

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	9
11. ЛИТЕРАТУРА	9

CONTENT

1. INTENDED USE	10
2. SUMMARY AND EXPLANATION	10
3. PRINCIPLE OF THE TEST	11
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	11
5. KIT COMPONENTS	12
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	13
7. TEST PROCEDURE	13
8. QUALITY CONTROL	15
9. CALCULATION OF RESULTS	15
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	16
12. LITERATURE	16

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Федеральной службы по надзору
в сфере здравоохранения и социального развития

Р.У. Хабриев

01 декабря 2006 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА G К ГЛИАДИНУ В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «антиГЛИАДИН IgG-ИФА»

Рекомендована Научно-экспертным Советом по медицинским изделиям.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «антиГЛИАДИН IgG-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации антител класса G к глиадину в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Целиакия или глютен-чувствительная энтеропатия – хроническое заболевание, при котором нарушается кишечное всасывание в результате поражения слизистой тонкого кишечника. Точная этиология целиакии неизвестна, но установлено, что глиадин – спирторастворимая фракция глютена злаков – при данном заболевании является токсическим веществом. У подавляющего большинства нелеченых больных целиакией выявляются высокие концентрации антител к глиадину (АГА) в сыворотке крови, слюне и кишечном соке. После исключения глютена из рациона уровень этих антител постепенно нормализуется. Для окончательного подтверждения диагноза целиакии используется биопсия слизистой в области перехода двенадцатиперстной кишки в тонкую. В этом месте характерные поражения («плоская» слизистая) выявляются и при тяжелой, и при умеренно выраженной целиакии. Определение АГА позволяет быстро и экономично определить показания для проведения кишечной биопсии. Чувствительность теста составляет около 95%, а специфичность – порядка 80% (если одновременно измеряются АГА IgA и IgG). Обычно целиакия начинается в грудном возрасте после введения прикорма, но симптомы могут спонтанно исчезнуть в детстве или в подростковом возрасте, несмотря на продолжающуюся мальабсорбцию. Однако даже такие «стертые» формы могут приводить к задержке роста, полового созревания и даже к карликовости. Тем не менее, обычно после подобной клинической ремиссии классические симптомы целиакии взрослых проявляются на третьем-шестом десятилетии жизни, но диагноз целиакии в этой группе больных часто ставится с запозданием. «Стертые» и бессимптомные формы целиакии взрослых обычно проявляются в виде необъяснимой анемии, гипоспленизма или остеопороза. Оправдано, в том числе и с экономической точки зрения, проведение скрининга на целиакию в следующих группах населения:

- дети с задержкой роста;
- необъяснимая анемия;
- необъяснимая гипокальциемия или остеомалация;
- задержка полового созревания;
- инсулин-зависимый диабет;
- наличие близких родственников, больных целиакией;

- аутоиммунный тиреоидит;
- системные заболевания соединительной ткани;
- селективный дефицит IgA.

Определение АГА IgA более специфично в диагностике целиакии, чем определение АГА IgG; однако параллельное определение обоих изотипов предпочтительно из-за известной ассоциации целиакии с селективным дефицитом IgA. Если IgA дефицит исключен, серийное определение АГА IgG является методом выбора для слежения за соблюдением и эффективностью безглюиновой (безглютеновой) диеты у больных с доказанной целиакией. АГА IgA нормализуются в течение 2-6 месяцев после начала диетотерапии, в то время как IgG антитела сохраняются повышенными более 1 года. Возвращение глюида в пищевой рацион также вызывает более резкий рост уровня АГА IgA, чем АГА IgG.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение антител класса G к глюиду основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизован антиген – глюидин. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации специфических антител класса G к глюиду. Концентрацию антител класса G к глюиду в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания антител класса G к глюиду в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Использование высокоочищенного препарата глюидина для сенсibilизации лунок планшета обеспечивает высокую специфичность анализа.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания антител класса G к глюиду в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «антиГЛИАДИН IgG-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации антител класса G к глюиду в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей антител класса G к глюиду, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 25–200 Ед/мл и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации антител класса G к глюиду предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 50 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором «антиГЛИАДИН IgG-ИФА» концентрация антител класса G к глюиду в сыворотке (плазме) крови не превышает 5 Ед/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	R180Z	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C180Z	Калибровочные пробы на основе фосфатного буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества антител класса G к глиадину – 0; 25; 50; 100; 200 Ед/мл, готовы к использованию (по 1.1 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q180Z	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием антител класса G к глиадину, готова к использованию (1.1 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4	T180Z	Конъюгат, готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5	S011Z3	ИФА-Буфер, готов к использованию (50 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
6	R055Z	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	S008Z	Концентрат отмывочного раствора, 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	R050Z	Стоп-реагент, готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9	N003	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10	K180I	Инструкция по применению Набора реагентов «антиГЛИАДИН IgG-ИФА»	1	шт.	-
11	K180Q	Паспорт контроля качества Набора реагентов «антиГЛИАДИН IgG-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «антиГЛИАДИН IgG-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для наклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации антител класса G к глиадину в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Разбавьте образцы сыворотки (плазмы) крови в 101 раз, используя ИФА-Буфер (S011Z3). Пример: 5 мкл образца + 500 мкл ИФА-Буфера. Не разбавляйте калибровочные пробы и контрольную сыворотку.
3	Если предполагаемая концентрация антител класса G к глиадину в исследуемом образце превышает 200 Ед/мл, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер (S011Z3). Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 100 мкл разбавленных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +18...+25 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного нососа) или декантированием и отмойте лунки 3 раза . При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остаток жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +18...+25 °С.
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз .
10	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25°С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Продолжение таблицы на стр. 8

12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реактанта. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
13	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) - концентрация антиген класса G к глиадину в калибровочных пробах (Ед/мл), ось ординат (y) - оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
14	Определите по калибровочному графику содержание антиген класса G к глиадину в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п. 3), умножьте полученный результат на фактор разведения.

Таблица М

Вид материала	Сбор, хранение и обработка материала	Пример разведения	Образец в лунку, мкл	Фактор пересчета
Сыворотка (плазма) крови	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных, хилезных и гемолитических образцов может привести к искажению результатов.	5 мкл образца + 500 мкл ИФА-Буфера	100	1

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций антител класса G к глиадину в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (5 Ед/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (200 Ед/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация антител класса G к глиадину ниже 5 Ед/мл или выше 200 Ед/мл.

Чрезвычайно высокая частота повышенных уровней IgA (около 80% случаев) и/или IgG (около 70% случаев) антител к глиадину наблюдается при всех формах интерстициальных заболеваний легких (идиопатический фиброзирующий альвеолит, фиброзирующие стадии саркоидоза). Этот феномен не связан с сопутствующими заболеваниями ЖКТ или активностью патологического процесса в легких и не реагирует на безглютеновую диету. Его клиническая роль пока не ясна.

Исследуемая группа	Единицы, Ед/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
до 1 года*	-	30
1–6 лет	-	40
6–12 лет	-	35
>12 лет	-	25

11. ЛИТЕРАТУРА

- Chartrand LJ, Seidman EG. Celiac disease is a lifelong disorder. Clin.Invest.Med., Vol. 19, 357-361, 1996
- Cornell HJ. Coeliac disease: A review of the causative agents and their possible mechanisms of action. Amino Acids, Vol. 10, 1-19, 1996
- Cronin CC, Feighery A, Ferriss JB, Liddy C, Shanahan F, Feighery C. High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. Am.J Gastroenterol., Vol. 92, 210-2212, 1997
- Jokinen J, Peters U, Maki M, Miettinen A, Collin P. Celiac sprue in patients with chronic oral ucosal symptoms. J Clin.Gastroenterol, Vol. 26, 23-26, 1998
- Taminiau JA. Celiac disease. Curr.Opin.Pediatr., Vol. 8, 483-486, 1996
- Williams CN. Celiac disease: past, present and future. Can.J Gastroenterol., Vol. 11, 647-649, 1997

По вопросам, касающимся качества Набора «антиГЛИАДИН IgG-ИФ», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105043, Москва, а/я 58, тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru

интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,

к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF IgG ANTIBODIES TO GLIADIN IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of IgG antibodies to gliadin in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of IgG antibodies to gliadin in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Celiac disease (CD) or gluten-sensitive enteropathy is a chronic disease characterized by impaired intestinal absorption due to mucosal lesions. The exact etiology of CD is unknown but it is clearly shown that gliadin – the alcohol soluble fraction of wheat gluten – is the toxic agent. High concentrations of anti-gliadin antibodies (AGA) found in blood, saliva and intestinal secretions are characteristic for untreated celiac patients. These antibodies gradually disappear after gluten exclusion from the patient's diet. AGA testing is a simple and inexpensive method to efficiently select candidates for mucosal biopsy of the duodenal-jejunal junction, the latter method being essential for the confirmation of the diagnosis of CD. Early detection of AGA in high risk populations would contribute to prevent the insidious consequences of chronic malabsorption. Individuals at risk include short-stature children, unexplained anemia, unexplained hypocalcemia or osteomalacia, delayed puberty, insulin-dependent diabetes mellitus, autoimmune thyroiditis and selective IgA deficiency.

It is well established that IgA-AGA are more specific than IgG-AGA. Nevertheless, combined IgG/IgA screening might be more effective since there is an unexplained but clear association between CD and selective IgA deficiency. In treated celiac patients without this deficiency IgA-AGA is the test of choice for monitoring diet compliance. Serum IgA-AGA level responds very quickly to the admission of gluten-free diet (levels drop below the cut-off level within two to six months) while IgG-AGA may take more than one year to become negative; breaking the diet causes more prompt elevation of IgA-AGA compared to IgG-AGA. Herpetiform dermatitis is a disease entity strongly associated to gluten-sensitive enteropathy, and AGA serology is not capable to distinguish between these two diseases.

Separately, there are well reported clinical conditions showing positive IgG-AGA and, rarely, IgA-AGA nonrelated to histologically proven CD, eg all kind of malabsorption syndromes, including Crohn's disease, ulcerative colitis, galactosidase deficiency, post-infection malabsorption etc. The patients with rheumatoid arthritis, Sjogren syndrome, systemic sclerosis and other connective tissue diseases show abnormally high prevalence of moderately elevated gliadin IgA and IgG. These findings may be considered as non-relevant to GI pathology; however, gliadin free diet may be implemented for their

treatment.

According to data obtained by XEMA, first degree relatives of CD children patients (especially their parents) show very frequent positivity for both IgG-AGA and IgA-AGA while displaying virtually no symptoms of gastrointestinal diseases, herpetic dermatitis, or other diseases supposed to cause this positivity.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by the antigen. Antibodies from the specimen bind coated antigen on the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies directed towards species specific Ig, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5. KIT COMPONENTS **5.1. Contents of the Kit**

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1 SORB MTP	Gliadin IgG EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2 CAL 1 – 5	Calibrator set, 1.1 ml each. The set contains 5 calibrators: 0; 25; 50; 100; 200 U/ml	5	pcs	red (C1 – colourless)	2 months
3 CONTROL	Control serum (1.1 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4 CONJ HRP	Conjugate, 11 ml	1	pcs	red	until exp.date
5 DIL SPE	EIA buffer, 50 ml	1	pcs	blue	until exp.date
6 SUBS TMB	Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
7 BUF WASH 21X	Washing solution concentrate 21X, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp.date Diluted washing solution – 1 month at +2...+8 °C or 5 days at RT
8 STOP	Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
9 N003	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
10 K180I	Instruction Gliadin IgG EIA	1	pcs		N/A
11 K180Q	QC data sheet Gliadin IgG EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0.

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells **TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED)** to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1.** Reagent Preparation

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1-5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Dilute all samples using buffer DIL SPE (EIA buffer) 101 fold. (5 µl of sample + 500 µl of diluent) . Do not dilute control sample and calibrators.
3	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using DIL SPE (EIA buffer). Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
4	Pipet 100 µl of calibrators CAL 1-5, control sample CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 30 minutes at +18...+25 °C.
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times
7	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape.
8	Incubate 30 minutes at +18...+25 °C.
9	Wash the strips 5 times.
10	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
11	Incubate 10-20 minutes at +18...+25 °C
12	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
13	Measure OD (optical density) at 450 nm.
14	Set photometer blank on first calibrator
15	Apply point-by-point method for data reduction.

7.5. Sample processing

Material type	Notes on material collection, storage and handling	Sample dilution example	Sample into the well, µl	Calculation factor
blood serum or plasma	Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided and should be treated by centrifugation before testing.	5 µl of sample + 500 µl of diluent	100	1

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

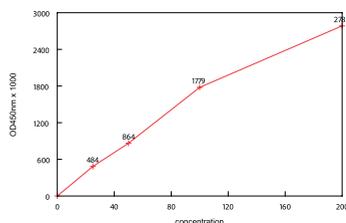
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus antibodies to gliadin concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of antibodies to gliadin in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 U/ml	0.05
CAL 2	25 U/ml	0.53
CAL 3	50 U/ml	0.91
CAL 4	100 U/ml	1.83
CAL 5	200 U/ml	2.83



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for Gliadin IgG. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below).

Patients with all forms of interstitial lung diseases (hypersensitivity pneumonitis, idiopathic fibrosing alveolitis, fibrotic stages of sarcoidosis, etc.) show very high frequency of Gliadin IgA (ca. 80% of cases) and/or Gliadin IgG (ca. 70% of cases). This phenomenon is not related to concomitant GI pathology and to the activity of lung disease itself and is resistant to gluten-free diet. The clinical role of these findings is unclear.

Sex, age	Units, U/ml	
	Lower limit	Upper limit
< 1 year*	-	30
1-6 yrs	-	40
6-12 yrs	-	35
>12 yrs	-	25

*antibodies of maternal origin

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 5 U/ml.

11.2. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different antibodies to gliadin concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.3. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known antibodies to gliadin concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

12. LITERATURE

1. Chartrand LJ, Seidman EG. Celiac disease is a lifelong disorder. Clin.Invest.Med., Vol. 19, 357-361, 1996
2. Cornell HJ. Coeliac disease: A review of the causative agents and their possible mechanisms of action. Amino Acids, Vol. 10, 1-19, 1996
3. Cronin CC, Feighery A, Ferriss JB, Liddy C, Shanahan F, Feighery C. High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. Am. J Gastroenterol., Vol. 92, 210-2212, 1997
4. Jokinen J, Peters U, Maki M, Miettinen A, Collin P. Celiac sprue in patients with chronic oral ucosal symptoms. J Clin.Gastroenterol, Vol. 26, 23-26, 1998
5. Taminiu JA. Celiac disease. Curr.Opin.Pediatr., Vol. 8, 483-486, 1996
6. Williams CN. Celiac disease: past, present and future. Can.J Gastroenterol., Vol. 11, 647-649, 1997