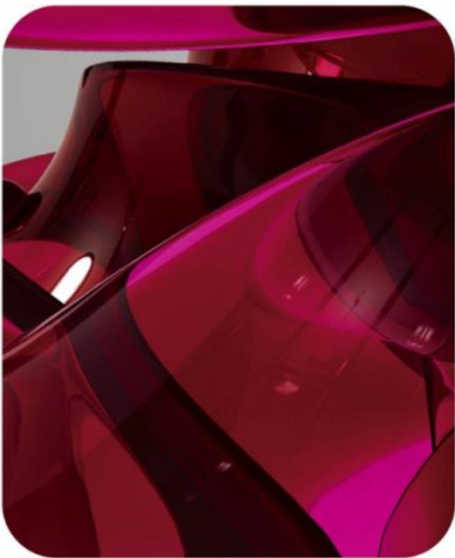




AESKU. DIAGNOSTICS
LA HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO QUE FUNCIONA



AESKUBLOTS[®]

LA HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO QUE FUNCIONA

MANUAL DE INSTRUCCIONES

AESKUBLOTS[®] Gluten related disorders IgG

Ref 401006

Manual de instrucciones

Índice

1	Usado previsto.....	1
2	Aplicaciones clínicas y principio del análisis.....	1
3	Contenido del kit	5
4	Almacenamiento y caducidad	5
5	Precauciones de uso e instrucciones generales	6
6	Obtención, manipulación y almacenamiento de las muestras	8
7	Procedimiento del ensayo.....	8
8	Evaluación cuantitativa	9
9	Datos técnicos	9
10	Datos de funcionamiento	10
11	Bibliografía.....	16



Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim, Alemania
Tel.: +49-6734-9622-0
Fax: +49-6734-9622-2222
Info@aesku.com
www.aesku.com

1 Uso previsto

AESKUBLOTS® Gluten Related Disorders IgG es un enzimoimmunoensayo de membrana para detección cuantitativa de anticuerpos de la subclase IgG frente a gliadina, DGP, tTG, neoepítomos de tTG, TG3, neoepítomos de mTG, mTG y gliadina PT en suero o plasma humano. Los antígenos se aplican en forma de líneas sobre una membrana de nitrocelulosa en las posiciones definidas.

La prueba se utiliza como referencia para el diagnóstico de trastornos relacionados con el gluten, como la enfermedad celíaca o la sensibilidad al trigo no celíaca. Esta prueba no permite la detección en muestras de pacientes que siguen una dieta sin gluten.

2 Aplicaciones clínicas y principio del análisis

Los trastornos relacionados con el gluten (TRG) son trastornos sistémicos provocados por el gluten, como la enfermedad celíaca (EC), la sensibilidad al gluten no celíaca (SGNC), la dermatitis herpetiforme (DH) y la alergia al trigo.

Dichos trastornos se pueden clasificar en varios grupos:

- Trastornos autoinmunitarios: enfermedad celíaca (EC), dermatitis herpetiforme (DH).
- No autoinmunitarios, no alérgicos: trastornos con causa desconocida, probablemente inmunomodulados: sensibilidad al gluten no celíaca (SGNC).
- Alérgicos: alergia alimentaria (mediada y no mediada por IgE), anafilaxia inducida por ejercicio dependiente del trigo (AIEDT), asma del panadero, dermatitis de contacto.

Enfermedad celíaca

La enfermedad celíaca es una enfermedad inflamatoria frecuente del intestino delgado que puede manifestarse sistémicamente y está provocada por el consumo de alimentos con gluten. El gluten es una mezcla de proteínas incluida en varios tipos de cereales (p. ej., trigo, cebada, centeno) y actúa como «adhesivo proteico». La proteína más importante para el desarrollo de la enfermedad celíaca es la gliadina.

La prevalencia de enfermedad celíaca se estima entre el 0,5 % y el 1,0 %, con una tendencia ascendente, y puede manifestarse a cualquier edad. En consecuencia, tanto adultos como niños se ven afectados en proporciones aproximadamente iguales. Además de la inflamación habitual de la mucosa del intestino delgado, las personas afectadas también presentan síntomas como cansancio, dolor abdominal y diarrea, así como pérdida de peso, anemia, problemas de fertilidad, baja estatura y osteoporosis como resultado de la absorción insuficiente de nutrientes.

Los pacientes afectados presentan los genotipos HLA-DQ2 o -DQ8 como predisposición genética. Otro factor desencadenante es la gliadina ingerida a través de los alimentos, que solo se digiere parcialmente en el intestino. En pacientes con enfermedad celíaca, los péptidos de gliadina residuales pueden pasar a través del epitelio del intestino delgado y alcanzar el tejido conectivo subyacente. En este caso, la transglutaminasa tisular provoca tanto la desamidación como la transamidación (formación de complejos) de los fragmentos de proteína. Durante la desamidación, el aminoácido glutamina se convierte en ácido glutámico. Si existe predisposición genética, estos péptidos modificados se presentan gradualmente al sistema inmunitario mediante células presentadoras de antígenos. Como consecuencia, se generan anticuerpos frente a los epítomos de gliadina desamidados específicos y, como resultado de la llamada difusión de epítomos, también frente a la propia enzima tTG del cuerpo.



Ref. del producto:	401006
Desc. del producto	IgG para trastornos relacionados con el gluten
Rev. manual n.º:	002: 2023-11-14

A su vez, esto provoca inflamación y daños en la mucosa del intestino delgado, que también se puede reconocer histológicamente por una estructura vellosa atrófica y criptas hiperplásicas intestinales.

La biopsia del intestino delgado se sigue considerando la prueba de referencia. La enfermedad celíaca se puede clasificar en 3 tipos de acuerdo con la gravedad de la histopatología intestinal:

Marsh tipo I: proliferación de linfocitos intraepiteliales (LIE) con arquitectura mucosa normal.

Marsh tipo II: hiperplasia de criptas adicional con vellosidades todavía normales.

Marsh tipo III: proliferación de LIE, hiperplasia de criptas, degeneración de las células epiteliales y densificación de las vellosidades.

Si la enfermedad celíaca se diagnostica en los pacientes afectados, aquellos que han seguido una dieta sin gluten permanentemente presentan mejoría en los síntomas. Al cabo de 3 - 12 meses, la serología celíaca se normaliza (los anticuerpos ya no se pueden detectar) y la inflamación intestinal también se reduce, aunque lentamente.

Dermatitis herpetiforme

La dermatitis herpetiforme es una manifestación de la enfermedad celíaca en la piel. Las personas afectadas siempre presentan prurito muy pronunciado e insoportable en la fase aguda. Las primeras manifestaciones en la piel son leves, con manchas rojizas de pequeño tamaño (rara vez grandes) y que en último término se convierten en vesículas.

El diagnóstico se realiza mediante detección óptica por inmunofluorescencia de los depósitos granulares de IgA en la piel no afectada. Además, en este caso también se debe realizar una pequeña biopsia intestinal, ya que los pacientes presentan los mismos cambios en la mucosa del intestino delgado que aquellos afectados por la enfermedad celíaca, a pesar de tener menos síntomas. En este tipo especial de enfermedad celíaca, se forman anticuerpos frente a la transglutaminasa (TG3) del tejido epidérmico del propio organismo, entre otros; en este caso, dichos anticuerpos se han establecido como marcadores serológicos.

Sensibilidad al gluten no celíaca (SGNC)

No existe una definición aceptada generalmente de la SGNC. Varios síntomas gastrointestinales no específicos, pero también síntomas extraintestinales que se producen en conexión con el consumo de alimentos que contienen gluten, se consideran característicos de la SGNC. Un requisito previo para el diagnóstico de la SGNC es, por una parte, una mejora significativa de los síntomas con una dieta sin gluten y, por otra, una exclusión clara de enfermedad celíaca.

La fisiopatología todavía no se ha determinado adecuadamente, pero los estudios sugieren que no solo el gluten, sino también los inhibidores de amilasa-tripsina (ATI, por sus siglas en inglés), que se dan en alta concentración especialmente en las especies de trigo modernas, pueden desempeñar un papel clave en la patogénesis.

La presentación clínica de la SGNC se caracteriza por síntomas gastrointestinales no específicos, por lo que no solo es similar a la enfermedad celíaca, sino también al síndrome del colon irritable. Se pueden observar los siguientes síntomas: dolor abdominal, diarrea, distensión abdominal, náusea, vómitos, cefalea, molestias musculares o fatiga crónica.

Si la anamnesis revela una relación temporal entre la ingestión de gluten y los síntomas, otras enfermedades asociadas al gluten, como la enfermedad celíaca y la alergia al trigo, se



Ref. del producto:	401006
Desc. del producto	IgG para trastornos relacionados con el gluten
Rev. manual n.º:	002: 2023-11-14

deberán descartar como primer paso a la hora de establecer un diagnóstico. En caso de que ni la enfermedad celíaca ni la alergia al trigo se consideren la causa de los síntomas, se puede seguir una dieta de eliminación de gluten y productos del trigo como opción de tratamiento. La remisión de forma clara y persistente de los síntomas indica la presencia de SGNC.

Los anticuerpos contra:

- Gliadina: los anticuerpos frente a la gliadina aumentan significativamente en personas sin enfermedad celíaca con ulceración oral. Los anticuerpos antigliadina se observan frecuentemente en pacientes con EC y, en menor grado, presintómicamente, aunque también en un subconjunto de individuos que no sufren la enfermedad.
- DGP (péptidos de gliadina desaminados): en estudios recientes se ha demostrado que los anticuerpos específicos antigliadina de pacientes con enfermedad celíaca se unen a un número muy limitado de epítomos específicos en la molécula de gliadina. Asimismo, la desamidación selectiva de la gliadina por la transglutaminasa del tejido mejora la unión de los anticuerpos antigliadina. Por lo tanto, los sistemas de prueba en los que se utilizan péptidos desamidados y definidos ofrecen una mayor precisión de diagnóstico que la pruebas antigliadina anteriores.
- tTG: la enzima tTG permite un diagnóstico más sencillo y más fiable de la enfermedad celíaca. Se libera cuando se produce daño celular e interviene en las reparaciones celulares. Los anticuerpos anti-tTG ofrecen mayor sensibilidad y especificidad para la detección de la enfermedad celíaca que los anticuerpos antigliadina y presentan un estrecha correlación con la actividad de la enfermedad.
- Neopítomos de la tTG: la reticulación de la tTG (transamidación) con los péptidos específicos de gliadina induce la formación de neopítomos con tTG. Puesto que estos neopítomos son más similares estructuralmente a los epítomos fisiológicos que utilizaron previamente antígenos, el neopítomo del antígeno tTG ofrece un incremento significativo en la sensibilidad y especificidad. Los estudios también han demostrado que el neopítomo de la tTG se puede emplear como marcador de la dermatitis herpetiforme.
- TG3: la transglutaminasa 3, o transglutaminasa epidérmica, se expresa en la epidermis. las mutaciones de la TG3 provocan, entre otras cosas, el síndrome del cabello impenable o dermatitis herpetiforme (o enfermedad de Duhring). Este último síndrome es una enfermedad cutánea perteneciente al grupo de la dermatosis ampollosa autoinmunitaria. Además de las vesículas y nódulos con prurito manifiesto, la enfermedad celíaca es una de las causas de este trastorno. Se ha demostrado que la TG3 es un marcador extremadamente sensible que permite un diagnóstico más preciso de dermatitis herpetiforme.
- Neopítomo de la mTG: la transglutaminasa microbiana (mTG) se utiliza frecuentemente como aditivo en la industria alimentaria. Al igual que la tTG, la mTG es capaz de reticularse con los péptidos de gliadina y formar los llamados neopítomos de la mTG. Se pueden observar anticuerpos anti-neopítomo de la mTG en pacientes con enfermedad celíaca, y su presencia está correlacionada con la escala de Marsh. Es más, se pueden encontrar neopítomos de la mTG en otras enfermedades asociadas con el gluten, como la SGNC.
- mTG: la transglutaminasa microbiana (mTG) se utiliza como aditivo frecuente en la industria alimentaria. Es la principal causa de la formación de los llamados neopítomos de la mTG, que se sospecha que pueden ser un factor desencadenante de la enfermedad celíaca. Sin embargo, los anticuerpos frente a la propia enzima son raros.
- Gliadina PT: Se trata de una gliadina digerida con pepsina y tripsina. En 1959, Frazer *et al.* demostraron que la ingesta oral de gliadina PT era dañina para los pacientes celíacos. La hipótesis es que una mezcla natural de péptidos de gliadina aumenta



Ref. del producto:	401006
Desc. del producto	IgG para trastornos relacionados con el gluten
Rev. manual n.º:	002: 2023-11-14

significativamente la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos antigliadina detectados en la prueba. Sin embargo, este supuesto todavía no se ha demostrado.

Principio de la prueba

Los antígenos se aplican en forma de líneas sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea para impedir reacciones no específicas. Las tiras de membrana con antígenos específicos en posiciones definidas exactamente se incuban en muestras de suero diluidas 1:101. Los anticuerpos del paciente, si están presentes en la muestra, se unen al antígeno. La fracción no unida es eliminada por lavado en el paso siguiente. Después se incuban inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa de rábano picante (conjugado), que reaccionan con el complejo antígeno-anticuerpo de las muestras. El conjugado no unido se elimina por lavado en el paso siguiente. Tras la adición del sustrato TMB, una reacción enzimática convierte el conjugado en un precipitado azul. La reacción se detiene mediante agua destilada.

3 Contenido del kit

PARA SER RECONSTITUIDO				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Reactivo bloqueante	2 para 10 ml de concentrado o cada uno	Blanco	N/A	Leche desnatada en polvo para preparación de 2 tampones para muestra de 10 ml
Tampón de lavado (20x)	1 x 50 ml	Blanco	incolore	Concentrado 20 veces para preparación de 1 l tampón Tris, pH 6,9 ± 0,2
LISTO PARA EL USO				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Conjugado IgG	1 x 15 ml	Rojo	incolore	Inmunoglobulina anti-humana G (IgG) conjugada con peroxidasa de rábano picante
Sustrato TMB	1 x 15 ml	Negro	incolore	TMB/H ₂ O ₂ estabilizada
Tiras de membrana	24 tiras	Código de color: azul/ amarillo	N/A	Antígenos recubiertos, véase Uso previsto
Pinzas	1 por cada kit	N/A	N/A	N/A
Bandeja de incubadora	3 por cada kit	N/A	N/A	N/A
Etiquetas de tampón para muestra	2 por cada kit	N/A	N/A	N/A
MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO				
HELIA® de Aesku.Diagnostics, cilindro para 1000 ml, cilindro o pipeta para 10 ml, pipetas de precisión (15, 1000 µl), papel de filtro o absorbente. Nuestras pruebas se han diseñado para uso con agua destilada, de acuerdo con la definición de las farmacopeas de Estados Unidos (USP 26 - NF 21) y Europa (Eur. Ph. 4.ª ed.).				

4 Almacenamiento y caducidad

Mantenga todos los reactivos y tiras de membrana a 2-8 C/35,6-46,4°F en sus recipientes originales. Se puede asumir una estabilidad del vial abierto de seis semanas, siempre que los componentes del kit abiertos y ensamblados se almacenen según sea necesario a 2-8°C/35,6-46,4°F después de la ejecución de la prueba. La vida útil del reactivo de bloqueo es de 3 semanas después de su preparación, siempre que se almacene según sea necesario a 2-8°C/35,6-46,4°F. Los reactivos y las tiras deberán utilizarse antes de la fecha de caducidad indicada en cada componente. No utilice los componentes una vez superada la fecha de caducidad. Evite la exposición intensa a la luz de la solución TMB.

 AESKU DIAGNOSTICS LA HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO QUE FUNCIONA	Ref. del producto:	401006
	Desc. del producto	IgG para trastornos relacionados con el gluten
	Rev. manual n.º:	002: 2023-11-14

5 Precauciones de uso e instrucciones generales

5.1 Datos de riesgo para la salud

Este producto se ha diseñado exclusivamente para DIAGNÓSTICO IN VITRO. Como consecuencia, el kit sólo puede ser utilizado por personal con la cualificación apropiada y formación especial sobre los métodos de diagnóstico in vitro. Aunque este producto no se considera especialmente tóxico ni peligroso en las condiciones de uso previsto, siga estas recomendaciones para garantizar un nivel de seguridad óptimo:

Recomendaciones y precauciones

Este kit incluye componentes potencialmente peligrosos. Aunque los reactivos del kit no están clasificados como irritantes para los ojos o la piel, se recomienda evitar el contacto con los ojos y la piel, y llevar guantes desechables.

Este producto contiene diluciones de origen humano o animal, por lo que deben considerarse potencialmente infecciosas y deben manipularse de acuerdo con la normativa nacional.

Está prohibido fumar, comer y beber mientras se manipula el kit. La pipeta no se debe llevar a la boca.

Todos los componentes del kit están clasificados como no peligrosos según el reglamento (CE) n.º 1272/2008 [CLP]. Para obtener más información sobre los ingredientes, consulte el documento de materiales y seguridad (MSDS).

En concreto, la mezcla no contiene ninguna sustancia en concentraciones $\geq 0,1$ % que se clasifiquen como PBT o mPmB.

Las muestras de paciente se deben considerar potencialmente infecciosas y manipular de acuerdo con las leyes nacionales. Las muestras de paciente y otros materiales potencialmente infecciosos se deben descontaminar después de la serie de pruebas.


5.2 Instrucciones generales de uso

A fin de diferenciar los distintos análisis cuantitativos **AESKUBLOTS**[®] disponibles, se aplica una codificación por colores encima de la línea de referencia de las tiras:

Código de color	AESKUBLOTS [®]
azul/amarillo	Gluten Related Disorders IgA
azul/negro	Gluten Related Disorders IgG

En caso de que observe datos incorrectos en la información del producto, incluidas las etiquetas, póngase en contacto con el fabricante o proveedor del producto.

El reactivo bloqueante y el tampón de lavado se pueden intercambiar entre lotes y kits de análisis. Los componentes restantes son específicos de cada kit de análisis y no se deben intercambiar. No intercambie componentes de reactivo con los ensayos de diagnóstico para enfermedades autoinmunitarias, alergias o borrelia.

 AESKU DIAGNOSTICS LA HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO QUE FUNCIONA	Ref. del producto:	401006
	Desc. del producto	IgG para trastornos relacionados con el gluten
	Rev. manual n.º:	002: 2023-11-14

No utilice recipientes de poliestireno para manipular el conjugado.

Permita que todos los componentes alcancen la temperatura ambiente (20-32°C/68-89,6°F) antes de utilizarlos, mézclelos bien y siga el esquema de incubación recomendado para conseguir un rendimiento óptimo. La prueba solo se puede realizar en combinación con HELIA® de Aesku.Diagnostics.

No exponga nunca los componentes a temperaturas superiores a los 37 C/98,6°F.

Pipetee siempre la solución de sustrato con puntas completamente nuevas. Proteja el reactivo de la luz. No pipetee nunca el conjugado con puntas utilizadas anteriormente con otros reactivos.

La intensidad del color de banda no está necesariamente correlacionada con los títulos de anticuerpos obtenidos mediante otras metodologías de referencia.

Las muestras obtenidas de donantes de sangre aparentemente sanos pueden contener autoanticuerpos.

Si la muestra del paciente contiene niveles elevados de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobulina, no se podrán descartar falsos positivos provocados por uniones no específicas.

El diagnóstico clínico definitivo no debería fundamentarse únicamente en los resultados de la prueba realizada, sino que debería llevarlo a cabo el médico una vez evaluados todos los datos clínicos y analíticos. El diagnóstico debe verificarse utilizando diferentes métodos de diagnóstico.

Asimismo, cabe destacar que, al seguir una dieta sin gluten, los anticuerpos específicos para enfermedad celíaca se reducen significativamente hasta que dejan de detectarse.



Ref. del producto:	401006
Desc. del producto	IgG para trastornos relacionados con el gluten
Rev. manual n.º:	002: 2023-11-14

6 Obtención, manipulación y almacenamiento de las muestras

Deben utilizarse preferentemente muestras de suero recién extraídas. La extracción de sangre debe cumplir los requisitos de protocolo de su país. No deben utilizarse muestras ictericas, lipémicas, hemolizadas ni contaminadas con bacterias. Las muestras de suero con partículas se deben limpiar mediante centrifugación a baja velocidad (<1000 x g). Las muestras de sangre deben recogerse en tubos limpios, secos y vacíos.

Tras la separación, las muestras de suero han de utilizarse durante las primeras 8 horas. Como alternativa, las muestras deberían conservarse en viales herméticamente cerrados a 2-8 C/35,6-46,6°F durante un máximo de 48 horas o congelados a -20 C/-4 F durante periodos más prolongados. Evite congelar y descongelar las muestras repetidas veces (Thomas: Laboratorio y diagnóstico; Guía CLSI GP44-A4 Vol. 30 No. 10). No utilice muestras de suero/plasma inactivadas por calor (56°C/132,8°F).

7 Procedimiento del ensayo

7.1 Preparativos antes de comenzar

Dilución de los reactivos concentrados:

Confirme que no se hayan formado cristales salinos en el concentrado. En caso de que esto ocurra, caliente ligeramente el concentrado (basta con utilizar temperatura ambiente) para disolver los cristales.

Diluya el tampón de lavado concentrado a 1:20 con agua destilada (por ejemplo, 950 ml con 50 ml).

Para preparar un tampón para muestra: agregue 10 ml de tampón de lavado a un frasco de reactivo bloqueante y mezcle bien.

Coloque las tiras de prueba en la orientación correcta (línea de referencia y codificación de color hacia arriba) en los pocillos de incubación mediante pinzas (no toque las tiras de análisis con la mano). Guarde las tiras de análisis no utilizadas en la caja correspondiente bien cerrada dentro de una bolsa seca y en un lugar frío (2-8 C/35,6-46,4°F).

Cargue el instrumento de acuerdo con las especificaciones de HELIA®.

Notas importantes:

La prueba solo se puede realizar de forma completamente automática en combinación el sistema HELIA® de Aesku.Diagnostics. La prueba correspondiente se realiza con el programa: 401005 GRD IgG.

Se debe utilizar el Certificado de análisis (COA por sus siglas en inglés) específico de cada lote.



Ref. del producto:	401006
Desc. del producto	IgG para trastornos relacionados con el gluten
Rev. manual n.º:	002: 2023-11-14

8 Evaluación cuantitativa

8.1 Evaluación

La evaluación se lleva a cabo con el software integrado en el sistema HELIA®. Al mismo tiempo, el dispositivo comprueba cada tira en relación con los criterios de validación.

Intervalo normal	Indeterminado	Resultados positivos
<12 U/ml	12 – 18 U/ml	>18 U/ml

La evaluación cuantitativa se realiza mediante una curva estándar en la que los valores grises de los estándares se trazan en comparación con la concentración en U/ml. En la unidad de evaluación del sistema HELIA® se utiliza un ajuste de curva logística de 4 parámetros (4PL). Mediante la curva, la concentración en U/ml viene determinada por la unidad de evaluación del sistema HELIA® a partir del valor de paridad de la muestra de cada antígeno específico.

En caso de que los valores de los controles no se ajusten a los criterios de validación, el análisis se considerará no válido y deberá repetirse. Si se observan resultados dudosos, se recomienda la repetición con una muestra nueva.

Se deberán comprobar las siguientes posibles fuentes de error: fechas de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento, pipetas, equipo utilizado y condiciones de incubación.

Si las muestras analizadas indican desviaciones o valores anómalos, o si los criterios de validación no se cumplen por motivos que no son responsabilidad de la persona que realiza la prueba, póngase en contacto con el fabricante o proveedor del kit.

Los laboratorios médicos deben realizar controles de calidad de forma independiente con sus propios controles o mezclas de acuerdo con la normativa nacional.

9 Datos técnicos

Material de muestra:	Suero
Volumen de muestra:	15 µl de muestra
Tiempo total de incubación:	117 minutos a 20-32 C/68-89,6°F
Intervalo de medición	0-300 U/ml
LdB	Consulte el capítulo 10.1
LdD	Consulte el capítulo 10.1
Almacenamiento:	a 2-8 °C/35,6-46,4 °F; uso solo con viales originales
Número de determinaciones:	24 análisis

10 Datos de funcionamiento

10.1 Sensibilidad analítica

El límite de blanco (LdB), que corresponde al límite de detección del sistema de medición, se determinó mediante la repetición del reactivo bloqueante 20 veces en cada antígeno. El siguiente valor se determina para todos los antígenos: 0.00 U/ml.

El límite de detección (LdD) corresponde al límite de detección del sistema de medición. El LdD se establece en 0.20 U/ml para todos los antígenos.

10.2 Intervalo normal

Se analizó el suero de donantes sanos mediante *AESKUBLOTS*[®] Gluten Related Disorders IgG y se obtuvo la siguiente distribución:

Antígeno	Número de muestras	Valor medio [U/ml]	Mediana [U/ml]	Valor mínimo [U/ml]	Valor máximo [U/ml]
Gliadina	120	0,85	0,02	0,00	15,85
DGP	120	0,01	0,00	0,00	0,44
tTG	120	0,36	0,01	0,00	12,85
neo tTG	120	0,01	0,00	0,00	1,10
TG3	120	0,07	0,00	0,00	7,63,
neo mTG	120	0,04	0,00	0,00	1,58
mTG	120	0,00	0,00	0,00	0,02
Gliadina PT	120	0,20	0,01	0,00	9,53

Recomendamos que cada laboratorio determine un valor de intervalo normal propio.

10.3 Precisión

La precisión de los resultados de prueba obtenidos con los *AESKUBLOTS*[®] Gluten Related Disorders IgG se investigó mediante la determinación de la precisión intra e interensayo y la variación entre lotes; para ello, se analizaron varias muestras con diferentes concentraciones.

Los valores medios de todas las muestras se calcularon y expresaron en U/ml. Para las muestras dentro del rango positivo, el coeficiente de variación (CdV) también se especificó en forma de porcentaje. Para muestras dentro del rango negativo, se utiliza la indicación neg., que confirma los resultados negativos. La indicación neg. se introdujo debido a que los valores muy reducidos (con muestras negativas), incluso con diferencias pequeñas aumentadas artificialmente, no provocan desviaciones significativas.

Intraensayo

		Gliadina	DGP	tTG	neo tTG	TG3	neo mTG	mTG	Gliadina PT
Muestra 1	Valor medio [U/ml]	43,29	186,30	1,34	101,91	0,00	286,86	0,00	42,28
	CdV [%]	18,30%	6,35%	neg	8,30%	neg	7,32%	neg	16,78%
Muestra 2	Valor medio [U/ml]	10,12	40,80	0,12	43,71	0,00	149,87	0,00	6,55
	CdV [%]	neg	16,49%	neg	16,16%	neg	10,27%	neg	neg
Muestra 3	Valor medio [U/ml]	60,19	155,65	27,00	91,39	0,23	276,59	0,06	84,82
	CdV [%]	11,06%	13,90%	19,35%	7,51%	neg	10,35%	neg	14,14%
Muestra 4	Valor medio [U/ml]	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	CdV [%]	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Muestra 5	Valor medio [U/ml]	0,00	0,00	0,23	0,00	0,01	0,01	199,42	0,00
	CdV [%]	neg	neg	neg	neg	neg	neg	11,53%	neg

Interensayo

		Gliadina	DGP	tTG	neo tTG	TG3	neo mTG	mTG	Gliadina PT
Muestra 1	Valor medio [U/ml]	37,63	172,46	9,32	100,01	0,05	271,18	2,56	32,17
	CdV [%]	20,48%	9,78%	neg	7,54%	neg.	7,54%	neg	20,52%
Muestra 2	Valor medio [U/ml]	7,25	33,90	0,33	38,64	0,04	131,62	0,03	3,74
	CdV [%]	neg	21,44%	neg	21,58%	neg	14,82%	neg	neg
Muestra 3	Valor medio [U/ml]	55,70	163,07	18,85	81,98	0,09	240,10	0,23	70,96
	CdV [%]	15,22%	10,53%	23,33%	12,21%	neg	10,96%	neg	20,66%
Muestra 4	Valor medio [U/ml]	0,00	0,04	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
	CdV [%]	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Muestra 5	Valor medio [U/ml]	0,01	0,06	2,96	0,00	0,02	0,09	194,04	0,19
	CdV [%]	neg	neg	neg	neg	neg	neg	22,65%	neg

Variación entre lotes

		Gliadina	DGP	tTG	neo tTG	TG3	neo mTG	mTG	Gliadina PT
Muestra 1	Valor medio [U/ml]	35,62	156,76	6,17	97,14	0,02	244,03	0,02	26,66
	CdV [%]	17,78%	12,98%	neg	14,01%	neg	12,50%	neg	23,72%
Muestra 2	Valor medio [U/ml]	4,91	34,82	0,54	45,52	0,03	145,14	0,01	4,02
	CdV [%]	neg,	20,89%	neg	21,57%	neg	15,50%	neg	neg
Muestra 3	Valor medio [U/ml]	45,54	163,06	14,19	69,97	0,08	226,74	0,36	51,96
	CdV [%]	23,38%	9,60%	20,47%	16,49%	neg	11,16%	neg	25,14%
Muestra 4	Valor medio [U/ml]	0,01	0,00	0,03	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
	CdV [%]	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Muestra 5	Valor medio [U/ml]	0,77	0,72	0,89	0,96	1,12	0,42	167,84	0,02
	CdV [%]	neg	neg	neg	neg	neg	neg	24,38%	neg

10.4 Comparación con la competencia

Puesto que había disponibles datos clínicos relativos a la dieta sin gluten para las muestras medidas y este factor es decisivo para la detección de anticuerpos específicos, las muestras se caracterizaron previamente con una prueba de referencia. Se supuso que las muestras evaluadas previamente como positivas mediante la prueba de referencia eran positivas y que las muestras evaluadas previamente como negativas eran negativas. Las muestras dudosas se consideraron negativas. En este método se supone que la prueba de referencia identifica correctamente las muestras, lo que quizá no necesariamente sea el caso. Se deberán realizar más estudios a este respecto.

10.4.1 DGP y tTG

Los antígenos de DGP y tTG se compararon con un análisis de inmunotransferencia LINE disponible comercialmente (prueba de referencia con la certificación de organismo notificado CE) para la determinación de anticuerpos específicos de la enfermedad celíaca.

Enfermedad	Medición de DGP	Medición de tTG
Enfermedad celíaca	12	6
Enfermedad de Crohn	31	31
Diabetes mellitus tipo 1	23	23
Colitis ulcerosa	24	24
Gastroenteritis	23	23
Intolerancia a la lactosa	17	17
Controles de salud	60	60

DGP		Prueba de referencia		
		Positivo	Negativo	Total
AESKUBLOTS Gluten Related Disorders IgG	Positivo	9	0	9
	Negativo	3	178	181
	Total	12	178	190

DGP	[%]	IC del 95 %
Sensibilidad	75,0	46,77 a 91,11
Especificidad	100,0	97,89 a 100
Concordancia total	98,4	95,5 a 99,5

En el colectivo evaluado, que se caracterizó previamente mediante la prueba de referencia, se determinó una sensibilidad del 75,0 % con una especificidad del 100 % en relación con el sistema de referencia. Los valores obtenidos se basan en la suposición de que la prueba de referencia permite la clasificación correcta de todas las pruebas. El antígeno de DGP tiene 2 variantes de péptido diferentes con casi toda probabilidad.

tTG		Prueba de referencia		
		Positivo	Negativo	Total
AESKUBLOTS Gluten Related Disorders IgG	Positivo	6	1	7
	Negativo	0	177	177
	Total	6	178	184

tTG	[%]	IC del 95 %
Sensibilidad	100,0	60,97 a 100
Especificidad	99,4	96,89 a 99,97
Concordancia total	99,5	97,0 a 99,9

En el colectivo evaluado, que se caracterizó previamente mediante la prueba de referencia, se determinó una sensibilidad del 100 % con una especificidad del 99,4 % en relación con el sistema de referencia. Los valores obtenidos se basan en la suposición de que la prueba de referencia permite la clasificación correcta de todas las pruebas.

10.4.2 Gliadina y neoepítipo de tTG

Los antígenos gliadina y neoepítipo de tTG se compararon con inmunoensayos ELISA (productos con la certificación de organismo notificado CE de Aesku.Diagnostics) disponibles comercialmente para la determinación de los anticuerpos frente a gliadina y neoepítipo de tTG.

Enfermedad	Medición de gliadina	Medición de neo tTG
Enfermedad celíaca	40	27
Enfermedad de Crohn	31	31
Diabetes mellitus tipo 1	23	23
Colitis ulcerosa	24	24
Gastroenteritis	23	23
Intolerancia a la lactosa	17	17
Controles de salud	100	100

Gliadina		Prueba de referencia		
		Positivo	Negativo	Total
AESKUBLOTS Gluten Related Disorders IgG	Positivo	29	2	31
	Negativo	25	202	227
	Total	54	204	258

Gliadina	[%]	IC del 95 %
Sensibilidad	53,7	40,61 a 66,31
Especificidad	99,0	96,50 a 99,83
Concordancia total	89,5	85,2 a 92,7

En el colectivo evaluado, se determinó una sensibilidad del 53.7 % con una especificidad del 99.0 % en relación con el sistema de referencia. Los valores determinados se basan en la suposición de que la prueba de referencia permite la clasificación correcta de todas las pruebas.

Neopéptido tTG		Prueba de referencia		
		Positivo	Negativo	Total
AESKUBLOTS Gluten Related Disorders IgG	Positivo	21	0	21
	Negativo	8	216	224
	Total	29	216	245

Neopéptido tTG	[%]	IC del 95 %
Sensibilidad	72,4	54,3 a 85,3
Especificidad	100,0	98,3 a 100,0
Concordancia total	96,7	93,7 a 98,3

En el colectivo evaluado, se determinó una sensibilidad del 72,4 % con una especificidad del 100,0 % en relación con el sistema de referencia. Los valores obtenidos se basan en la suposición de que la prueba de referencia permite la clasificación correcta de todas las pruebas.

10.4.3 mTG y neopéptido de mTG

En la actualidad, para los antígenos mTG y neopéptido de mTG no existen productos comparativos en el mercado. Sin embargo, fue posible realizar una prueba comparativa mediante los kits ELISA RUO (empresa Aesku.Diagnostics) para la determinación de los anticuerpos frente a mTG y neopéptido de mTG.

Enfermedad	Medición de neo mTG	Medición de mTG
Enfermedad celíaca	53	102
Enfermedad de Crohn	31	31
Diabetes mellitus tipo 1	23	23
Colitis ulcerosa	24	24
Gastroenteritis	23	23
Intolerancia a la lactosa	17	17
Controles de salud	100	100

Neopéptido de mTG		Prueba de referencia		
		Positivo	Negativo	Total
AESKUBLOTS Gluten Related Disorders IgG	Positivo	47	0	47
	Negativo	37	187	223
	Total	84	187	271

Neopéptido de mTG	[%]	IC del 95 %
Sensibilidad	56,0	45,3 to 66,1
Especificidad	100,0	97,9 to 100,0
Concordancia total	86,3	81,7 to 89,9

En el colectivo evaluado, se determinó una sensibilidad del 56,0 % con una especificidad del 100 % en relación con el sistema de referencia. Los valores determinados se basan en la suposición de que la prueba de referencia permite la clasificación correcta de todas las pruebas.

mTG		Prueba de referencia		
		Positivo	Negativo	Total
AESKUBLOTS Gluten Related Disorders IgG	Positivo	0	0	0
	Negativo	0	320	320
	Total	0	320	320

mTG	[%]	IC del 95 %
Sensibilidad	-	-
Especificidad	100,0	98,8 to 100,0
Concordancia total	100,0	98,8 to 100,0

Los estudios anteriores han demostrado que los anticuerpos frente a mTG son muy raros. Esto se pudo confirmar en el caso de *AESKUBLOTS*[®] Gluten Related Disorders IgG. Se determinó una especificidad del 100 % en relación con el sistema de referencia. Los valores determinados se basan en la suposición de que la prueba de referencia permite la clasificación correcta de todas las pruebas.

10.5 Linealidad

Para los sueros seleccionados, en este ensayo se pudo determinar una relación lineal entre la dilución y la concentración de anticuerpos. En todas las muestras enumeradas se ha registrado un $R^2 > 0,95$. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de los anticuerpos humanos, no se puede excluir que un suero específico demuestre un comportamiento no lineal.

Antígeno	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
	R ²	R ²	R ²	R ²
Gliadina	0,956	0,979	0,987	0,954
DGP	0,978	0,980	0,971	-
tTG	0,987	0,977	0,988	-
neo tTG	0,965	0,992	0,967	0,964
TG3	-	-	-	-
neo mTG	0,973	0,980	0,994	0,970
mTG	0,961	0,961	0,962	-
Gliadina PT	0,976	0,958	0,979	-

10.6 Calibración

El sistema de medición cuantitativa se calibra en unidades provisionales debido a la falta de un estándar de referencia internacional. Los resultados se expresan en U/ml.

11 Bibliografía

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.

General Literature:

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.

IVD	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	
REF	Numero d'ordine	Catalogue number
	Référence Catalogue	Numéro de catálogo
	Bestellnummer	Αριθμός παραγγελίας
	Número de catálogo	
LOT	Descrizione lotto	Lot
	Lot	Lote
	Chargen Bezeichnung	Χαρακτηρισμός παρτίδας
	Lote	
CE	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	
	Prodotto da	Manufactured by
	Fabriqué par	Fabricado por
	Hergestellt von	Κατασκευάζεται από
	Fabricado por	
STRIP	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	
WASH 20x	Tamponi di lavaggio	Wash buffer
	Tampon de Lavage	Solución de lavado
	Waschpuffer	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	Solução de lavagem	
Block-Reag	Reagente bloccante	Blocking Reagent
	réactif de blocage	Reactivo bloqueante
	Blockier-Reagenz	Αντιδραστήριο αποκλεισμού
	Bloqueio de reagente	
RCNS 10ml	Ricostituire con 10 mL	Reconstitute with 10 mL
	reconstituer avec 10 mL	reconstituir con 10 mL
	rekonstituieren mit 10 mL	Ανασύσταση με 10 mL
	reconstituir com 10 mL	
SB	Tamponi campione	Sample buffer
	Tampon Echantillons	Tampón Muestras
	Probenpuffer	Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	Diluyente de amostra	
CONJ	Coniugato	Conjugate
	Conjugé	Conjugado
	Konjugat	Σύζευγμα
	Conjugado	
SUB	Tamponi substrato	Substrate buffer
	Substrat	Tampón sustrato
	Substratpuffer	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	Substrato	