres) pueden contener agentes infecciosos y deberán ser tratadas y desechadas como materiales biológicos potencialmente peligrosos.
- No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
- Antes de usarlos, deje que todos los componentes del kit y muestras alcancen la temperatura ambiente, pues reactivos y/o muestras fríos pueden reducir la funcionalidad del test. De 20 a 30 minutos suele ser suficiente para alcanzar la temperatura ambiente.

- No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
- En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes está dañado.
- Es importante añadir la cantidad correcta de sangre en cada test. Si es inferior a la indicada puede ser que la cromatografía no funcione correctamente porque no llegue muestra a la zona de reacción, si es demasiada puede diluirse el reactivo y dar una línea débil.
- El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
- No usar el test si aparece alguna línea de color en la zona de resultados antes de empezar a usarlo.

### 8. Toma de muestras y preparación

- El test ha sido diseñado para su uso con muestras de sangre frescas, no hemolizadas, recogidas con las micropipetas incluidas.
- La sangre debe recogerse de la punta del dedo índice, corazón o anular.
- Limpie la zona con alcohol y déjelo secar al aire.
- Presione el protector amarillo de la lanceta estéril hacia la lanceta hasta que escuche un "click".



- Gire el protector para romperlo y extraígallo para liberar la punta de la lanceta



- Ponga la mano con la palma hacia arriba, coloque el extremo abierto de la lanceta sobre el dedo esterilizado y presione el botón de activación.



- Deseche la lanceta en un lugar apropiado para objetos punzantes.
- Las muestras en suero pueden almacenarse en el frigorífico un día.

### 9. Procedimiento del Test

#### I. Preparación

Ponga todos los componentes a temperatura ambiente antes de comenzar el test. Extraiga el cassette del sobre sellado y póngalo sobre una superficie limpia y lla. Tome una muestra de sangre en la forma descrita en el apartado anterior.

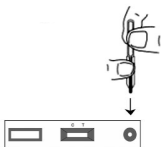
## II. Reacción con el test

### Sangre completa con uso de pipeta de recolección

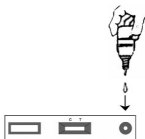
1. Mantener el dedo por debajo del codo y apretar varias veces suave e intermitentemente en la base de la punción.
2. Deseche la primera gota de sangre (limpiarla con una gasa estéril o un algodón).
3. Recoja la muestra de sangre con una micropipeta nueva (20 µl). Para ello, tocar la gota con la micropipeta, manteniéndola horizontal y con el orificio de ventilación libre **No presione el cuerpo central** de la pipeta para recoger sangre.



4. Llenar la micropipeta hasta la línea, evitando la formación de burbujas de aire.
5. Inmediatamente, coloque la muestra de sangre en la ventana del test para prevenir la coagulación. Para ello, apoyar verticalmente la micropipeta en el centro de la ventana circular señalada con una flecha (ventana de adición de la muestra), tapar con un dedo el orificio de ventilación de la micropipeta y presionar suavemente en la parte superior de la misma.



6. Esperar 30-60 seg, hasta que la sangre se absorba, y entonces añadir en la misma ventana dos gotas o 100 µl de tampón de dilución (con el gotero en posición vertical).



7. Observar el resultado a los 10 minutos.

### Sangre sin uso de la pipeta de colección

1. Aplique 20 µl de sangre en el centro de la ventana circular señalada con una flecha (ventana de adición de la muestra).
2. Esperar 30-60 seg, hasta que la sangre se absorba, y añadir en la misma ventana, dos gotas (100 µl) o buffer de dilución (con el gotero en posición vertical).
3. Observar el resultado a los 10 minutos.

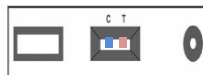
### Muestra en suero

1. Preparar una dilución de suero 1:10 con el buffer de dilución. Por ejemplo: 15 µl de suero + 135 µl de buffer de dilución. Mezclar bien mediante pipeteo suave.
2. Añadir cuidadosamente 125 µl de la dilución de suero, gota a gota, en el centro de la ventana circular, marcada con una flecha.
3. Observar el resultado a los 10 minutos.

## 10. Interpretación de resultados

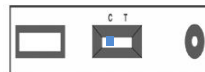
### Resultado Positivo

Además de la línea AZUL de control (C) aparece una línea ROSA/ROJA en la zona central del dispositivo de reacción alineada con la letra "T" marcada en la carcasa. La intensidad de esta coloración puede variar según la concentración de anticuerpos.



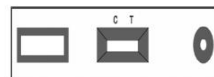
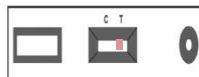
### Resultado Negativo

Sólo aparece una línea azul en la zona de control "C" marcada en la carcasa. No hay ninguna línea en la zona de test (T).



### Resultado inválido

No aparece una línea azul en la región de control (C). En este caso el resultado es inválido aunque aparezca una línea roja en la zona de test (T). La causa pueden ser desviaciones en el procedimiento del test o un volumen de muestra insuficiente. Por favor, revise la técnica y repita el test con un nuevo cassette.



**NOTA:** cualquier línea que aparezca después de 10 minutos no tiene valor de diagnóstico alguno.

**El diagnóstico final no se debe basar sólo en el resultado de un test. Se deberá fundamentar en la correlación de los resultados del test con otros datos y con la sintomatología clínica.**

## 11. Control de Calidad

El test NADAL® Celiacos (tTG) incluye un proceso de control interno. La línea azul que aparece en la zona de control (C) se considera como un procedimiento de control interno que confirma un volumen suficiente de muestra y que la cromatografía fue completada. Los controles estándar no se suministran con el test de celíacos NADAL, pero es recomendable que se realicen controles positivos y negativos como buena práctica de laboratorio para confirmar el procedimiento del test y verificar el funcionamiento correcto del test.

## 12. Limitaciones

- El test ofrece sólo un resultado cualitativo. No realice ninguna interpretación cuantitativa en base al color de la línea del test.
- Los resultados del test deben interpretarse junto con síntomas clínicos del paciente y otras pruebas.
- Para realizar un análisis correcto es importante utilizar el volumen apropiado de sangre y comprobar el tiempo de reacción para no recibir resultados erróneos.

## 13. Características de rendimiento

### Sensibilidad y Especificidad

**Evaluación nº1:** se realizó un estudio prospectivo, dirigido por la Dra. Carmen Ribes Koninckx, que incluyó a todos los



pacientes a los que se realizó una biopsia intestinal con fines diagnóstico en diversas unidades de Gastroenterología Pediátrica. De forma simultánea se determinaron anticuerpos anti-transglutaminasa por ELISA/EIA y mediante el test **NADAL® Celiacos (tTG)**.

Se analizaron 150 pacientes, 26 con histología normal (controles); 124 con lesión Marsh 3 y 2 con lesión Marsh 2 (pacientes celíacos). La sangre se recogió por punción digital y se utilizó inmediatamente.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Pacientes con enfermedad celíaca (124)			
Concordancia <b>NADAL® Celiacos (tTG)/ELISA</b> = 93,15%.			
		<b>NADAL® Celiacos (tTG)</b>	
		+ (110)	-(14)
<b>ELISA</b>	+ (114)	108	6
	- (10)	2*	8
Pacientes de control (26)			
Concordancia <b>NADAL® Celiacos (tTG)/ELISA</b> = 80%.			
		<b>NADAL® Celiacos (tTG)</b>	
		+ (2)	- (24)
<b>ELISA</b>	+ (5)	1	4
	- (21)	1	20

\*Déficit de IgA

La eficacia para el diagnóstico de enfermedad celíaca de los distintos métodos se muestra en la siguiente tabla.

	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Eficacia</i>
<b>NADAL® Celiacos (tTG)</b>	89 %	92,5 %	89,3 %
<b>tTG-IgA (EIA)</b>	91,9 %	80 %	90 %

**Evaluación nº2:** Se realizó un estudio poblacional transversal en niños de 5 a 9 años, no celíacos conocidos, que acudieron a su pediatra por cualquier motivo. El estudio lo realizaron un total de 34 pediatras de 11 centros del área metropolitana de Valencia y fue dirigido por la Dra. Carmen Ribes Koninckx.

Tras información y obtención de consentimiento, se extrajeron unas gotas de sangre por punción capilar para determinación de Abs anti tTG con el **NADAL® Celiacos (tTG)**. Si la prueba resultaba positiva se comprobaba el resultado, tras extracción de sangre venosa, por el método ELIA-Immunocap 100 (Phadia) y, si éste resultaba de también positivo, el niño se derivaba a una Unidad de Gastroenterología Infantil para su estudio.

Se evaluaron un total de 850 Simples, obteniéndose 7 resultados positivos:

- Cuatro positivos fuertes, con valores >100 U/ml en el test de Phadia y con biopsias intestinales con alteraciones histológicas compatibles con enfermedad celíaca.
- Tres positivos débiles. Dos con valores de 38 y 36 U/ml en el test de Phadia: el primero presentó en control posterior (2 meses más tarde) intensa elevación (>100 U/ml), por lo que se le realizó biopsia intestinal que también resultó compatible con enfermedad celíaca; el segundo tiene un familiar de primer grado diagnosticado de celiaquía (madre) y está pendiente de control serológico evolutivo. En el tercer caso la determinación en sangre venosa fue negativa.

En la muestra de estudio (n=850), con 5 casos confirmados, se ha encontrado una incidencia de celiaquía 1/170, que podría incrementarse a 1/141 si el paciente con control serológico pendiente resultase finalmente enfermo. En la población de 10647 niños del mismo rango de edad controlada por los participantes en este estudio existen 23 casos conocidos de celíacos, resultando una incidencia de 1/463.

Se han detectado 2,7 casos de EC silente-atípica por cada caso de enfermedad celíaca conocida previamente en este tramo de edad. Si extrapolamos los resultados obtenidos (en la muestra: 5/850 = 1/170; en la población total no celíaca: 10624/170 = 62) y los sumamos a los casos conocidos (23) obtendríamos una prevalencia total de 85 casos en esta población, dando una incidencia de enfermedad celíaca para esta edad de 1/125.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la alta utilidad del **NADAL® Celiacos (tTG)** para posibles programas de cribado de enfermedad celíaca.

**Evaluación nº 3:** Se han analizado 101 muestras de sangre (**NADAL® Celiacos (tTG)**) y sus respectivas muestras de suero (ALPHADIA Immunodot gliadin-tTransglutaminasa DOT KIT) de pacientes celíacos (diagnosticados, siguiendo o no dieta libre de gluten, y recién diagnosticados), parientes de celíacos y pacientes con síntomas de trastornos gastrointestinales (diarrea, desnutrición, dolor abdominal, ...).

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

		Alphadia ImmunoDot	
		Positivo (11)	Negativo (90)
NADAL® Celiacos (tTG)	Positivo (12)	11	1
	Negativo (89)	0	89
Porcentaje de concordancia: 99 %			
Concordancia de sensibilidad: >99%.			
Concordancia de especificidad: 98,9%.			

**Evaluación nº 4:** Se evaluó la sensibilidad y especificidad del **NADAL® Celiacos (tTG)** mediante el análisis de 49 muestras de sangre: 18 pacientes sospechosos de celiaquía, 31



pacientes negativos (celíacos a dieta o con otras patologías). El estudio fue llevado a cabo en un hospital de referencia de celiacía en Italia y organizado por Eurospital.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

		Eurospital	
		Positivas (18)	Negativas (31)
NADAL® Celiacos (tTG)	Positivas (17)	17	0
	Negativas (32)	1	31
Sensibilidad: 94,4 %			
Especificidad: 100 %			
Valor predictivo positivo: 100 %			
Valor predictivo negativo: 96,9 %			

Precisión

Precisión intraensayo

Con 1 lote de NADAL® Celiacos (tTG) se analizaron 10 curvas de sensibilidad (diluciones seriadas de un suero control positivo). El análisis lo realizó la misma persona y en el mismo día. Los resultados obtenidos en todas las curvas fueron semejantes, demostrando la alta precisión intraensayo del NADAL® Celiacos (tTG).

Precisión interdía

Con 1 lote de NADAL® Celiacos (tTG) se realizó una curva de sensibilidad (diluciones seriadas de un suero control positivo) a lo largo de 10 días consecutivos. El análisis lo realizó la misma persona y los resultados obtenidos fueron semejantes todos los días, demostrando la alta precisión interdía del NADAL® Celiacos (tTG).

Precisión interlaboratorio

Con 1 lote de NADAL® Celiacos (tTG) se analizaron 3 curvas de sensibilidad (diluciones seriadas de un suero control positivo). El análisis lo realizaron tres personas y en el mismo día. Los resultados obtenidos en los tres casos fueron semejantes, demostrando la alta precisión intraensayo del test NADAL® Celiacos (tTG).

Precisión interlote

Con 3 lotes de NADAL® Celiacos (tTG) se realizó una curva de sensibilidad (diluciones seriadas de un suero control positivo). El análisis lo realizó una misma persona y los resultados obtenidos con los tres lotes fueron semejantes, demostrando la alta precisión interlote del NADAL® Celiacos (tTG).

Efecto Hook

El efecto Hook es el efecto que se produce cuando, en presencia de elevadas concentraciones del analito a detectar,

se produce una disminución de la señal obtenida, llegándose incluso a negativizar muestras positivas.

Se han probado numerosas muestras positivas (suero y sangre) sin que se haya observado una disminución de la intensidad de la línea de test en los casos de mayor contenido en inmunoglobulinas anti-tTG. Así pues, no se observa efecto Hook.

Reacciones cruzadas

Se analizaron con un lote de NADAL® Celiacos (tTG) una serie de sustancias interferentes que podrían llegar a encontrarse en sangre. Las sustancias interferentes fueron añadidas al tampón de dilución en la cantidad final indicada en la tabla anexa, y se realizó una curva de sensibilidad. Se analizaron también dos controles negativos.

Sustancia	Concentración inicial	Diluyente	Concentración en tampón
Aspirina	50 mg/ml	Etanol	2,5 mg/ml
Cafeína	10 mg/ml	Agua	0,5 mg/ml
Ibuprofeno	8 mg/ml	Agua	0,4 mg/ml
Etanol	500 mg/ml	Agua	50 mg/ml
Ácido fólico	0,4 mg/ml	Agua	0,02 mg/ml
Ácido nicotínico	20 mg/ml	Agua	1 mg/ml
Hemoglobina	15 mg/ml	Agua	0,75 mg/ml
hCG	250000 mUI/ml	Agua	500 mUI/ml
EDTA	20 mg/ml	Agua	1 mg/ml
Citrato Sódico	0,2 M	Agua	0,01 M
Heparina	500 mg/ml	Agua	50 mg/ml

Ninguna de las sustancias probadas afecta al buen funcionamiento del test NADAL® Celiacos (tTG).

14. Referencias

1. Zhang J. et al. "Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP". The Journal of Biological Chemistry (1998) 273 (4): 2288-2295.

2. Sárdy M. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy". Clinical Chemistry (1999) 45 (12): 2142-2149.

3. Sorrell L. et al. "One-step immunochromatographic assay for screening of celiac disease". Lancet (2002) 359: 945-946.

4. Drago S. et al. "Recent developments in the pathogenesis, diagnosis and treatment of celiac disease". Expert Opinion in Therapy Patents (2002) 12 (1): 45-51.

5. Hansson T. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase for diagnosis and follow-up of childhood coeliac disease". Pediatric Research (2002) 51 (6): 700-705.

6. Ferre-López, S. et al. "A reliable generation of immunochromatographic sticks for both t-TG and AGA screening in Coeliac Disease". Clinical Gastroenterology and Hepatology (2004) 2 (6): 480-484.

7. Jennings J. et al. "New developments in celiac disease". Current Opinion in Gastroenterology (2003) 19 (2): 118-129.

Rev. 1, 2012-01-23 IA

### 1. Uso Previsto

Il test **NADAL® Celiachia (tTG)** è un test rapido immunocromatografico progettato per rilevare gli anticorpi (IgA/IgG/IgM) anti-transglutaminasi tessutale umana, il principale antigene riconosciuto dagli anticorpi anti-endomisio, nel sangue intero o nel siero.

### 2. Introduzione

La Celiachia (*CD, Celiac Disease*) è un disordine intestinale (enteropatia) causato da una permanente intolleranza al glutine, una proteina presente nei prodotti contenenti frumento, orzo e segale. Nelle persone geneticamente predisposte, la ripetuta ingestione di questa proteina comporta serie lesioni della mucosa intestinale. Una diagnosi di Celiachia è basata su caratteristici cambiamenti istologici, come l'iperplasia delle cripte con completa o parziale atrofia dei villi intestinali, osservata nelle biopsie intestinali. Tuttavia, test serologici come il rilevamento di anticorpi anti-glandina circolanti, anti-tTG e anti-endomisio rappresentano i metodi meno invasivi e più economici per identificare la malattia.

### 3. Principio del Test

Gli anticorpi anti-tTG presenti nel sangue dei pazienti celiaci reagiscono con le particelle di lattice coniugate con il ricombinante umano tTG. Questi complessi formati di particelle di lattice, anticorpi tTG e anti-tTG, migrano attraverso un processo cromatografico verso la zona reattiva. Quest'area contiene ricombinante umano tTG, che reagisce con il complesso, generando una linea rossa.

### 4. Reagenti e Materiali Forniti

- 10 test a cassetta NADAL® Celiachia (tTG)
- 10 Lancette sterili
- 10 pipette (20 µl)
- 1 tampone di diluizione (3 ml)

### 5. Altri materiali necessari

- Centrifugatore (solo per il siero)
- Cronometro

### 6. Conservazione e stabilità

I componenti del kit per il test **NADAL® Celiachia (tTG)** vanno conservati nella confezione originale tra 2°C e 8°C. La data di scadenza è indicata sulla confezione. Non usare i componenti oltre la data di scadenza.

### 7. Avvertenze e precauzioni

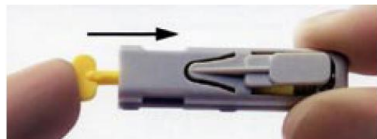
- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- I campioni di sangue dei pazienti possono contenere agenti infetti e dovrebbero essere trattati e smaltiti come materiali biologici potenzialmente pericolosi.
- Non scambiare i componenti provenienti da kit con differenti numeri di lotto.
- Prima dell'uso, lasciare che tutti i componenti del kit ed i campioni raggiungano temperatura ambiente, in quanto i campioni e/o i reagenti ancora freddi possono ridurre l'efficacia del test. Sono solitamente sufficienti 20-30 minuti per raggiungere temperatura ambiente.
- Non usare campioni del kit dopo la data di scadenza.

- Se la confezione è rotta, il prodotto può essere ancora utilizzato a patto che i componenti non siano stati danneggiati.
- È importante mettere la corretta quantità di sangue in ogni test. Se la quantità è inferiore a quella indicata, la cromatografia potrebbe non verificarsi in quanto il campione potrebbe non raggiungere la zona reattiva; se messo in quantità maggiore, il reagente potrebbe risultare diluito e produrre una linea tenue.
- Il prodotto utilizzato deve essere smaltito secondo quanto stabilito dalla legge vigente.
- Non usare il test nel caso in cui prima dell'utilizzo appaia una linea colorata nella zona del risultato.

### 8. Raccolta e preparazione del campione

#### Campionamento

- Il test è stato designato per l'uso con campioni di sangue fresco, non emolizzato, per essere raccolto con le pipette contenute nel kit.
- Il sangue dovrebbe raccolto dal polpastrello del dito indice, dito medio o anulare.
- Pulire il polpastrello con alcool e lasciare asciugare all'aria.
- Premere la protezione gialla della lancetta sterile verso l'interno della lancetta fino a sentire un click.



- Ruotare la protezione per romperla e in seguito estrarla, liberando la punta della lancetta.



- Posizionare la punta della lancetta sul dito disinfettato e premere la levetta di attivazione in alto.



- Gettare la lancetta in un contenitore adatto per oggetti affilati.

#### Trasporto e Conservazione

- Il campione può essere conservato in frigorifero per un giorno.

### 9. Procedura del Test

#### I. Preparazione

Portare tutti i componenti del kit test **NADAL® Celiachia (tTG)** a temperatura ambiente prima di aprirlo. Togliere il test a cassetta dall'involucro e posizionarlo su una superficie pulita e

orizzontale. Prendere un campione di sangue come descritto al punto 8 "Campionamento".

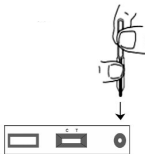
## II. Esecuzione del test

### Sangue intero con l'uso della pipetta

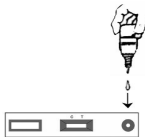
1. Tenere il dito più basso rispetto al gomito e premere sulla punta diverse volte, delicatamente ed intermittenemente.
2. Non utilizzare la prima goccia, ma rimuoverla con una garza sterile o del cotone.
3. Raccogliere la successiva goccia di sangue con una nuova pipetta sterile (20 µl), facendo toccare la goccia di sangue con l'estremità della pipetta. Tenere la pipetta in posizione orizzontale e lasciare libero il foro di ventilazione. **Non premere la parte centrale della pipetta, consentendo al sangue di essere raccolto.**
4. Riempire la pipetta fino alla linea. Evitando bolle d'aria.



5. Porre immediatamente il campione di sangue nel dispositivo reattivo del test a cassetta per prevenire la coagulazione nella pipetta. Posizionare con cautela la pipetta al centro del pozzetto segnalato con una freccia (pozzetto per l'aggiunta del campione), poi coprire il foro di ventilazione della pipetta con un dito e premere delicatamente la parte superiore della pipetta.



6. Attendere **30-60 secondi**, fino a che il sangue sia assorbito; poi (tenendo il dosatore in posizione verticale) aggiungere due gocce (100 µl) di tampone di diluizione nello stesso pozzetto.
7. Attivare il timer e leggere il risultato dopo **10 minuti**.



### Sangue intero senza l'uso della pipetta

1. Inserire **20 µl** di sangue al centro del pozzetto (segnato con una freccetta).
2. Aspettare **30-60 secondi** fino a che il sangue sia assorbito; poi (tenendo il dosatore in posizione verticale) aggiungere **due gocce (100 µl) di tampone di diluizione** nello stesso pozzetto.
3. Attivare il timer e leggere il risultato dopo **10 minuti**.

### Campioni di siero

1. Preparare una diluizione di **1/10 di siero nel tampone di diluizione** (per esempio 15 µl di siero + 135 µl di

tampone di diluizione) e mescolare bene agitando delicatamente con pipetta.

2. Aggiungere **125 µl diluizione**, goccia a goccia al centro del pozzetto.
3. Controllare il risultato dopo **10 minuti**.

## 10. Interpretazione dei risultati

### Positivo

#### Due linee distinte.

Una linea blu appare nella regione di controllo (C) e una linea rossa nella regione di test (T). L'intensità del colore della linea varierà in relazione alla concentrazione di anticorpi presenti.



### Negativo

#### Solo una linea.

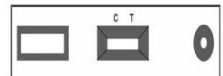
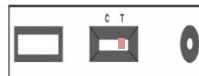
Appare una singola linea blu nella regione di controllo (C). Non c'è nessuna linea nella regione di test (T).



### Invalido

#### Nessuna linea blu di controllo.

In questo caso il risultato non è valido anche se appare la linea rossa nella regione di test (T). Le cause di questo risultato potrebbero risultare una deviazione dalla corretta procedura di test o un insufficiente volume del campione. Si consiglia di controllare la procedura del test per possibili errori e di ripetere il test con un nuovo test a cassetta. Se il problema persiste, si prega di contattare il produttore.



**Note:** qualunque linea appaia dopo 10 minuti non ha più nessun valore diagnostico.

**La diagnosi finale dovrebbe basarsi sul risultato di un solo test. La diagnosi deve essere stabilita in correlazione ai risultati di test condotti con altri dati appropriati ed ai sintomi clinici.**

## 11. Controllo di qualità

C'è un controllo interno incluso nel test **NADAL® Celiachia (tTG)**. La linea blu che appare nella regione di controllo (C) è considerata come un controllo procedurale interno. Esso conferma un sufficiente volume del campione e che la cromatografia è completa. Controlli standard non sono offerti con il kit **NADAL® Celiachia (tTG)**; però si raccomanda che controlli positivi e negativi siano testati come buone procedure di laboratorio per confermare le procedure di test e per verificare una corretta performance del test..

## 12. Limiti del Test

- Il test fornisce solo un risultato qualitativo. Non devono essere fatte interpretazioni sull'intensità del colore della linea di test.

- I risultati del test vanno utilizzati in correlazione con altre informazioni derivanti dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.
- Per svolgere un corretto test è importante usare la corretta quantità di sangue e controllare la reazione in tempo per non ricevere risultati errati.

### 13. Performance

#### Sensibilità e specificità

**Valutazione n°1:** è stato realizzato uno studio prospettico sotto la direzione della Dott.ssa Carmen Ribes Koninckx, riguardante tutti i pazienti sui quali era stata effettuata, per scopi diagnostici, una biopsia intestinale in varie unità di Gastroenterologia Pediatrica. Gli anticorpi anti-TG vennero rilevati simultaneamente attraverso ELISA/EIA e il test **NADAL® Celiachia (tTG)**.

Un totale di 150 pazienti hanno effettuato le analisi, 26 con istologia normale (controlli), 124 con lesione di tipo Marsh 3 e con lesione di tipo Marsh 2 (pazienti con malattia celiaca). Il sangue è stato prelevato dalle estremità delle dita e utilizzato immediatamente.

I risultati sono presentati nella tavola sottostante:

Pazienti con malattia celiaca (n.124)			
<b>NADAL® Celiachia (tTG)/ELISA</b> Concordanza = 93,15 %.			
		<b>NADAL® Celiachia (tTG)</b>	
		Positivo (110)	Negativo (14)
<b>ELISA</b>	Positivo (114)	108	6
	Negativo (10)	2*	8
Controllo Pazienti (n. 26)			
<b>NADAL® Celiachia (tTG)/ELISA</b> Concordanza = 80 %.			
		<b>NADAL® Celiachia (tTG)</b>	
		Positivo (2)	Negativo (24)
<b>ELISA</b>	Positivo (5)	1	4
	Negativo (21)	1	20

\*Déficit di IgA

L'efficacia dei diversi metodi della CD è presentata nella tavola sottostante:

	<b>Sensibilità</b>	<b>Specificità</b>	<b>Efficacia</b>
<b>NADAL® Celiachia (tTG)</b>	89 %	92,5 %	89,3 %
<b>tTG-IgA (EIA)</b>	91,9 %	80 %	90 %

**Valutazione n°2:** Uno studio trasversale sulla popolazione fu condotto su bambini dai 5 ai 9 anni, non noti per avere CD,

che si sottoposero a visite pediatriche per motivi vari. Sotto la direzione della Dott.ssa Carmen Ribes Koninckx, lo studio fu realizzato da 34 pediatri in 11 differenti centri dell'area metropolitana di Valencia.

Dopo aver ottenuto il consenso informato, alcune gocce di sangue furono prelevate tramite una puntura capillare, per determinare gli anticorpi anti-tTG utilizzando il test **NADAL® Celiachia (tTG)**. In caso di test positivo, il risultato veniva verificato tramite ELIA-Inmunocap 100 (Phadia) dopo un prelievo sanguigno con venipuntura; se il risultato era ancora positivo, il bambino veniva mandato presso l'Unità di Gastroenterologia Infantile per ulteriori studi.

Furono valutati un totale di 850 test **NADAL® Celiachia (tTG)**, ottenendo 7 risultati positivi:

- Quattro risultati fortemente positivi, con valori > 100 U/ml nel test Phadia e con biopsie intestinali mostranti alterazioni istologiche compatibili con la malattia celiaca.
- Tre debolmente positivi. Due risultati con test Phadia del valore di 38 e 36 U/ml. Il primo di questi due casi presentò un dato molto elevato (>100 U/ml) in un controllo effettuato 2 mesi dopo; fu quindi effettuata una biopsia intestinale ed anche il risultato fu compatibile con CD. Il secondo caso ha visto un parente di primo grado (madre) sottoposto a diagnosi con CD e attese lo sviluppo di controlli serologici. Nel terzo caso di positività debole, il prelievo del sangue venoso risultò negativo.

Nel campione esaminato (N=850), con 5 casi confermati, è stata rilevata un'incidenza di CD di 1/170; questa potrebbe elevarsi fino a 1/141 se il paziente su cui è in corso il controllo serologico si rivelasse malato. Nella popolazione di 10647 bambini dello stesso rango di età controllati dai partecipanti allo studio, vi erano 23 casi noti di malattia celiaca; l'incidenza della CD era dunque di 1/463.

Per ogni caso di 'malattia celiaca previamente nota in questo rango di età, sono stati rilevati 2.7 casi di CD silente/atipica. Estrapolando i risultati ottenuti (nel campione: 5/850 = 1/170; nel totale della popolazione non-CD: 10624/170 = 62) ed aggiungendo i casi noti (23), otteniamo una prevalenza totale di 85 casi in questa popolazione. Questo produce un'incidenza di CD di 1/125 per questo rango di età.

I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che il test **NADAL® Celiachia (tTG)** può essere altamente utile in programmi di monitoraggio della CD.

**Valutazione n°3:** Questa valutazione copre 101 campioni di sangue (analizzati con il test **NADAL® Celiachia (tTG)**) e i rispettivi campioni di siero. Se han analizado 101 muestras de sangre (**NADAL® Celiachia (tTG)** y sus respectivas muestras de suero (Alphadia Immunodot Gliadin-tTG Dot Kit) di pazienti affetti da CD (diagnosticata, sia in caso di dieta priva di glutine o meno, più nuova diagnosi), parenti di pazienti con CD e pazienti con sintomi gastrointestinali (diarrea, malnutrizione, dolori addominali, ecc.).

I risultati sono presentati nella tavola sottostante:

		<i>Alphadia ImmunoDot</i>	
		Positivo (11)	Negativo (90)
<b>NADAL® Celiachia (tTG)</b>	Positivo (12)	11	1
	Negativo (89)	0	89
Porcentuale di concordanza: 99 %			
Concordanza di sensibilità: >99%.			
Concordanza di specificità: 98,9%.			

Valutazione n°4: la sensibilità e la specificità del test **NADAL® Celiachia (tTG)** vennero valutate analizzando 49 campioni di sangue: 18 pazienti sospetti di avere CD, 31 di pazienti negativi (con CD e sotto regime di dieta priva di glutine o con altre ptologie). Organizzato da Eurospital, lo studio fu effettuato in un ospedale italiano di riferimento per CD.

I risultati sono presentati nella tavola sottostante :

		<i>Eurospital</i>	
		Positivi (18)	Negativi (31)
<b>NADAL® Celiachia (tTG)</b>	Positivi (17)	17	0
	Negativi (32)	1	31
Sensibilità: 94,4 %			
Specificità: 100 %			
PPV: 100 %			
NPV: 96,9 %			

#### Precisione

##### Precisione intra-saggio

Con un lotto di test **NADAL® Celiachia (tTG)**, sono state effettuate 10 curve di sensibilità (diluizioni in serie con siero di controllo positivo). Le analisi vennero effettuate dalla stessa persona nello stesso giorno. I risultati ottenuti in tutte le curve risultarono similari, il che dimostra la precisione intra-saggio del test **NADAL® Celiachia (tTG)**.

##### Precisione inter-day

Con un lotto di test **NADAL® Celiachia (tTG)**, è stata eseguita una curva di sensibilità (diluizioni in serie con siero di controllo positivo) per 10 giorni consecutivi. Le analisi vennero effettuate dalla stessa persona, ottenendo ogni giorno risultati simili, che dimostrano l'alta precisione inter-day del test **NADAL® Celiachia (tTG)**.

##### Precisione inter-laboratorio

Con un lotto di test **NADAL® Celiachia (tTG)**, sono state eseguite tre curve di sensibilità (diluizioni in serie con siero di controllo positivo). Le analisi vennero effettuate da tre tecnici durante lo stesso giorno. I risultati ottenuti furono simili in tutti e tre i casi, dimostrando quindi l'alta precisione inter-laboratorio del test **NADAL® Celiachia (tTG)**.

##### Precisione inter-lotto

Con tre lotti del test **NADAL® Celiachia (tTG)**, è stata eseguita una curva di sensibilità (diluizioni in serie con siero di controllo positivo). Le analisi vennero effettuate dagli stessi tecnici, ottenendo risultati simili con tutti e tre i lotti e dimostrando quindi l'alta precisione inter-lotto del test **NADAL® Celiachia (tTG)**.

##### Effetto Hook

L'effetto Hook è un effetto che si produce quando, in presenza di un'alta concentrazione dell'analita da individuare, si verifica una diminuzione nel segnale ottenuto, con addirittura la possibilità che campioni positivi appaiano negativi. In tal modo, ad un campione con alta concentrazione può essere assegnata una quantificazione molto inferiore rispetto alla realtà, o addirittura un valore negativo.

Molti campioni positivi (siero e sangue) sono stati testati senza che si verificasse una diminuzione dell'intensità della striscia positiva in caso di tasso elevato di anticorpi anti-tTG. Di conseguenza, nessun effetto Hook è stato rilevato.

##### Sostanze interferenti

Con un lotto di **NADAL® Celiachia (tTG)**, sono state esaminate numerose sostanze interferenti che potrebbero essere presenti nel sangue. Le sostanze interferenti vengono aggiunte al tampone nella quantità mostrata nella tabella, ed è stata effettuata una curva di sensibilità. Due controlli negativi di siero sono stati esaminati.

<i>Sostanza</i>	<i>Concentrazione iniziale</i>	<i>Diluente</i>	<i>Concentrazione nel tampone</i>
Aspirina	50 mg/ml	Etanolo	2,5 mg/ml
Caffeina	10 mg/ml	Acqua	0,5 mg/ml
Ibuprofene	8 mg/ml	Acqua	0,4 mg/ml
Etanolo	500 mg/ml	Acqua	50 mg/ml
Acido folico	0,4 mg/ml	Acqua	0,02 mg/ml
Acido nicotinico	20 mg/ml	Acqua	1 mg/ml
Emoglobina	15 mg/ml	Acqua	0,75 mg/ml
hCG	250000 mUI/ml	Acqua	500 mUI/ml

<i>Sostanza</i>	<i>Concentrazione iniziale</i>	<i>Diluente</i>	<i>Concentrazione nel tampone</i>
EDTA	20 mg/ml	Acqua	1 mg/ml
Citrato di sodio	0,2 M	Acqua	0,01 M
Eparina	500 mg/ml	Acqua	50 mg/ml

Nessuna delle sostanze esaminate ha influito sulle corrette performances del test.

#### 14. Bibliografia

8. Zhang J. et al. "Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP". The Journal of Biological Chemistry (1998) 273 (4): 2288-2295.
9. Sárdy M. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy". Clinical Chemistry (1999) 45 (12): 2142-2149.
10. Sorell L. et al. "One-step immunochromatographic assay for screening of celiac disease". Lancet (2002) 359: 945-946.
11. Drago S. et al. "Recent developments in the pathogenesis, diagnosis and treatment of celiac disease". Expert Opinion in Therapy Patents (2002) 12 (1): 45-51.
12. Hansson T. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase for diagnosis and follow-up of childhood coeliac disease". Pediatric Research (2002) 51 (6): 700-705.
13. Ferre-López, S. et al. "A reliable generation of immunochromatographic sticks for both t-TG and AGA screening in Coeliac Disease". Clinical Gastroenterology and Hepatology (2004) 2 (6): 480-484.
14. Jennings J. et al. "New developments in celiac disease". Current Opinion in Gastroenterology (2003) 19 (2): 118-129.

Rev. 1, 2012-01-23 IF

### 1. Zastosowanie

Test **NADAL® Celiac Disease (tTG)** jest prostym immunochromatograficznym testem, który służy do wykrywania przeciwciał (IgA/IgG/IgM) przeciwko transglutaminazie tkankowej (tTG), przede wszystkim autoantygenowi przeciwciała przeciwko endomysium we krwi pełnej i surowicy.

### 2. Wprowadzenie i znaczenie diagnostyczne

Celiac Disease (CD) należy do chorób jelita (enteropatia), spowodowanych nietolerancją glutenu zawartego w zbożach tzn. białka zawartego w pszenicy, jęczmieniu i życie. U osób z predyspozycjami genetycznymi spożywanie tego białka powoduje poważne uszkodzenia błony śluzowej jelita. Rozpoznanie celiakii następuje w wyniku charakterystycznych zmian histologicznych jak np. celiakia z całkowitym lub częściowym zanikiem kosmków jelitowych, co można zaobserwować podczas biopsji jelita. Jednakże serologiczne testy prezentują mniej inwazyjne i korzystniejsze metody takie jak wykrycie przeciwciał antygliadynowych, przeciwciał przeciw transglutaminazie tkankowej (tTG) i przeciwciał przeciwko endomysium.

### 3. Zasady działania testu

Obecne we krwi pacjentów z chorobą trzewną przeciwciała przeciw tTG reagują z cząsteczkami lateksowymi skoniugowanymi z rekombinatem ludzkiego tTG. Kompleks złożony z lateksowych cząstek oraz tTG i przeciwciał przeciw tTG podlega chromatograficznemu procesowi w polu reakcji. Obszar ten zawiera rekombinowane tTG ludzkie, które reaguje z kompleksem i powoduje pojawienie się czerwonej linii.

### 4. Części składowe zestawu

- 10 testów kasetowych NADAL® Celiac Disease (tTG)
- 10 sterylnych nakłuwaczy
- 10 pipet (20 µl)
- 1 bufor rozcieńczający (3 ml)

### 5. Dodatkowo potrzebne materiały

- Wirówka (dla próbek surowicy)
- Stoper

### 6. Data ważności i przechowywanie

Wszystkie części składowe testu **NADAL® Celiac Disease (tTG)** należy przechowywać w oryginalnie zamkniętym opakowaniu schłodzone w temperaturze 2°C - 8°C. Data ważności znajduje się na zawnętrznym opakowaniu testu. Nie używać testu po upływie daty ważności.

### 7. Uwagi i środki ostrożności

- Tylko do profesjonalnej diagnostyki *in vitro*.
- Próbkę pacjentów mogą być zainfekowane i należy je traktować i usuwać jako potencjalnie niebezpieczny materiał biologiczny.
- Nie używać dwóch elementów z zestawów o różnych numerach partii.
- Przed przeprowadzeniem badania należy doprowadzić wszystkie komponenty zestawu i próbki do temperatury pokojowej, ponieważ zimne odczynniki i próbki obniżają funkcjonalność testu. Zazwyczaj wystarcza 20-30 minut, by zestaw osiągnął temperaturę pokojową.
- Nie używać testu po upływie daty ważności.

- Jeśli opakowanie zewnętrzne jest uszkodzone, mimo to można używać zestawu, dopóki żaden z komponentów testu nie jest uszkodzony.
- Bardzo ważne jest dodanie odpowiedniej ilości próbki do testu. W przypadku dodania niewystarczającej ilości, wynik w polu reakcji może się nie pojawić. Dodanie ilości większej niż wymagana może doprowadzić do pojawienia się niewyraźnej linii, ponieważ próbka uległa rozcieńczeniu.
- Zużyty test powinien być usunięty zgodnie z obowiązującymi przepisami.
- Nie używać testu w przypadku obecności barwnej linii w polu wyników.

### 8. Pobieranie, przygotowywanie i przechowywanie próbek

#### Pobieranie próbek

- Test wymaga użycia świeżej, niehemolizowanej próby krwi. Zestaw zawiera pipetę do pobierania kropli krwi.
- Krew powinna zostać pobrana z opuszka palca wskazującego, środkowego lub serdecznego.
- Należy przetrzeć opuszek palca alkoholem i zaczekać do samostannego wyschnięcia.
- Należy wcisnąć żółtą nasadkę ochronną do środka sterylnego nakłuwacza do momentu usłyszenia kliknięcia (1).
- Przekręcić nasadkę ochronną w celu jej złamania, usunięcia i odsłonięcia igły nakłuwacza (2).
- Obrócić wewnętrzną stronę dłoni ku górze i nakłuć palec sterylnym nakłuwaczem naciskając wyzwalacz (3).
- Usunąć nakłuwacz do pojemnika przeznaczanego na ostre przedmioty.

(1)



(2)



(3)



#### Przechowywanie próbek

- Próbkę surowicy można przechowywać w lodówce przez jeden dzień.

## 9. Przeprowadzanie testu

### I. Przygotowanie

Test **NADAL® Celiac Disease (tTG)** doprowadzić do temperatury pokojowej. Wyjąć test z opakowania foliowego i położyć na czystej, równej powierzchni.

Pobrać próbkę krwi, tak jak zostało to opisane w punkcie 8 „Pobieranie, przygotowywanie i przechowywanie próbek”.

### II. Przeprowadzanie testu

#### Próbka krwi pełnej z użyciem dołączonej pipety

1. Należy trzymać palec poniżej linii łokcia, a następnie masować dłoń od nadgarstka w kierunku palca. Czekać na pojawienie się kropli krwi w miejscu ułknięcia.

2. Pierwszą kroplę krwi należy wytrzeć sterylnym wacikiem.

3. Pobrać próbkę za pomocą sterylnej mikropipety poprzez dotknięcie krwi jej koniuszkiem. Należy trzymać mikropipetę poziomo, uważać by nie zatkać jej górnego końca. **Nie ścisnąć mikropipety na środku, by pobrać krew za pomocą przyciągania kapilarnego.**

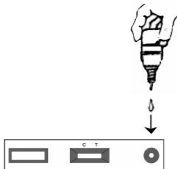


4. Napęlić mikropipetę do oznaczonych linii (ca. 20 µl). Unikać powstawania pęcherzyków powietrza.

5. Bezpośrednio po pobraniu próbki, nakropić krew z mikropipety do okrągłego pola testowego, unikając hemostazy w mikropipecie. Delikatnie trzymać mikropipetę nad środkiem okrągłego pola testowego (oznaczonego na obrazku strzałką). Przykryć górny koniec pipety palcem, jednocześnie lekko naciskając na jej górną część.



6. **Odczekać 30 do 60 sekund**, aż krew zostanie wchłonięta na membranę testu i trzymając pionowo buteleczkę z roztworem, dodać **2 krople (100 µl) buforu rozcieńczającego** do tego samego pola.



7. Włączyć stoper i odczytać wynik po **10 minutach**.

#### Próbka krwi pełnej bez użycia dołączonej pipety

1. Nakropić **20 µl krwi** do okrągłego pola testowego (oznaczonego na obrazku strzałką).
2. **Odczekać 30 do 60 sekund**, aż krew zostanie wchłonięta na membranę testu i trzymając pionowo

buteleczkę z roztworem, dodać **2 krople (100 µl) buforu rozcieńczającego** do tego samego pola.

3. Włączyć stoper i odczytać wynik po **10 minutach**.

#### Próbka surowicy

1. Przygotować **rozcieńczoną surowicę 1:10** za pomocą buforu rozcieńczającego. Na przykład: 15 ml surowicy + 135 ml buforu. Wymieszać za pomocą wielokrotnego pipetowania.
2. Nakropić **kropla po kropli 125 µl rozcieńczonej surowicy** do okrągłego okienka pola testowego.
3. Włączyć stoper i odczytać wynik po **10 minutach**.

## 10. Interpretacja wyników

### Pozytywny

**Pojawia się dwie linie.**

Niebieska linia pojawia się w polu kontrolnym (C), czerwona linia w polu testowym (T). Intensywność koloru może być różna z powodu koncentracji przeciwciał.



### Negatywny

**Pojawia się tylko niebieska linia w polu kontrolnym (C).**

Nie pojawia się czerwona linia w polu testowym (T).



### Nieważny

**Nie pojawi się niebieska linia w polu kontrolnym (C).** W tym przypadku wynik testu jest nieważny, nawet gdy pojawi się czerwona linia w polu testowym. Brak niebieskiej linii w polu kontrolnym może być spowodowany nieprawidłowym przeprowadzeniem testu lub zbyt małą ilością próbki. Należy dokładnie stosować się do instrukcji obsługi i powtórzyć badanie nowym testem. Jeżeli sytuacja się powtórzy należy skontaktować się z producentem.



**Uwaga:** Każda linia, która pojawi się po 10 minutach nie ma znaczenia diagnostycznego.

**Ostateczna diagnoza nie powinna opierać się wyłącznie na wyniku testu, lecz powinna być postawiona w korelacji z innymi danymi testu i kontrolą symptomów klinicznych.**

## 11. Kontrola jakości

Test **NADAL® Celiac Disease (tTG)** zawiera funkcję kontroli wewnętrznej (linia kontrolna), która pokazuje, czy została dodana odpowiednia ilość próbki lub czy przebiegła prawidłowo chromatografia. Zestaw testowy **NADAL® Celiac Disease (tTG)** nie zawiera kontroli. Jednak według dobrej praktyki laboratoryjnej zaleca się wykonanie kontroli pozytywnej i negatywnej w celu ustalenia prawidłowego funkcjonowania i przeprowadzenia testu.

## 12. Ograniczenia testu

- Jest to badanie jakościowe. Ocena nie powinna podlegać interpretacji ilościowej na podstawie intensywności koloru pozytywnej linii.
- Wyniki testu powinny być interpretowane razem z innymi wynikami klinicznymi.
- Ważne jest zastosowanie odpowiedniej ilości krwi oraz kontrolowanie czasu reakcji, w celu uniknięcia fałszywego wyniku.

## 13. Charakterystyka testu

### Czułość i swoistość

**Ocena 1:** Pod nadzorem dr Carmen Ribes Koninckx przeprowadzono badanie prospektywne obejmujące 150 pacjentów, którzy zostali poddani biopsji jelita w celach diagnostycznych przez różnych gastroenterologów dziecięcych. Przeciwciała anty-TG zostały wykryte jednocześnie przez ELISA / EIA i **NADAL® Celiac Disease (tTG)**.

Ze 150 przebadanych pacjentów, 26 osób było z normalną histologią (kontrola), 122 w skali Marsha z fazą III i 2 pacjentów w skali Marsha z fazą II (pacjenci z Celiakią). Krew była pobrana z palca i użyta bezpośrednio.

Rezultaty przedstawia poniższa tabela:

Pacjenci z chorobą Celiakia			
<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)/ELISA zgodność = 93.15%</b>			
		<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)</b>	
		Pozytywny (110)	Negatywny (14)
<b>ELISA</b>	Pozytywny (114)	108	6
	Negatywny (10)	2*	8
Pacjenci kontrolni (n = 26)			
<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)/ELISA Zgodność = 80%</b>			
		<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)</b>	
		Pozytywny (2)	Negatywny (24)
<b>ELISA</b>	Pozytywny (5)	1	4
	Negatywny (21)	1	20

\*IgA deficit

Efektywność różnych metod CD jest przedstawiona w poniższej tabeli.

	<b>Czułość</b>	<b>Swoistość</b>	<b>Efektywność</b>
<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)</b>	89%	92.5%	89.3%
<b>IgA-tTG (EIA)</b>	91.9%	80%	90%

**Ocena 2:** Następnie przeprowadzono badania wśród dzieci między 5 a 9 rokiem życia, które z różnych powodów udały się do pediatry, i u których nie było wiadomo o obecności CD. Pod kierownictwem Dr Carmen Ribes Koninckx przeprowadzono badania wraz z 34 pediatrami z 11 różnych ośrodków z okolic Walencji. Po otrzymaniu zgody pobrano kilka kropli krwi w celu sprawdzenia obecności przeciwciał anty-tTG za pomocą testu **NADAL® Celiac Disease (tTG)**.

Gdy test był pozytywny, została pobrana krew żylna i sprawdzona za pomocą EliA-ImmunoCAP 100(Phadia).

W sumie przeprowadzono 850 badań testem **NADAL® Celiac Disease (tTG)**, z czego 7 dało wynik pozytywny.

- 4 mocno pozytywne wyniki testu z wartościami >100 U/ml w teście Phadia i ze zmianami histopatologicznymi (biopsja jelita), które wskazywały na CD.
- 3 słabo pozytywne wyniki testu wykazały wartości (Phadia) rzędu 38 U/ml i 36 U/ml, a także wynik negatywny przy badaniu krwi żyłnej. U pacjenta z wartością 38 U/ml podczas kontroli dwa miesiące później zaobserwowano wzrost tej wartości do >100 U/ml, a wynik przeprowadzonej biopsji był pozytywny. Pacjent z wcześniejszym wynikiem 36 U/ml posiada krewnego pierwszego stopnia ze stwierdzoną CD i jest pod ścisłą kontrolą lekarską.

W trakcie tych badań (n=850), z 5 potwierdzonymi przypadkami celiakii, stwierdzono, że zapadalność na tę chorobę wynosi 1/170; i może wzrosnąć do 1/141, jeżeli kolejna kontrola serologiczna u pacjenta będącego pod obserwacją (36 U/ml) okaże się pozytywna. W grupie 10.647 dzieci w tym samym wieku, które zostały poddane badaniom kontrolnym, 23 z nich wiedziało o chorobie; zakres zapadalności na CD w tym przypadku wynosił 1/463.

Na każdy przypadek CD w tym przedziale wiekowym, zostało wykrytych 2,7 utajonych/nietypowych przypadków CD. Szacując otrzymane wyniki (w próbkach: 5:850 = 1:170; w całkowitej grupie nie-CD: 10.624:170 = 62) i dodając znane przypadki CD (23) otrzymano całkowitą liczbę w danej grupie w danym okresie równą 85. To wskazuje na zapadalność CD w tym przedziale wiekowym na poziomie 1:125.

Otrzymane wyniki pokazują, że test **NADAL® Celiac Disease (tTG)** może być bardzo pomocną metodą przesiewową.

**Ocena 3:** Ewaluacja zawierała 101 próbek krwi (przebadanych **NADAL® Celiac Disease (tTG)**) i próbek surowicy (przebadanych testem Alaphdia Immunodot Gliadin-tTG Dot) pacjentów chorych na CD, krewnych pacjentów z CD oraz

pacjentów z problemami układu żołądkowo-jelitowego (biegunka, niedożywienie, ból brzucha itd.)

Wyniki są przedstawione poniżej:

		Alphadia ImmunoDot	
		Pozytywny (11)	Negatywny (90)
<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)</b>	Pozytywny (12)	11	1
	Negatywny (89)	0	89
<b>Zgodność: 99%</b>			
<b>Czułość: &gt;99%</b>			
<b>Swoistość: 98.9%</b>			

**Ocena 4:** Czułość i swoistość testu **NADAL® Celiac Disease (tTG)** została oceniona poprzez analizę 49 próbek krwi: 18 podejrzanych o chorobę CD, 31 pacjentów negatywnych (z CD i stosujących dietę bezglutynową lub z innymi schorzeniami). Badania zostały zorganizowane przez Eurospital i przeprowadzone w szpitalu referencyjnym (benchmarkowym) we Włoszech.

Wyniki są przedstawione poniżej:

		Eurospital	
		Pozytywny (18)	Negatywny (31)
<b>NADAL® Celiac Disease (tTG)</b>	Pozytywny (17)	17	0
	Negatywny (32)	1	31
<b>Czułość: 94.4%</b>			
<b>Swoistość: 100%</b>			
<b>PPV (positive predictive value): 100%</b>			
<b>NPV (negative predictive value): 96.9%</b>			

#### Precyzja

##### Dokładność Intra-Assay

Używając testów z jednej serii **NADAL® Celiac Disease (tTG)** sporządzono 10 krzywych czułości (seria rozcieńczeń kontroli pozytywnej z surowicy). Analizy były przeprowadzane przez jedną osobę tego samego dnia. Otrzymane krzywe wyników były podobne, co wskazuje na wysoką dokładność Intra-Assay testu **NADAL® Celiac Disease (tTG)**.

##### Dokładność Inter-day

Używając testów z jednej serii **NADAL® Celiac Disease (tTG)** w ciągu 10 kolejnych dni sporządzono krzywą czułości (seria rozcieńczeń kontroli pozytywnej z surowicy). Analizy były przeprowadzane zawsze przez tą samą osobę. Każdego kolejnego dnia wyniki testu były podobne, co wskazuje na

wysoką dokładność Inter-Day testu **NADAL® Celiac Disease (tTG)**.

##### Dokładność Inter-Labor

Używając testów z jednej serii **NADAL® Celiac Disease (tTG)** sporządzono 3 krzywe czułości (seria rozcieńczeń kontroli pozytywnej z surowicy). Analizy zostały przeprowadzone przez 3 asystentów technicznych tego samego dnia. Wyniki były podobne, co wskazuje na wysoką dokładność Inter-Labor testu **NADAL® Celiac Disease (tTG)**.

##### Dokładność Inter-Lot

Używając testów z trzech różnych serii **NADAL® Celiac Disease (tTG)** sporządzono krzywą czułości (seria rozcieńczeń kontroli pozytywnej z surowicy). Analizy były przeprowadzane przez jedną osobę, wyniki testów wszystkich trzech serii były podobne, co wskazuje na wysoką dokładność Inter-Lot testu **NADAL® Celiac Disease (tTG)**.

#### Hook Effekt

Jako Hook-Effekt określa się rezultat, poprzez który bardzo wysoka koncentracja analitu wykrywającego wykazuje słaby lub nawet negatywny wynik. Przetestowano wiele pozytywnych próbek (surowica i krew) nie stwierdzając słabnięcia intensywności zabarwienia linii testowej w przypadku wysokiej koncentracji przeciwciał przeciwko tTG.

#### Reakcje krzyżowe

Testem **NADAL® Celiac Disease (tTG)** przebadano reakcje krzyżowe substancji często występujących we krwi. Substancje zostały przedstawione w poniższej tabeli z początkowym stężeniem roztworu bufora. Następnie sporządzono krzywą czułości. Dodatkowo dołączono dwie negatywne kontrole surowicy.

Substancja	Początkowe stężenie	Rozpuszczalnik	Koncentracja w buforze
Aspiryna	50 mg/ml	Etanol	2,5 mg/ml
Kofeina	10 mg/ml	Woda	0,5 mg/ml
Ibuprofen	8 mg/ml	Woda	0,4 mg/ml
Etanol	500 mg/ml	Woda	50 mg/ml
Kwas foliowy	0,4 mg/ml	Woda	0,02 mg/ml
Kwas nikotynowy	20 mg/ml	Woda	1 mg/ml
Hemoglobina	15 mg/ml	Woda	0,75 mg/ml
hCG	250000 mUI/ml	Woda	500 mUI/ml
EDTA	20 mg/ml	Woda	1 mg/ml

<i>Substancja</i>	<i>Początkowe stężenie</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Koncentracja w buforze</i>
Cytrynian sodu	0,2 M	Woda	0,01M
Heparyna	500 mg/ml	Woda	50 mg/ml

**Żadna z powyższych substancji nie miała wpływu na funkcjonowanie testu NADAL® Celiac Disease (tTG).**

#### 14. Bibliografia











1. Zhang J. et al. "Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP". The Journal of Biological Chemistry (1998) 273 (4): 2288-2295.
2. Sárdy M. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy". Clinical Chemistry (1999) 45 (12): 2142-2149.
3. Sorell L. et al. "One-step immunochromatographic assay for screening of celiac disease". Lancet (2002) 359: 945-946.
4. Drago S. et al. "Recent developments in the pathogenesis, diagnosis and treatment of celiac disease". Expert Opinion in Therapy Patents (2002) 12 (1): 45-51.
5. Hansson T. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase for diagnosis and follow-up of childhood coeliac disease". Pediatric Research (2002) 51 (6): 700-705.
6. Ferre-López, S. et al. "A reliable generation of immunochromatographic sticks for both t-TG and AGA screening in Coeliac Disease". Clinical Gastroenterology and Hepatology (2004) 2 (6): 480-484.
7. Jennings J. et al. "New developments in celiac disease". Current Opinion in Gastroenterology (2003) 19 (2): 118-129.

Rev. 2, 2013-06-21 MW







Symbol	Deutsch	English	Français	Español	Italiano	Polski
	CE Konformitätszeichen	CE marking of conformity	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea	Znak zgodności CE
	Gebrauchsanweisung beachten	Consult instructions for use	Consulter la notice d'utilisation	Consúltense las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso	Przestrzegać instrukcji obsługi
	In-vitro-Diagnostika	In-vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro	Dispositivo medico- diagnostico in vitro	Tylko do diagnostyki in vitro
	Temperaturbegrenzung	Temperature limitation	Limites de température	Limitación de temperatura	Limiti di temperatura	Temperatura przechowywania
	Chargenbezeichnung	Batch code	Code du lot	Código de lote	Codice lotto	Numer serii
	Nicht zur Wiederverwendung	Do not reuse	Ne pas réutiliser	No reutilizar	Non riutilizzare	Tylko do jednorazowego użytku
	Verwendbar bis	Use by	Utiliser jusqu'au	Fecha de caducidad	Utilizzare entro	Data ważności
	Bestellnummer	Catalogue Number	Référence du catalogue	Número de catálogo	Riferimento di Catalogo	Numer katalogowy
	Hersteller	Manufacturer	Fabricant	Fabricante	Fabbricante	Producent
	Ausreichend für <n> Ansätze	Sufficient for <n> tests	Suffisant pour pour "n" tests	Válido para para <n> ensayos	Sufficiente per "n" saggi	Wystarczający na <n> Powtórzeń

## 15. Our Teams

### Germany:

#### Regensburg

Tel.: .....+49 941 290 10-40  
Fax: .....+49 941 290 10-50

#### Moers

Tel.: .....+49 2841 99820-0  
Fax: .....+49 2841 99820-1

#### Austria:

Tel.: .....+49 941 290 10-29  
Free Tel.: .....0800 291 565  
Fax: .....+49 290 10-50  
Free Fax: .....0800 298 197

#### UK & Ireland:

Tel.: .....+49 941 290 10-18  
Free Tel.-UK: .....0808 234 1237  
Free Tel.-IRE: .....1800 555 080  
Fax: .....+49 290 10-50

#### France:

France Tel.: .....0800 915 240  
France Fax: .....0800 909 493

#### Switzerland

Swiss Tel.: .....0800 564 720  
Swiss Fax: .....0800 837 476

#### Belgium

Belgium Tel.: .....0800 718 82  
Belgium Fax: .....0800 747 07

#### Luxembourg

Lux. Tel.: .....800 211 16  
Lux. Fax: .....800 261 79

### Spain:

Tel.: .....+49 941 290 10-759  
Free Tel.: .....800 938 315  
Fax: .....+49 941 290 10-50  
Free Fax: .....900 984 992

### Italy:

Tel.: .....+49 941 290 10-34  
Fax: .....+49 941 290 10-50

### Poland:

Tel.: .....+49 941 290 10-44  
Free Tel.: .....00 800 491 15 95  
Fax: .....+49 941 290 10-50  
Free Fax: .....00 800 491 15 94

### Netherlands:

Tel.: .....+31 30 75 600  
Free Tel.: .....0800 0222 890  
Fax: .....+31 70 30 30 775  
Free Fax: .....0800 024 9519

### Denmark:

Tel.: .....+31 703075 603  
Free Tel.: .....+45 80 88 87 53  
Fax: .....+31 703030 775

### Laboratory Diagnostics Team:

Tel.: .....+49 941 290 10-40  
Fax: .....+49 941 290 10-50



nal von minden GmbH  
Carl-Zeiss-Strasse 12  
47445 Moers  
Germany  
www.nal-vonminden.com  
info@nal-vonminden.com  
Fon: +49 2841 99820-0  
Fax: +49 2841 99820-1