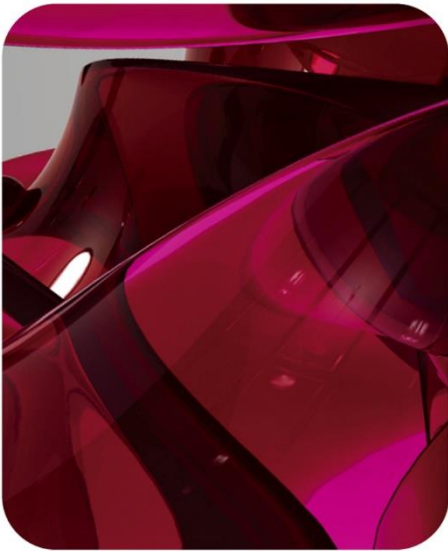




**AESKU.DIAGNOSTICS**  
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



**AESKUBLOTS<sup>®</sup>**  
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

# INSTRUCTION MANUAL

**AESKUBLOTS<sup>®</sup> Gluten related disorders IgA**

Ref 401005





Produkt Ref.:	401005
Produkt Name.	Gluten related disorders IgA
Versionsnummer.:	002: 2023-08-15

# Gebrauchsanweisung

## Inhaltsverzeichnis

---

1	Zweckbestimmung .....	1
2	Klinische Anwendung und Testprinzip.....	1
3	KIT Bestandteile .....	5
4	Lagerung und Haltbarkeit.....	5
5	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	6
6	Probenentnahme, Vorbereitung und Lagerung .....	7
7	Testdurchführung.....	7
8	Qualitative Auswertung .....	8
9	Technische Daten .....	8
10	Leistungsdaten .....	9
11	Literatur .....	15





## 1 Zweckbestimmung

Der **AESKUBLOTS® Gluten related disorders IgA** ist ein membrangebundener Enzymimmunoassay zum quantitativen Nachweis von Antikörpern der Subklasse IgA gegen Gliadin, DGP, tTG, tTG neo-epitope, TG 3, mTG neo-epitope, mTG und PT-Gliadin in humanem Serum oder Plasma. Die Antigene sind an definierten Stellen als Linien auf einer Nitrozellulosemembran aufgebracht.

Der Test dient zur Unterstützung in der Diagnose von Gluten related disorders, zu denen beispielweise die Zöliakie oder die non-celiac-wheat sensitivity zählen. Proben von Patienten, die sich unter einer glutenfreien Diät befinden, können mit diesem Test nicht erfasst werden.

## 2 Klinische Anwendung und Testprinzip

Gluten bedingte Störungen (GRD engl. Gluten related disorders) bezeichnet durch Gluten ausgelöste systemische Störungen, darunter Zöliakie (CD), nicht-zöliakale Glutenempfindlichkeit (NCGS), Dermatitis herpetiformis (DH) und Weizenallergie.

Die Gluten bedingten Störungen lassen sich in verschiedene Gruppen klassifizieren:

- Autoimmunerkrankungen: Zöliakie (CD), Dermatitis herpetiformis (DH)
- Nicht-Autoimmun, nicht allergisch: eine Erkrankung mit unbekannter Ursache, wahrscheinlich immunmoduliert: Nicht-Zöliakie-Gluten-Sensitivität (NCGS)
- Allergisch: Lebensmittelallergie (IgE-vermittelt und nicht-IgE-vermittelt), Weizen-abhängige Belastungsanaphylaxie (WDEIA), Bäckerasthma, Kontaktdermatitis

### Zöliakie

Die Zöliakie ist eine häufig entzündliche Dünndarmerkrankung mit systemischer Manifestationsmöglichkeit, die durch den Verzehr von glutenhaltigen Nahrungsmitteln ausgelöst wird. Gluten ist ein sogenanntes Klebereiweiß, ein Proteingemisch das in verschiedenen Getreidearten (z.B. Weizen, Gerste, Roggen) vorkommt. Das für die Entstehung der Zöliakie bedeutendste Protein ist Gliadin.

Grundsätzlich sind in etwa ein 0,5 – 1,0 % der Bevölkerung von Zöliakie betroffen, Tendenz steigend und sie kann sich in jedem Alter manifestieren. So sind heutzutage Erwachsene und Kinder zu etwa gleichen Teilen betroffen. Die Betroffenen zeigen neben der typischen Entzündung der Dünndarmschleimhaut auch Symptome wie Müdigkeit, Leibschmerzen und Diarrhoe sowie Gewichtsverlust, Anämie, Fertilitätsprobleme, Minderwuchs und Osteoporose in Folge einer Nährstoff-Malabsorption.

Die betroffenen Patienten weisen HLA-DQ2 oder –DQ8 als genetische Prädisposition auf. Ein weiterer Auslöser ist das durch die Nahrung aufgenommene Gliadin, welches im Darm nur teilweise verdaut wird. Bei Zöliakie-Betroffenen können die übrig gebliebenen Gliadin-Peptide das Dünndarmepithel passieren und in das darunterliegende Bindegewebe gelangen. Hier erfolgt eine Deamidierung sowie Transamidierung (Komplexbildung) der Proteinefragmente durch die Gewebstransglutaminase. Bei der Deamidierung wird die Aminosäure Glutamin in Glutaminsäure umgewandelt. Bei gegebener genetischer Veranlagung werden diese modifizierten Peptide durch Antigen-präsentierende Zellen verstärkt dem Immunsystem dargeboten. Als Folge daraus werden Antikörper sowohl gegen spezifische, deamidierte Gliadinepitope und infolge des sogenannten Epitop Spreading auch gegen das körpereigene Enzym tTG produziert. Dies wiederum führt zur Entzündung und Schädigung der Dünndarmschleimhaut, welche auch histologisch anhand einer atrophnen Zottenstruktur und hyperplastischen Darmkrypten erkannt werden kann. Die Dünndarmbiopsie gilt weiterhin als



Gold-Standard. Die Zöliakie kann entsprechend der Schwere der intestinalen Histopathologie in 3 Typen eingeteilt werden:

Marsh-Typ I: Vermehrung intraepithelialer Lymphozyten (IEL) bei normaler Schleimhautarchitektur

Marsh-Typ II: zusätzliche Kryptenhyperplasie bei noch normalen Zotten

Marsh-Typ III: IEL-Vermehrung, Kryptenhyperplasie, Degeneration von Epithelzellen und Zottenverplumpung

Wird eine Zöliakie bei Betroffenen diagnostiziert, so zeigen die Betroffenen unter einer lebenslang glutenfreien Diät Besserung der Symptome. Innerhalb von 3 – 12 Monaten normalisiert sich die Zöliakie-Serologie (Antikörper sind nicht mehr nachweisbar) und auch die intestinale Entzündung geht zurück, wenn auch langsam.

### **Dermatitis herpetiformis**

Die Dermatitis herpetiformis ist eine Manifestation der Zöliakie an der Haut. Betroffene zeigen im akuten Stadium immer einen sehr starken und quälenden Juckreiz. Die ersten Hauterscheinungen sind kleine, selten größere rötliche Pappeln, die sich in Bläschen umwandeln.

Die Diagnose erfolgt mittels immunfluoreszenzoptischem Nachweis von granulären IgA-Ablagerungen in unbefallener Haut. Weiterhin sollte auch hier eine Dünndarmbiopsie durchgeführt werden, da Patienten trotz geringer Symptome die gleichen Veränderungen der Dünndarmschleimhaut zeigen, wie Zöliakie-Betroffene. Bei dieser speziellen Form der Zöliakie werden unter anderem Autoantikörper gegen die körpereigene epidermale Gewebstransglutaminase gebildet (TG3), diese Autoantikörper haben sich hier als serologischer Marker etabliert.

### **Nicht-Zöliakie-Gluten-Sensitivität (NCGS)**

Eine allgemeingültige Definition der NCGS existiert bisher nicht. Als charakteristisch für die NCGS gelten unspezifische gastrointestinale, aber auch extraintestinale Symptome, die in Zusammenhang mit der Aufnahme glutenhaltiger Nahrung auftreten. Voraussetzung für die Diagnose NCGS ist eine erhebliche Besserung der Beschwerden unter einer glutenfreien Ernährung einerseits sowie ein eindeutiger Ausschluss einer Zöliakie.

Die Pathophysiologie ist bisher nicht hinreichend geklärt, Untersuchungen legen aber nahe, dass nicht nur Gluten, sondern vielmehr die vor allem in modernen Weizensorten hochkonzentrierter Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATI) eine Schlüsselrolle in der Pathogenese spielen könnten.

Das klinische Erscheinungsbild der NCGS ist von unspezifischen gastrointestinalen Symptomen geprägt und ähnelt damit nicht nur der Zöliakie, sondern auch vor allem dem Reizdarmsyndrom. Folgende Symptome können beobachtet werden: abdominale Schmerzen, Diarrhoe, Völlegefühl, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Muskelbeschwerden oder chronische Müdigkeit.

Ergibt die Anamnese einen zeitlichen Zusammenhang zwischen Glutenaufnahme und Beschwerden, sind im ersten Schritt einer Diagnosestellung andere glutenassoziierte Erkrankungen, wie die Zöliakie und Weizenallergie auszuschließen. Sind weder eine Zöliakie noch eine Weizenallergie für die Beschwerden verantwortlich zu machen, kann im weiteren Verlauf eine Eliminationsdiät für Gluten oder Weizenprodukte durchgeführt werden. Sind die Beschwerden danach eindeutig und anhaltend rückläufig, deutet dies das Vorliegen einer NCGS an.



### Antikörper gegen:

- **Gliadin:** Antikörper gegen Gliadin sind bei Personen ohne Zöliakie mit oralen Ulzerationen signifikant erhöht. Anti-Gliadin-Antikörper finden sich häufig bei CD, in geringem Maße subklinisch bei CD, aber auch bei einer Untergruppe von Personen, die nicht an der Krankheit leiden.
- **DGP:** (deamidierte Gliadin-spezifische Peptide) Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass gegen Gliadin gerichtete Antikörper von Zöliakie-Patienten eine sehr begrenzte Anzahl von spezifischen Epitopen auf dem Gliadin-Molekül binden. Zudem wird durch die selektive Deamidierung von Gliadin durch die Gewebstransglutaminase die Bindung der anti-Gliadin Antikörper verstärkt. Daher weisen Testsysteme, die deamidierte und definierte Peptide verwenden, eine höhere diagnostische Genauigkeit im Vergleich zu bisherigen anti-Gliadin-Tests auf.
- **tTG:** Die tTG ermöglicht eine einfachere und zuverlässigere Diagnostik der Zöliakie. tTG ist ein Enzym das unter anderem bei der Zellschädigung freigesetzt wird und an der Gewebereparatur beteiligt ist. Anti-tTG Antikörper zeigen eine höhere Sensitivität und Spezifität für Zöliakie als anti-Gliadin Antikörper und korrelieren stark mit der Aktivität der Krankheit.
- **tTG neo-epitope:** durch die Quervernetzung von tTG (Transamidierung) mit Gliadin-spezifischen Peptiden wird die Bildung von Neo-Epitopen mit tTG induziert. Da diese Neo-epitope den physiologischen Epitopen strukturell ähnlicher sind als bisher verwendete Antigene, kann das Antigen tTG neo-epitop eine signifikante Steigerung der Sensitivität und Spezifität des Testes erzielen. Studien haben ebenfalls gezeigt, dass sich tTG neo-epitop als Marker für eine Dermatitis herpetiformis verwenden lässt.
- **TG3:** Die Transglutaminase 3 oder auch epidermale Transglutaminase, wird in der Epidermis exprimiert. Mutationen im TGM3-Gen führen unter anderem zum Syndrom der unkämmbaren Haare oder Dermatitis herpetiformis Duhring. Bei letzterem Syndrom handelt es sich um eine Hauterkrankung aus der Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen. Neben den auffälligen juckenden Bläschen und Knoten ist Zöliakie eines der Ursachen dieser Krankheit. Für die Diagnostik der DH wurde gezeigt, dass die TGM3 ein hoch empfindlicherer Marker ist und die Diagnostik der Dermatitis herpetiformis weiter verbessern kann.
- **mTG neo-epitope:** die mikrobielle Transglutaminase (mTG) wird in der Lebensmittelindustrie als häufiger Zusatzstoff verwendet. Die mTG ist genauso wie die tTG in der Lage mit Gliadin spezifischen Peptiden eine Quervernetzung einzugehen und ist somit in der Lage sogenannte mTG Neo-epitope zu bilden. Anti-mTG neo-epitop Antikörper können auch in Zöliakie-Patienten beobachtet werden und korrelieren mit dem Marsh-Index. Weiterhin können mTG neo-epitope in weiteren Gluten assoziierten Erkrankungen gefunden werden, wie der NCGS.
- **mTG:** die mikrobielle Transglutaminase (mTG) wird in der Lebensmittelindustrie als häufiger Zusatzstoff verwendet. Sie ist Hauptverursacher der Bildung der sogenannten mTG Neo-epitope, die im Verdacht stehen ein zusätzlicher Auslöser der Zöliakie zu sein. Jedoch sind Antikörper gegen das Enzym selbst sehr selten.
- **PT-Gliadin:** Hierbei handelt es sich um ein Gliadin welches mit Pepsin und Trypsin verdaut wurde. Bereits 1959 zeigte Frazer et al, dass die orale Zufuhr von PT-Gliadin für Zöliakie-Patienten schädlich ist. Die Vermutung ist, dass ein natürlich vorkommendes Gemisch aus Gliadin-Peptiden die Sensitivität und Spezifität der im Test detektierten anti-Gliadin Antikörper deutlich erhöht. Dies konnte allerdings noch nicht belegt werden.
- **IgA-total:** Zur Erkennung einer IgA-Defizienz. >2% der Zöliakie-Patienten weisen einen IgA-Mangel auf und erhalten somit negatives IgA-Autoantikörpertest Resultat (Signalintensität von Gesamt-IgA < 18 U/ml bei AESKUBLOT® GRD). Der IgA-Test wird quantitativ oder niedriger als der Cut-Off-Kalibrator bewertet wenn der Test



qualitativ ausgewertet wird, auch wenn die Krankheit aktiv ist. Bei erwiesenem IgA-Mangel empfiehlt sich die zusätzliche Untersuchung auf GRD relevante IgG-Antikörper.

### Mögliche Interpretationsergebnisse total IgA (Quantitative Auswertung)

Ergebnis	sIgA Konzentration arbiträre Einheiten, U/ml
Negativ	<12,00
Grenzwertig	12,00 – 17,99
Schwach positiv	18,00 – 29,99
Positiv	30,00 – 199,99
Hoch positiv	≥ 200,00

### Testprinzip

Die Antigene sind als Linien auf die Nitrozellulosemembran-Streifen aufgebracht. Die Membran ist blockiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Membran-Streifen mit den spezifischen Antigenen werden in den Inkubationswannen mit 1:101 verdünnten Serum-/Plasmaproben inkubiert. Hierbei binden spezifische Antikörper aus dem Patientenserum/-plasma, wenn vorhanden, an das Antigen auf der Membran. Ungebundene Serum-/Plasmakomponenten werden im folgenden Waschschrift gewaschen. Anschließend werden Antikörper gegen humane Immunglobuline, die mit Meerrettich-Peroxidase markiert sind (Konjugat), zugegeben. Während einer Inkubation binden diese an den zuvor gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex, nicht gebundene Immunglobuline werden im folgenden Waschschrift entfernt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgt mit einer enzymatischen Farbreaktion, bei der das farblose Substrat präzipitiert (blau). Die Reaktion wird mit destilliertem Wasser abgestoppt.



### 3 KIT Bestandteile

<b>Vor Gebrauch rekonstituieren</b>				
Kitbestandteil	Menge	Farbe des Verschlusses	Farbe der Lösung	Beschreibung / Inhalt
Blockier-Reagenz	2 x für je 10 ml Konzentrat	weiß	N/A	Magermilchpulver zum Ansatz von 2x 10 ml Probenpuffer
Waschpuffer 20x	1 x 50 ml	weiß	farblos	20-fach konzentriert für 1 L Tris-Puffer, pH 6,9 ± 0,2
<b>Gebrauchsfertig</b>				
Kitbestandteil	Menge	Farbe des Verschluss	Farbe der Lösung	Beschreibung / Inhalt
Konjugat IgA	1 x 15 ml	rot	farblos	Anti-human Immunglobulin A (IgA) markiert mit Meerrettichperoxidase
Substrat	1 x 15 ml	schwarz	farblos	Stabilisiertes TMB/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Teststreifen	24 Streifen	Farbkodierung blau/gelb	N/A	Aufgebrachte Antigene siehe Zweckbestimmung.
Pinzette	Je 1 Stück	N/A	N/A	N/A
Inkubationswanne	3 Stück	N/A	N/A	N/A
Etiketten für Probenpuffer	2 Stück	N/A	N/A	N/A
<b>Erforderliche Materialien, nicht im Kit enthalten:</b>				
HELIA® der Firma Aesku.Diagnostics Messzylinder 1000 ml, Pipette oder Messzylinder für 10 ml Volumen, Mikropipetten (10, 1000 µl), absorbierendes Papier oder Filterpapier. Unsere Tests wurden für die Verwendung mit gereinigtem Wasser (purified water) nach der Definition der U.S. Pharmakopöe (USP 26 - NF 21) und der Europäischen Pharmakopöe entwickelt (Eur. Ph. 4te Ed.).				

### 4 Lagerung und Haltbarkeit

Die Lagerung der Kitreagenzien und der Membranstreifen soll bei 2-8°C/35.6-46.4°F in den Originalflaschen erfolgen. Es kann von einer open vial Stabilität von sechs Wochen ausgegangen werden, **sofern die geöffneten und angesetzten Kit-Komponenten nach Testlauf wie gefordert bei 2-8°C/35.6-46.4°F gelagert werden. Die Haltbarkeit des Blockier-Reagenzes liegt nach Ansatz bei 3 Wochen, sofern dieses wie gefordert bei 2-8°C/35.6-46.4°F gelagert wird.** Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Kitbestandteile, bei denen das Verfallsdatum überschritten ist, dürfen nicht mehr verwendet werden! Eine starke Lichteinwirkung auf die TMB-Substratlösung ist zu vermeiden.





## 5 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

### 5.1 Gesundheitsrisiko

Dieses Produkt darf ausschließlich zur IN VITRO DIAGNOSTIK verwendet werden. Die Anwendung muss durch Personal erfolgen, das speziell in der Verwendung von in vitro Diagnostika unterrichtet und ausgebildet wurde.

Alle Bestandteile des Kits sind gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 [CLP] eingestuft. Weitere Informationen zu Inhaltsstoffen finden Sie im Material- und Sicherheitsdokument (MSDS).

Stoffe, die in der sogenannten „Candidate List of Substances of Very High Concern (SVHC) for Authorisation“ der Europäischen Chemikalienagentur (ECHA) aufgeführt sind, sind keine vorgesehenen Bestandteile dieses Produkts. Es ist daher nicht zu erwarten, dass diese Stoffe in Mengen  $\geq 0,1$  % im Produkt enthalten sind.

Bewahren Sie die Reagenzien an einem sicheren Ort außerhalb der Reichweite von Kindern auf.

Insbesondere enthält das Gemisch keine als PBT oder vPvB einzustufenden Stoffe in Konzentrationen  $\geq 0,1$  %.

Patientenseren sind als potentiell infektiös einzustufen und entsprechend der nationalen Rechtslage zu handhaben.

### 5.2 Allgemeine Hinweise

Zur Unterscheidung der erhältlichen quantitativen **AESKUBLOTS®**-Tests ist oberhalb der Bezugslinie auf den Streifen eine Farbkodierung angebracht:

Farbkodierung	AESKUBLOTS®
Blau/gelb	Gluten related disorders IgA
Blau/schwarz	Gluten related disorders IgG

Sollten Produktinformationen, einschließlich Etikettierung, inkorrekt sein, kontaktieren sie bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits.

Blockier-Reagenz, Waschpuffer und Substrat dürfen zwischen Chargen und Testpackungen ausgetauscht werden. Alle anderen Komponenten sind spezifisch und dürfen nicht ausgetauscht werden. Komponenten dürfen zwischen Autoimmun- und Borrelia Diagnostik-Tests nicht ausgetauscht werden!

Für den Umgang mit dem Konjugat dürfen keine Gefäße aus Polystyrol verwendet werden.

Alle Kit-Komponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (20-32°C/68-89,6°F) bringen und gut durchmischen. Die Testdurchführung kann derzeit ausschließlich automatisiert mit dem HELIA® der Firma Aesku.Diagnosics erfolgen.

Setzen Sie die einzelnen Kit-Komponenten niemals höheren Temperaturen als 37 °C/ 98,6°F aus.

Substratlösung vor Licht schützen.

Die Farbintensitäten der Banden müssen nicht mit den Antikörpertitern übereinstimmen, die mit Referenzmethoden bestimmt wurden.

Auch Proben offensichtlich gesunder Personen können Autoantikörper aufweisen.

Bei erhöhter Konzentration an Immunkomplexen oder anderen Immunglobulin-Aggregaten in einer Probe sind falsch positive Ergebnisse durch nicht spezifische Bindungen nicht auszuschließen.



**Eine endgültige klinische Diagnose sollte nicht alleine auf den Ergebnissen des durchgeführten Tests erfolgen, sondern vom Arzt unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde erstellt werden. Die Diagnose sollte unbedingt mit verschiedenen diagnostischen Methoden bestätigt werden.**

**Weiterhin ist zu beachten, dass unter einer glutenfreien Diät die spezifischen Antikörper für eine Zöliakie deutlich absinken, bis diese nicht mehr nachgewiesen werden können.**

## **6 Probenentnahme, Vorbereitung und Lagerung**

Die Verwendung frischer Serum-/Plasmaproben wird empfohlen. Die Blutentnahme hat nach der nationalen Rechtslage zu erfolgen. Ikterische, lipämische, hämolytische oder bakteriell kontaminierte Serum-/Plasmaproben nicht verwenden. Bei trüben Proben die Partikel niedrig abzentrifugieren (<1000 x g). Blutproben in saubere, trockene und leere Röhrchen aufnehmen.

Nach der Gewinnung sollten Serum-/Plasmaproben innerhalb von 8 h verwendet werden, bzw. verschlossen für 48 h bei 2-8°C/35.6-46.4°F aufbewahrt werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtigt, sollten die Proben bei -20°C/-4°F tiefgefroren werden. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren der Proben sollte vermieden werden (Thomas: Labor und Diagnose; CLSI Guideline GP44-A4 Vol. 30 No. 10). Keine hitzeinaktivierten (56°C/132,8°F) Serum-/Plasmaproben verwenden.

## **7 Testdurchführung**

### **7.1 Vorbereitung**

#### **Verdünnung konzentrierter Reagenzien:**

Eventuell auskristallisierte Salze des Waschpuffer-Konzentrates in Lösung bringen. Kristalle können durch leichtes Erwärmen, Raumtemperatur sollte ausreichend sein, wieder gelöst werden.

Konzentrierten Waschpuffer 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnen (z.B. 50 ml plus 950 ml).

Zur Herstellung des Probenpuffers: 10 ml Waschpuffer zu einer Flasche Blockier-Reagenz geben und gut mischen.

Teststreifen in korrekter Orientierung (Bezugslinie und Farbkodierung nach oben) mit einer Pinzette (Teststreifen nicht mit der Hand berühren) in die Inkubationswannen legen. Unbenutzte Teststreifen werden fest verschlossen in der Streifendose mit Trockenbeutel kühl gelagert (2-8°C/35.6-46.4°F).

Die Beladung des Gerätes erfolgt nach den Vorgaben des HELIA®.

#### **Wichtige Hinweise:**

Der Test kann derzeit nur voll-automatisiert mit dem HELIA® der Firma AESKU durchgeführt werden. Die entsprechende Testdurchführung erfolgt mit dem Programm: 401005 GRD IgA.

**Für jede Charge ist das chargenspezifische CoA zu verwenden.**



## 8 Quantitative Auswertung

### 8.1 Auswertung

Die Auswertung erfolgt über die im HELIA® integrierte Software. Gleichzeitig überprüft das Gerät jeden Streifen hinsichtlich der Validitätskriterien.

Normalbereich	Grenzwertig	Positive Ergebnisse
< 12 U/ml	12 – 18 U/ml	>18 U/ml

Die quantitative Auswertung erfolgt anhand einer Standardkurve, bei der die Grauwerte der Standards gegen die Konzentration in U/ml aufgetragen werden. Die Auswerteeinheit des HELIA® nutzt eine 4-Parameterlogistik-Kurvenanpassung (4PL). Anhand der Kurve wird aus dem Bar-Wert der Probe für jedes einzelne Antigen durch die Auswerteeinheit des HELIA® die Konzentration in U/ml ermittelt.

Sollten die Werte der Kontrollen nicht die Validierungskriterien erfüllen, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden. Bei grenzwertigen Ergebnissen wird ebenfalls die Wiederholung mit einer neuen Probe empfohlen.

Die folgenden möglichen Fehlerquellen sollten überprüft werden: Haltbarkeitsdaten der Reagenzien, Lagerbedingungen, Pipetten, verwendete Geräte und Inkubationsbedingungen.

Sollten die getesteten Proben ungewöhnliche Werte oder Abweichungen zeigen oder werden die Validierungskriterien aus Gründen, die nicht in der Verantwortlichkeit des Ausführenden liegen, nicht erfüllt, kontaktieren Sie bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits.

Medizinische Laboratorien sollten eigene Qualitätskontrollen mit eigenen Kontrollen und/oder Poolseren nach nationalem Reglement durchführen.

## 9 Technische Daten

Probenmaterial:	Serum
Probenvolumen:	15 µl Serum
Gesamt-Inkubationszeit:	117 Minuten bei 20-32°C/68-89.6°F
Messbereich	0-300 U/ml
LoB	Siehe Kapitel 10.1
LoD	Siehe Kapitel 10.1
Lagerung:	bei 2-8°C/35.6-46.4°F in Originalflaschen.
Zahl der Bestimmungen:	24 Tests



## 10 Leistungsdaten

### 10.1 Analytische Sensitivität

Der Limit of Blank (LoB), welcher der Erfassungsgrenze des Messsystems entspricht, wurde durch 20-fache Wiederholung des Blockier-Reagenz für jedes Antigen ermittelt. Folgender Wert wird für alle Antigene festgelegt: 0,20 U/ml.

Der Limit of Detection (LoD) entspricht der Nachweisgrenze des Messsystems. Der LoD wird für alle Antigene mit 0,58 U/ml festgelegt.

### 10.2 Normalbereich

Seren von gesunden Spendern wurden mit dem *AESKUBLOTS*<sup>®</sup> Gluten related disorders IgA untersucht und es ergab sich folgende Verteilung:

Antigen	Probenanzahl	Mittelwert [U/ml]	Median [U/ml]	niedrigste Konzentration [U/ml]	Höchste Konzentration [U/ml]
Gliadin	120	2,31	1,30	0,05	14,56
DGP	120	0,67	0,20	0,03	9,16
tTG	120	1,86	0,86	0,04	15,06
tTG neo	120	0,22	0,11	0,02	1,84
TG 3	120	1,08	0,51	0,06	12,18
mTG neo	120	0,71	0,33	0,03	6,06
mTG	120	0,38	0,14	0,03	8,59
PT-Gliadin	120	0,46	0,25	0,05	4,99
IgA-total	120	29,69	29,73	11,40	47,57

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normalwertebereich zu ermitteln.

### 10.3 Präzision

Die Präzision der mit dem *AESKUBLOTS*<sup>®</sup> Gluten related disorders IgA erhaltenen Testergebnisse wurde anhand der Bestimmung der Intra- und Inter-Assay-Präzision sowie der Chargenvarianz durch die Analyse mehrerer Proben mit verschiedenen Konzentrationen untersucht.

Es wurden die Mittelwerte für alle Proben berechnet und in U/ml angegeben. Bei Proben im positiven Bereich wird zusätzlich der VK in Prozent aufgeführt. Für Proben im negativen Bereich wird die Angabe neg. verwendet, welche die negativen Ergebnisse bestätigt. Die Angabe neg. wurde eingeführt, da bei sehr kleinen Werten (bei negativen Proben), selbst kleine Unterschiede artifiziell erhöhte, nicht aussagekräftige Abweichungen ergeben.



### Intra-Assay

		Gliadin	DGP	tTG	tTG neo	TG 3	mTG neo	mTG	PT-Gliadin	IgA-total
Probe 1	Mittelwert [U/ml]	1,24	9,96	1,05	97,77	48,21	26,36	0,10	0,49	20,81
	VK [%]	neg	neg	neg	19,40%	17,66%	19,25%	neg	neg	15,42%
Probe 2	Mittelwert [U/ml]	151,83	0,14	5,24	1,86	0,59	38,16	0,50	38,41	23,31
	VK [%]	14,66%	neg	neg	neg	neg	17,70%	neg	16,55%	19,88%
Probe 3	Mittelwert [U/ml]	4,81	56,15	292,35	300,00	0,77	176,67	0,19	6,86	23,47
	VK [%]	neg	14,22%	9,51%	0,00%	neg	12,25%	neg	neg	14,79%
Probe 4	Mittelwert [U/ml]	0,48	0,44	0,43	0,36	0,95	0,21	0,13	0,08	19,67
	VK [%]	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	11,24%
Probe 5	Mittelwert [U/ml]	0,49	0,16	0,91	0,87	1,81	1,00	182,25	0,24	39,22
	VK [%]	neg	neg	neg	neg	neg	neg	9,99%	neg	18,93%

### Inter-Assay

		Gliadin	DGP	tTG	tTG neo	TG 3	mTG neo	mTG	PT-Gliadin	IgA-total
Probe 1	Mittelwert [U/ml]	1,41	13,75	1,04	197,85	28,60	28,83	0,28	1,11	22,57
	VK [%]	neg	20,70%	neg	21,92%	24,90%	22,42%	neg	neg	21,71%
Probe 2	Mittelwert [U/ml]	145,75	0,41	5,07	3,55	0,76	36,42	0,26	36,82	20,75
	VK [%]	16,66%	neg	neg	neg	neg	19,06%	neg	20,49%	22,05%
Probe 3	Mittelwert [U/ml]	5,23	59,80	207,97	300,00	0,58	177,12	0,12	8,86	24,24
	VK [%]	neg	20,63%	15,87%	0,00%	neg	9,40%	neg	neg	21,23%
Probe 4	Mittelwert [U/ml]	1,30	1,05	1,75	4,64	2,54	0,38	0,77	1,31	29,93
	VK [%]	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	21,97%
Probe 5	Mittelwert [U/ml]	0,76	0,25	3,18	3,53	2,38	1,12	99,68	0,36	41,74
	VK [%]	neg	neg	neg	neg	neg	neg	23,12%	neg	20,21%

### Chargenvarianz

		Gliadin	DGP	tTG	tTG neo	TG 3	mTG neo	mTG	PT-Gliadin	IgA-total
Probe 1	Mittelwert [U/ml]	1,30	15,31	3,36	240,09	15,56	32,73	0,30	1,96	28,03
	VK [%]	neg	25,59%	neg	23,33%	27,05%	23,99%	neg	neg	26,21%
Probe 2	Mittelwert [U/ml]	135,10	0,55	6,96	7,74	1,86	37,35	0,90	40,90	29,04
	VK [%]	14,27%	neg	neg	neg	neg	16,77%	neg	20,60%	22,84%
Probe 3	Mittelwert [U/ml]	4,96	67,10	253,69	300,00	2,01	190,09	0,28	9,38	31,18
	VK [%]	neg	18,28%	27,23%	0,00%	neg	12,61%	neg	neg	24,95%
Probe 4	Mittelwert [U/ml]	2,86	1,65	5,17	7,91	5,15	1,09	1,85	2,06	49,66
	VK [%]	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	20,38%
Probe 5	Mittelwert [U/ml]	0,39	0,11	3,86	1,97	3,49	3,03	73,06	0,47	35,81
	VK [%]	neg	neg	neg	neg	neg	neg	14,91%	neg	17,74%

## 10.4 Wettbewerbersvergleich

Da bei den gemessenen Proben keine klinischen Daten hinsichtlich einer glutenfreien Ernährung vorhanden waren und dies ausschlaggebend für den Nachweis von spezifischen Antikörpern ist, wurden die Proben mit einem Referenztest vorcharakterisiert. Von dem Referenztest als positiv vorbewertete Proben wurden als positiv angenommen und negativ vor befundene Proben als negativ. Grenzwertige Proben wurden als negativ betrachtet. Bei dieser Betrachtungsweise wird davon ausgegangen, dass der Referenztest die Proben korrekt bestimmt, was nicht unbedingt der Fall sein muss. Weitere Studien hierzu sollen folgen.

### 10.4.1 DGP und tTG

Die Antigene DGP und tTG wurden mit einem handelsüblichen LINE-Blot (CE-notifizierter Referenztest) zur Bestimmung von Zöliakie-spezifischen Antikörpern verglichen.



Erkrankung	getestet DGP	getestet tTG
Zöliakie	11	23
Morbus Crohn	31	31
Diabetes mellitus Typ 1	23	23
U. colitis	22	22
Gastroenteritis	23	23
Laktose Intoleranz	17	17
Blutspender	60	60

DGP		Vergleichsprodukt		
		Positiv	Negativ	Total
AESKUBLOTS Gluten related disorders IgA	Positiv	7	1	8
	Negativ	7	172	179
	Total	14	173	187

DGP	[%]	95% CI
Sensitivität	50,0	26,8 - 73,20
Spezifität	99,4	96,80 - 99,97
Gesamt-Übereinstimmung	95,7	91,8 - 97,8

Im untersuchten Kollektiv, welches anhand eines Referenztests vorcharakterisiert wurde, wurde eine Sensitivität von 50,0% bei einer Spezifität von 99,4% in Bezug zum Referenzsystem ermittelt. Die ermittelten Werte beruhen auf der Annahme, dass der Referenztest alle Proben korrekt einstuft. Bei dem Antigen DGP handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um 2 verschiedene Peptid-Varianten.

tTG		Vergleichsprodukt		
		Positiv	Negativ	Total
AESKUBLOTS Gluten related disorders IgA	Positiv	23	2	25
	Negativ	1	173	174
	Total	24	175	199

tTG	[%]	95% CI
Sensitivität	95,8	79,76 - 99,79
Spezifität	98,9	95,93 - 99,80
Gesamt-Übereinstimmung	98,5	95,7 - 99,5

Im untersuchten Kollektiv, welches anhand eines Referenztests vorcharakterisiert wurde, wurde eine Sensitivität von 95,8% bei einer Spezifität von 98,9% in Bezug zum Referenzsystem ermittelt. Die ermittelten Werte beruhen auf der Annahme, dass der Referenztest alle Proben korrekt einstuft.

#### 10.4.2 Gliadin und tTG neo-epitope

Die Antigene Gliadin und tTG neo-epitope wurden mit handelsüblichen ELISA (CE-notifizierte Produkte der Aesku.Diagnostics) zur Bestimmung von Antikörpern gegen Gliadin und tTG neo-epitope verglichen.



Erkrankung	getestet Gliadin	getestet tTG neo
Zöliakie	10	40
Morbus Crohn	31	31
Diabetes mellitus Typ 1	23	23
U. colitis	24	24
Gastroenteritis	23	23
Laktose Intoleranz	17	17
Blutspender	100	100

Gliadin		Vergleichsprodukt		
		Positiv	Negativ	Total
AESKUBLOTS Gluten related disorders IgA	Positiv	11	6	17
	Negativ	3	208	211
	Total	14	214	228

Gliadin	[%]	95% CI
Sensitivität	78,6	52,4 - 92,4
Spezifität	97,2	94,0 - 98,7
Gesamt-Übereinstimmung	96,1	92,7 - 97,9

Im untersuchten Kollektiv wurde eine Sensitivität von 78,6% bei einer Spezifität von 97,2% in Bezug zum Referenzsystem ermittelt. Die ermittelten Werte beruhen auf der Annahme, dass der Referenztest alle Proben korrekt einstuft.

tTG neo-epitope		Vergleichsprodukt		
		Positiv	Negativ	Total
AESKUBLOTS Gluten related disorders IgA	Positiv	27	0	27
	Negativ	15	216	231
	Total	42	216	258

tTG neo-pitope	[%]	95% CI
Sensitivität	64,3	49,2 - 77,0
Spezifität	100,0	98,3 - 100,0
Gesamt-Übereinstimmung	94,2	90,6 - 96,4

Im untersuchten Kollektiv wurde eine Sensitivität von 64,3% bei einer Spezifität von 100,0% in Bezug zum Referenzsystem ermittelt. Schließt man bei den diskrepanten Proben das Antigen tTG in die Auswertung mit ein, so zeigt sich, dass der *AESKUBLOTS*<sup>®</sup> Gluten related disorders IgA durch den Zusatz des Antigens tTG eine Sensitivität von 90,0% erreicht bei einer Spezifität von 100,0%. Die ermittelten Werte beruhen auf der Annahme, dass der Referenztest alle Proben korrekt einstuft.



### 10.4.3 TG 3

Das Antigen TG 3 wurde mit einem handelsüblichen ELISA zur Bestimmung von IgA-Antikörpern gegen TG 3 verglichen. Dazu wurden 27 Proben von Patienten mit einer Dermatitis herpetiformis mit einem CE-notifizierten Referenztest vorcharakterisiert und mit dem Aeskublots® Gluten related disorders IgA verglichen (grenzwertige Ergebnisse wurden als negativ eingestuft).

TG 3		Vergleichsprodukt		
		Positiv	Negativ	Total
AESKUBLOTS Gluten related disorders IgA	Positiv	8	1	9
	Negativ	3	15	18
	Total	11	16	27

TG 3	[%]	95% CI
Sensitivität	72,7	0,0 to 94,87
Spezifität	93,8	97,27 to 99,74
Gesamt-Übereinstimmung	85,2	96,8 to 99,5

Im untersuchten Kollektiv wurde eine Sensitivität von 72,7% bei einer Spezifität von 93,8% in Bezug zum Referenzsystem ermittelt. Die ermittelten Werte beruhen auf der Annahme, dass der Referenztest alle Proben korrekt einstuft.

### 10.4.4 mTG neo-epitope und mTG

Für die Antigene mTG neo-epitope und mTG gibt es derzeit keine Vergleichsprodukte auf dem Markt. Dennoch war es möglich anhand von ELISA RUO-Kits (Firma AESKU.Diagnostics) zur Bestimmung von mTG neo-epitope und mTG Antikörpern einen Vergleichstest durchzuführen.

Erkrankung	getestet mTG neo	getestet mTG
Zöliakie	33	102
Morbus Crohn	31	31
Diabetes mellitus Typ 1	23	23
U. colitis	24	24
Gastroenteritis	23	23
Laktose Intoleranz	17	17
Blutspender	100	100

mTG neo-epitope		Vergleichsprodukt RUO		
		Positiv	Negativ	Total
AESKUBLOTS Gluten related disorders IgA	Positiv	41	1	42
	Negativ	9	200	209
	Total	50	201	251





mTG neo-epitope	[%]	95% CI
Sensitivität	82,0	69,2 to 90,2
Spezifität	99,5	97,2 to 99,9
Gesamt-Übereinstimmung	96,0	92,8 to 97,8

Im untersuchten Kollektiv wurde eine Sensitivität von 82,0% bei einer Spezifität von 99,5% in Bezug zum Referenzsystem ermittelt. Die ermittelten Werte beruhen auf der Annahme, dass der Referenztest alle Proben korrekt einstuft.

mTG		Vergleichsprodukt RUO		
		Positiv	Negativ	Total
AESKUBLOTS Gluten related disorders IgA	Positiv	0	3	3
	Negativ	1	316	317
	Total	1	319	320

mTG	[%]	95% CI
Sensitivität	0,0	0,0 to 94,87
Spezifität	99,1	97,27 to 99,74
Gesamt-Übereinstimmung	98,8	96,8 to 99,5

Bisherige Studien haben gezeigt, dass Antikörper gegen die mTG selbst sehr selten sind. Dies konnte für den *AESKUBLOTS*<sup>®</sup> Gluten related disorders IgA bestätigt werden. Es wurde eine Spezifität von 99,1% in Bezug zum Referenzsystem ermittelt. Die ermittelten Werte beruhen auf der Annahme, dass der Referenztest alle Proben korrekt einstuft.

## 10.5 Linearität

Für ausgewählte Seren konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Verdünnung und Antikörperkonzentration in diesem Test ermittelt werden. Alle aufgeführten Proben zeigen ein  $R^2 > 0,95$ . Aufgrund der Heterogenität humaner Antikörper ist jedoch nicht auszuschließen, dass einzelne Seren ein nicht lineares Verhalten zeigen.

Antigen	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>
Gliadin	0,965	0,953	0,959	-
DGP	0,963	0,969	0,971	0,956
tTG	0,996	0,951	0,970	-
tTG neo	0,997	0,961	0,959	-
TG 3	0,976	0,958	-	-
mTG neo	0,998	0,960	0,965	-
mTG	0,956	0,984	0,974	-
PT-Gliadin	0,995	0,960	0,955	0,952

## 10.6 Kalibration

Das quantitative Messsystem ist mangels eines internationalen Referenzstandards in vorläufigen Einheiten kalibriert. Die Ergebnisse werden in U/ml angegeben.



## 11 Literatur

---

**Elli, L., Branchi, F., Tomba, C., Villalta, D., Norsa, L., Ferretti, F., . . . Bardella, N. T. (21. Juni 2015).** Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World Journal of Gastroenterology*, S. 7110-7119.

**Lerner, A., Aminov, R., & Matthias, T. (24. 01 2017).** Transglutaminases in Dysbiosis As Potential Environmental Drivers of Autoimmunity. *frontiers in Microbiology*. 8:66, S. 1-7.

**Lerner, A., Jeremias, P., Neidhöfer, S., & Matthias, T. (2015).** Antibodies against neo-epitope tTg complexed to gliadin are different and more reliable than anti-tTg for the diagnosis of pediatric celiac disease. *Journal of Immunological Methods*, S. 1-6.

**Lytton, S.D. et al. (2013).** Neo-pitope tissue transglutaminase autoantibodies as a biomarker of the gluten sensitive skin disease – dermatitis herpetiformis. *Clinica Chimica Acta*, Volume 415, 16. January 2013, Pages 346-349

**Mahadev, S.; Green, P.H.R. (08.08.2011).** Review Celiac Disease: A challenge for all physicians. *Gastroenterology & Hepatology* (7), S. 554-556

**Matthias, T., Jeremias, P., Neidhöfer, S., & Lerner, A. (15. September 2016).** The industrial food additive, microbial transglutaminase, mimics tissue transglutaminase and is immunogenic in celiac disease patients. *Autoimmunity Reviews* (15), S. 1111-1119.

**Nejad, M. R., Karkhane, M., Marzban, A., Mojarad, E. N., & Rostami, K. (9. März 2012).** Gluten related disorders. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, S. 1-7.

**Schuppan, D., & Zimmer, K.-P. (06. 12 2013).** Diagnostik und Therapie der Zöliakie. *Deutsches Ärzteblatt*, S. 835 - 846.




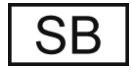
**Singh, P., Arora, A., Strand, T.A., Leffler, D.A., Catassi, C., Green, P.H., Kelly, C.P., Ahuja, V., Makharia, G.K. (2018)** Global prevalence of celiac disease: systemic review and meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2018; 16:823-836

### Allgemeine Literatur:

**Peter JB, Shoenfeld Y (1996).** Autoantibodies. Elsevier Sciences B.V., Amsterdam.

**Lothar Thomas:** Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik., 8. Auflage, TH Books

**CLSI Guideline GP44-A4:** Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests

	Diagnosi in vitro	For in vitro diagnostic use
	Pour diagnostic in vitro	Para uso diagnóstico in vitro
	In Vitro Diagnostikum	In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	Para uso Diagnóstico in vitro	
	Numero d'ordine	Catalogue number
	Référence Catalogue	Numéro de catálogo
	Bestellnummer	Αριθμός παραγγελίας
	Número de catálogo	
	Descrizione lotto	Lot
	Lot	Lote
	Chargen Bezeichnung	Χαρακτηρισμός παρτίδας
	Lote	
	Conformità europea	EC Declaration of Conformity
	Déclaration CE de Conformité	Declaración CE de Conformidad
	Europäische Konformität	Ευρωπαϊκή συμφωνία
	Déclaración CE de Conformidade	
	24 determinazioni	24 tests
	24 tests	24 pruebas
	24 Bestimmungen	24 προσδιορισμοί
	24 Testes	
	Rispettare le istruzioni per l'uso	See instructions for use
	Voir les instructions d'utilisation	Ver las instrucciones de uso
	Gebrauchsanweisung beachten	Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	Ver as instruções de uso	
	Da utilizzarsi entro	Use by
	Utilise avant le	Utilizar antes de
	Verwendbar bis	Χρήση μέχρι
	Utilizar antes de	
	Conservare a 2-8°C (35.6-46.4°F)	Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	Conservar à 2-8°C (35.6-46.4°F)	Conservar a 2-8°C (35.6-46.4°F)
	Lagerung bei 2-8°C (35.6-46.4°F)	Φυλάσσεται στους 2-8°C (35.6-46.4°F)
	Conservar entre 2-8°C (35.6-46.4°F)	
	Prodotto da	Manufactured by
	Fabriqué par	Fabricado por
	Hergestellt von	Κατασκευάζεται από
	Fabricado por	
	Strip di nitrocellulosa rivestita	Coated nitrocellulose strip
	Strip de nitrocellulose couché	Tira de nitrocelulosa recubierta
	Nitrozellulosemembran-Streifen mit aufgebracht Antigenen	Επίστρωση λωρίδα νιτροκυτταρίνης
	Tira de nitrocelulose revestido	
	Tamponi di lavaggio	Wash buffer
	Tampon de Lavage	Solución de lavado
	Waschpuffer	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	Solução de lavagem	
	Reagente bloccante	Blocking Reagent
	réactif de blocage	Reactivo bloqueante
	Blockier-Reagenz	Αντιδραστήριο αποκλεισμού
	Bloqueio de reagente	
	Tamponi campione	Sample buffer
	Tampon Echantillons	Tampón Muestras
	Probenpuffer	Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	Diluyente de amostra	
	Coniugato	Conjugate
	Conjugé	Conjugado
	Konjugat	Σύζευγμα
	Conjugado	
	Tamponi substrato	Substrate buffer
	Substrat	Tampón sustrato
	Substratpuffer	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	Substrato	