AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKULISA®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA® DGP-G

Ref 3514

CE Σ 96 2°C 8°C IVD eIFU WWW.AESKU.COM

Gebrauchsanweisung

Inhaltsverzeichnis

1 Zweckbestimmung 1
2 Klinische Anwendung und Testprinzip 1
3 KIT Bestandteile 2
4 Lagerung und Haltbarkeit 2
5 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen 3
6 Probenentnahme, Vorbereitung und Lagerung 4
7 Testdurchführung 4
8 Quantitative und qualitative Auswertung 7
9 Technische Daten 8
10 Testdaten/Testcharakteristik 8
11 Literatur 11
12 Regulatorische Symbole 12

Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim
Germany
Phone: +49 6734 9622-0
Fax: +49 6734 9622-2222
Website: www.aesku.com
Mail: info@aesku.com

1 Zweckbestimmung

***AESKULISA*® DGP-G** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay mit synthetischen, deamidierten von Gliadin abgeleiteten Peptiden zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von IgG Antikörpern gegen deamidierte Gliadin-spezifische Peptide (DGP) in humanem Serum.
Der Test dient der Diagnosestellung der Zöliakie (Gluten-sensitive Enteropathie).

2 Klinische Anwendung und Testprinzip

Die Gluten sensitive Enteropathie (GSE) oder Zöliakie ist durch eine Atrophie der Villi des Dünndarms charakterisiert, es kommt zur einer Abflachung der Mukosa. Ursache für die Erkrankung ist eine pathologische Intoleranz gegen Gliadin. Gliadin ist die alkohollösliche Fraktion des Glutens, einem Bestandteil des Weizens, Roggens und der Gerste.
Die Erkrankung wird durch die Aufnahme von Gluten induziert. Als Therapie muss lebenslang eine Gluten-freie Diät eingehalten werden, da die Symptome bei erneuter Gluten-Aufnahme stets wieder auftreten. Die Zöliakie ist HLA assoziiert, >95% der Patienten haben DQ2 kodiert durch DQA1*0501 and DQB1*0201. Die Manifestation der Krankheit erfolgt in allen Altersstufen, gehäuft jedoch im frühen Kindesalter, z.T. bereits bei Neugeborenen. Die Inzidenz liegt bei 1/ 4000 bis zu 1/ 300 in Europa.
Die Diagnose erfolgt letztlich durch Nachweis der typischen flachen Mukosa mittels Dünndarm-Biopsie, begleitet durch serologische Marker. Antikörper gegen Gliadin und Gewebs-Transglutaminase (tTG) haben hier besondere Bedeutung erlangt. tTG wurde als das Zielantigen der EMA identifiziert. EMA sind Antikörper, die an Endomysium, einem extrazellulären Bestandteil glatter Muskulatur, binden, ihr Nachweis im indirekten Immunfluoreszenz-Test (IFT) war bislang ein wichtiges Hilfsmittel bei der Diagnosestellung der Zöliakie.
Anti-Gliadin Antikörper der Subklasse IgG und IgA finden sich mit hoher Frequenz in Seren von Zöliakie-Patienten, sind jedoch weniger spezifisch als die Autoantikörper gegen tTG und EMA.
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.
Die Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen DGP (und/oder tTG) ist von hohem Wert, da etwa 2-5% der Zöliakie-Patienten eine IgA-Defizienz besitzen und somit bei Tests, die Antikörper der Subklasse IgA nachweisen, verpasst werden.
Als serologische Parameter ist die Bestimmung von Antikörpern gegen Gliadin und DGP bei Neugeborenen von besonderer Bedeutung, da in diesem Alter noch keine Autoantikörper gegen tTg oder EMA vorhanden sind.

Testprinzip
Die 1:101 verdünnten Serumproben werden in den Kavitäten, welche mit dem spezifischen Antigen beschichtet sind, inkubiert. Hierbei binden spezifische Antikörper aus dem Patientenserum, wenn vorhanden, an das Antigen auf der Platte; ungebundene Serumkomponenten werden im folgenden Waschschritt weggewaschen. Anschließend werden anti-Human Immunoglobuline, 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 Waschschritt entfernt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgt mit einer enzymatischen Farbreaktion (blau) des Substrates, die mit verdünnter Säure abgestoppt wird (Farb-umschlag nach gelb). Die Intensität der Farbentwicklung des Chromogens ist abhängig von der an den Antigen-Antikörper-Komplex gebundenen Konjugatmenge und somit direkt proportional zur Antikörperkonzentration im Serum.

3 KIT Bestandteile

Vor Gebrauch verdünnen				
Kitbestandteil	Menge	Farbe des Verschluss	Farbe der Lösung	Beschreibung / Inhalt
Probenpuffer 5x	1 x 20ml	Weiß	Gelb	5 fach konzentriert Tris, NaCl, BSA, Natriumazid < 0,1% (Konservierungsstoff)
Waschpuffer 50x	1 x 20ml	Weiß	Grün	50 fach konzentriert Tris, NaCl, Tween 20, Natriumazid < 0,1% (Konservierungsstoff)
Gebrauchsfertig:				
Kitbestandteil	Menge	Farbe des Verschluss	Farbe der Lösung	Beschreibung / Inhalt
Negativ Kontrolle	1 x 1,5ml	Grün	Farblos	Humanes Serum (verdünnt), BSA, Natriumazid < 0,1% (Konservierungsstoff)
Positiv Kontrolle	1 x 1,5ml	Rot	Gelb	Humanes Serum (verdünnt), BSA, Natriumazid < 0,1%
Cut-off Kalibrator	1 x 1,5ml	Blau	Gelb	Humanes Serum (verdünnt), BSA, Natriumazid < 0,1% (Konservierungsstoff)
Kalibratoren	6 x 1.5ml	Weiß	Gelb*	Konzentration der Kalibratoren: 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml. Humanes Serum (verdünnt), BSA, Natriumazid < 0,1% (Konservierungsstoff)
Konjugat, IgG	1 x 15ml	Blau	Blau	Anti-human Immunoglobulin markiert mit Meerrettichperoxidase, BSA
TMB Substrat	1 x 15ml	Schwarz	Farblos	Stabilisiertes TMB/H2O2
Stop Lösung	1 x 15ml	Weiß	Farblos	1M Salzsäure
Mikrowell-Streifen	12 x 8 well strips	N/A	N/A	brechbar. Beschichtung siehe Punkt 1.
*Farbintensität mit Konzentration steigend				
Erforderliche Materialien, nicht im Kit enthalten:				
Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm, optional mit Referenzwellenlänge von 620nm (600-690 nm). Glaswaren (Zylinder 100-1000ml), Röhrchen für Verdünnungen, Vortexer, Mikropipetten (10, 100, 200, 500, 1000 µl) oder einstellbare Multipipette. Wascheinheit für Mikrotiterplatten (300µl Multipipette oder Mehrkanalpipette oder automatisches Waschsystem), 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 Mikrotiterplatte soll bei 2 - 8 °C / 35,6 - 46,4 °F in den Originalflaschen erfolgen. Verdünnte Lösungen sind bei 2 - 8 °C / 35,6 - 46,4 °F einen Monat haltbar. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Verfallene Kitbestandteile nicht benutzen! Eine starke Lichteinwirkung auf die Substratlösung TMB ist zu vermeiden. Mikrotiterplatten stets in der Verpackungsfolie mit Trockenbeutel verschlossen aufbewahren.

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. Die in diesem Produkt enthaltenen Reagenzien sind bei vorschriftmäßigem Gebrauch weder als toxisch noch als gesundheitsgefährlich einzustufen, dennoch sollte zur Gewährleistung der maximalen Sicherheit des Anwenders folgendes eingehalten werden:

Empfehlungen und Vorsichtsmaßnahmen

Da einzelne Komponenten des Kits potentiell gefährdende Reagenzien enthalten, können diese eine Reizung der Augen und der Haut hervorrufen.

ACHTUNG: Kalibratoren, Kontrollen und Puffer enthalten Natriumazid (NaN_3) als Konservierungsstoff. NaN_3 kann toxisch wirken, sofern es eingenommen oder über die Haut oder Augen adsorbiert wird. NaN_3 kann mit Blei oder Kupferrohren hochexplosive Metallazide bilden. Zur Vermeidung von Azid-Anreicherungen sollte bei der Entsorgung dieser Lösungen bitte mit einer großen Menge Wasser nachgespült werden. Bitte die Vorgaben örtlicher/ nationaler Vorschriften zur Dekontamination beachten.

Während des Arbeitens mit dem Kit nicht essen, trinken oder rauchen. Nicht mit dem Mund pipettieren, Einmal-Handschuhe tragen.

Die in diesem Produkt enthaltenen Reagenzien humanen Ursprungs (Kontrollen und Kalibratoren) erwiesen sich bei der Prüfung auf Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HbsAg), Hepatitis C und HIV 1 und 2 als negativ. Dennoch ist bei Produkten menschlichen Ursprungs nie mit letzter Sicherheit auszuschließen, dass die genannten, andere oder ggf. noch nicht bekannte oder diagnostizierte Krankheitserreger enthalten sind. Daher sind Kontrollen, Kalibratoren sowie Patientenseren als potentiell infektiös einzustufen und entsprechend der nationalen Rechtslage zu handhaben. Das Produkt enthält Bestandteile tierischen Ursprungs wie in der Tabelle der Bestandteile angegeben: Beim Umgang sind entsprechende nationale Richtlinien zu beachten.

5.2 Allgemeine Hinweise

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

Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden, da dies zu Verfälschungen der Meßergebnisse führen kann.

Alle Kit-Komponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (20 - 32 °C / 68 - 89,6 °F) bringen und gut durchmischen. Das vorgeschriebene Protokoll zur Durchführung des Tests ist unbedingt einzuhalten.

Inkubation: Für eine Testabarbeitung mit Automaten empfehlen wir eine Temperatur von 30 °C / 86 °F.

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

Die Substrat-Lösung immer mit verkaufsneuen Pipettenspitzen pipettieren, um Kontaminationen zu vermeiden. Intensiven Lichtkontakt der Substratlösung vermeiden. Konjugat-Lösung niemals mit Pipettenspitzen pipettieren, welche mit anderen Reagenzien kontaminiert sind.

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.

6 Probenentnahme, Vorbereitung und Lagerung

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

Nach der Gewinnung sollten Serenproben innerhalb von 8 h verwendet werden, bzw. verschlossen für 48h bei 2 - 8 °C / 35,6 - 46,4 °F aufbewahrt werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtig sollten die Proben - 20 °C / - 4 °F tiefgefroren werden.

7 Testdurchführung

7.1 Vorbereitung

Verdünnung konzentrierter Reagenzien:

Konzentrierten Probenpuffer 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnen (z.B. 20ml plus 80ml).

Konzentrierten Waschpuffer 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnen (z.B. 20ml plus 980ml).

Um Fehler zu vermeiden empfehlen wir die Deckel der Kalibratoren und Kontrollen zu kennzeichnen.

Verdünnung der Patientenproben:

Serumproben 1:101 mit verdünntem Probenpuffer (1x) verdünnen und mischen, z.B. 1000 µl Probenpuffer + 10 µl Serum.

Waschen:

Es werden 20 ml verdünnten Waschpuffers (1x) pro 8 Kavitäten oder 200 ml pro 96 Kavitäten benötigt z.B. 4 ml Konzentrat plus 196 ml destilliertes Wasser.

Automatisiertes Waschen:

Für die Inbetriebnahme des Instrumentes und das Totvolumen sind zusätzliche Waschpuffermengen zu berücksichtigen.

Manuelles Waschen:

Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte auf Filterpapier entfernen. 300 µl verdünnten Waschpuffer in jede Kavität pipettieren, 20 Sekunden warten. Den Vorgang noch zweimal wiederholen.

Mikrotiterplatte:

Unbenutzte Kavitäten entfernen und fest verschlossen in der Verpackungsfolie mit Trockenbeutel kühl lagern (2 - 8 °C / 35,6 - 46,4 °F).

7.2 Pipettierschema

Wir empfehlen, die Kalibratoren, Kontrollen und Proben wie folgt zu pipettieren:

Zur *quantitativen* Auswertung

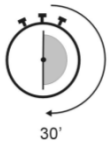
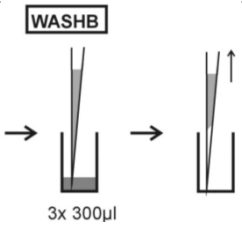
	1	2	3	4...
A	Cal A	Cal E	P1	
B	Cal A	Cal E	P1	
C	Cal B	Cal F	P2	
D	Cal B	Cal F	P2	
E	Cal C	PC	P3	
F	Cal C	PC	P3	
G	Cal D	NC	…	
H	Cal D	NC	…	

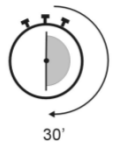
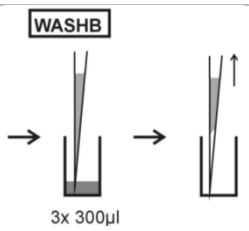
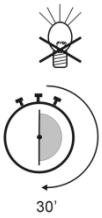
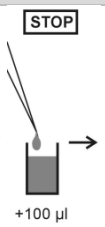
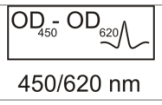
Zur *qualitativen* Auswertung

	1	2	3	4...
A	NC	P2		
B	NC	P2		
C	CC	P3		
D	CC	P3		
E	PC	…		
F	PC	…		
G	P1	…		
H	P1	…		

CalA: Kalibrator A
CalB: Kalibrator B
CalC: Kalibrator C
CalD: Kalibrator D
CalE: Kalibrator E
CalF: Kalibrator F
PC: Positiv Kontrolle
NC: Negativ Kontrolle
CC: Cut-off Kalibrator
P1: Patient 1
P2: Patient 2
P3: Patient 3

7.3 Arbeitsschritte

Schritt	*Beschreibung*
1.	Stellen sie sicher das die Vorbereitungen aus Kapitel 7.1 vor Beginn durchgeführt worden sind
2.	Verwenden sie die folgenden Schritte entsprechend der beabsichtigten quantitative / qualitative Interpretation der Ergebnisse
	Kalibratoren, Kontrollen & Proben
3.	 Pipettieren sie jeweils 100µl in die vorgesehenen Kavitäten entsprechend Kapitel 7.2: a. Kalibratoren (CAL.A bis CAL.F) zur QUANTITATIVEN oder b. Cut-Off Kalibrator (CC) zur QUALITATIVEN Interpretation Und 100µl von jedem der folgenden Bestandteile • Negativ Kontrolle (NC) und Positiv Kontrolle (PC) und • Verdünnte Patienten Proben (P1, P2,…)
4.	 30 Minuten bei 20 - 32 °C / 68 - 89,6 °F inkubieren.
5.	 3 mal mit jeweils 300 µl 1:50 verdünntem Waschpuffer waschen.

	KONJUGAT	
6.		100 µl Enzymkonjugatlösung in jede Kavität geben.
7.		30 Minuten bei 20 - 32 °C / 68 - 89,6 °F inkubieren.
8.		3 mal mit jeweils 300 µl 1:50 verdünntem Waschpuffer waschen.
	SUBSTRAT	
9.		100 µl TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
10.		30 Minuten bei 20 - 32 °C / 68 - 89,6 °F inkubieren, vor intensiver Lichteinstrahlung schützen.
	STOP	
11.		100 µl Stopplösung pro Kavität in der Reihenfolge der Substratzugabe pipettieren.
12.		Mindestens 5 Minuten inkubieren.
13.		Platte vorsichtig 5 Sekunden schütteln.
14.		Optische Dichte bei 450 nm innerhalb von 30 Minuten messen (empfehlenswert bei 450/620 nm).

8 Quantitative und qualitative Auswertung

Die **quantitative Auswertung** erfolgt anhand einer Standardkurve, bei der die optische Dichte der Kalibratoren (y-Achse) gegen die Konzentration in U/ml (x-Achse) aufgetragen wird. Eine log/lin Auftragung und ein 4-Parameter-Fit wird zur Auswertung empfohlen. Anhand der Kurve wird aus der optischen Dichte der Probe die Antikörper-Konzentration in U/ml ermittelt.

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

Auswertungsbeispiel

Dieses Beispiel darf nicht zur Interpretation der Patientenresultate benutzt werden !

Kalibratoren IgG	OD 450/620 nm	CV % (Varianz)
0 U/ml	0.039	0,0
3 U/ml	0.135	1,1
10 U/ml	0.313	3,2
30 U/ml	0.552	3,6
100 U/ml	1.187	3,5
300 U/ml	2.031	3,2

Berechnungsbeispiel

Patient	Replikat (OD)	Mittelwert (OD)	Ergebnis (U/ml)
P 01	1,017/1,029	1.023	85,6
P 02	0,498/0,494	0.496	29,4

Proben die über dem höchsten Kalibratorwert liegen sollten als >Max berichtet werden. Sie sollten entsprechend verdünnt und neu bewertet werden. Proben niedriger als der Meßbereich sollten als <Min berichtet werden.

Chargen spezifische Daten entnehmen Sie bitte dem beiliegenden Kontrollzertifikat. Medizinische Laboratorien sollten In-house Qualitätskontrollen mit eigenen Kontrollen und/oder Poolseren nach nationalem Reglement durchführen.

Es wird empfohlen, daß sich jedes Labor seine eigenen Normalwerte, basierend auf eigener Technik, Kontrollen, Ausrüstung und Patientenpopulation erarbeitet.

Sollten die Werte der Kontrollen nicht die Validierungskriterien erfüllen, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

Die folgenden Technischen Fakten sollten überprüft werden: Haltbarkeitsdaten der Reagenzien, Lagerbedingungen, Pipetten, verwendete Geräte, Photometer, Inkubationsbedingungen und Waschmethode.

Sollten die getesteten Proben ungewöhnliche Werte oder Abweichungen zeigen, oder werden die Validierungskriterien aus unerfindlichen Gründen nicht erfüllt kontaktieren sie bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits.

Die **qualitative Auswertung** erfolgt anhand des Vergleichs der optischen Dichte der Patientenprobe mit der optischen Dichte des Cut-off Kalibrators. Liegt die optische Dichte der Patientenprobe im Bereich von +/-20% des Cut-off Kalibrators, so ist diese als grenzwertig zu bewerten. Bei einer höheren OD ist die Patientenprobe als positiv, bei einer niedrigeren OD als negativ einzustufen.

Negativ:		**OD patient**	**<**	**0,8 x OD cut-off**		
Grenzwertig:	**0,8 x**	**OD cut-off**	**≤**	**OD patient**	**≤**	**1,2 x OD cut-off**
Positiv:		**OD patient**	**>**	**1,2 x OD cut-off**		

9 Technische Daten

Probenmaterial:	Serum
Probenvolumen:	10 µl Serum für 1:101 Verdünnung mit 1x Probenpuffer
Gesamt-Inkubationszeit:	90 Minuten bei 20 - 32 °C / 68 - 89,6 °F
Messbereich:	0-300 U/ml
Analytische Sensitivität:	1,83 U/ml
Wertebereich:	**2,09 – 300 U/ml**
Lagerung:	bei 2 - 8 °C / 35,6 - 46,4 °F in Originalflaschen.
Zahl der Bestimmungen:	96 Tests

10 Testdaten/Testcharakteristik

10.1 Analytische Sensitivität

Die Leerwert-Obergrenze von 0,3 U/ml wurde durch 62-maliges Testen von Probenpuffer mit ***AESKULISA*® DGP-G** ermittelt, die Nachweisgrenze von 1,83 U/ml durch 8-maliges Testen 8 schwach negativer Proben.

10.2 Methodenvergleich

Die Mikrotiterplatten sind mit synthetischen, deamidierten, von Gliadin abgeleiteten Peptiden beschichtet. Es wurden keine Kreuzreaktionen mit anderen Autoantikörpern nachgewiesen.

Insgesamt 218 Proben von Erwachsenen und Kindern (Zusammensetzung siehe Tabelle) wurden mit ***AESKULISA*® DGP-G** und einem Vergleichsprodukt, das im Wertebereich reagierte, getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Proben außerhalb des Wertebereichs wurden aus dem Vergleich ausgeschlossen, aber in die unten stehende klinische Validierung einbezogen):

DGP-G	**AESKU**	**Vergleichsprodukt**	
Diagnose	**POS (>18)**	**POS**	**Summe**
Zöliakie	62 (93,9 %)	59 (89,4 %)	66
Zöliakie IgA-Mangel	15 (100 %)	15 (100 %)	15
Zöliakie Verdacht	30 (81,1 %)	31 (83,8 %)	37
Zöliakie Verdacht IgA-Mangel	0 (0 %)	0 (0 %)	2
DH	39 (86,7 %)	38 (84,4 %)	45
Kontrollen (keine DH/Zöliakie)	3 (5,7 %)	1 (1,9 %)	53
Summe	**149 (68,3 %)**	**144 (66,1 %)**	**218**

DGP-G		**Vergleichsprodukt**		
		POS (>20)	**NEG (≤20)**	**Summe**
AESKU	**POS (>18)**	136	13	149
	NEG (≤18)	8	61	69
	Summe	144	74	218

Positive Übereinstimmung	95 % Konfidenzintervall (CI)	
94,44 % (136/144)	89,42 %	97,16 %
Negative Übereinstimmung		
82,43 % (61/74)	72,23 %	89,44 %
Gesamtübereinstimmung		
90,37 % (+61/218)	85,72 %	93,61 %

(*) Die Übereinstimmungen wurden kalkuliert, indem grenzwertige Ergebnisse als negativ und schwach positive Ergebnisse als positiv gewertet wurden.

Bei den 21 Proben mit unterschiedlichen Ergebnissen übertraf ***AESKULISA***® das Vergleichsprodukt in 11 Fällen, basierend auf zusätzlichen Informationen wie EMA, Biopsien und Ergebnissen von DGP-Assays anderer Immunoglobulin-Klassen.

10.3 Klinische Auswertung

Die diagnostische Sensitivität von 93,8 % und die diagnostische Spezifität von 97,3 % wurden mit den obigen Proben mit Zöliakie und Dermatitis herpetiformis (DH), den Proben ohne DH/Zöliakie und den Autoimmun-Kontrollproben kalkuliert, wobei die verdächtigen Proben und die gesunden Kontrollen nicht berücksichtigt wurden (Zusammensetzung siehe unten stehende Tabelle).

DGP-G	**AESKU**	
Erkrankungsgruppe	**POS (>18)**	**Summe**
Autoimmunkontrollen*	0 (0 %)	54
Zöliakie	75 (94,9 %)	79
Zöliakie IgA-Mangel	16 (100 %)	16
DH	59 (90,8 %)	65
Kontrollen (keine DH/Zöliakie)	3 (5,4 %)	56
Summe		**270**

(*) Enthält zusätzliche Proben, die nur mit AESKULISA bestimmt wurden und nicht mit dem Vergleichsprodukt sowie Proben, die eine hohe Positivität außerhalb des Wertebereichs aufwiesen.

DGP-G	Diagnose		
Test	**POS**	**NEG**	**Summe**
POS>18	150	3	153
NEG ≤18	10	107	117
Summe	160	110	270

Diagnostische Sensitivität*	**95 % Konfidenzintervall (CI)**	
93,75 % (150/160)	88,88 %	96,57 %
Diagnostische Spezifität*		
97,27 % (107/110)	92,29 %	99,07 %

*grenzwertige Ergebnisse wurden als negativ gewertet

10.4 Linearität

Für ausgewählte Seren konnte mit diesem Test ein linearer Zusammenhang zwischen Verdünnung und einem negativem Serum gemäß CLSI EP06-A ermittelt werden. Aufgrund der Heterogenität humaner Autoantikörper ist jedoch nicht auszuschließen, dass einzelne Proben ein anderes Verhalten zeigen.

Zusammensetzung		Hoch			Mittel			Niedrig		
Pos. Probe	Neg. Probe	Mittelwert [U/ml}	Erwartet [U/ml}	Wiederfindung [%]	Mittelwert [U/ml}	Erwartet [U/ml}	Wiederfindung [%]	Mittelwert [U/ml}	Erwartet [U/ml}	Wiederfindung [%]
100,0%	0.0%	313,9	313,9	100.0%	119,2	119,2	100.0%	16,7	16,7	100.0%
87.5%	12.5%	264,1	274,7	96.1%	100,8	104,3	96.7%	15,8	14,6	108.2%
75.0%	25.0%	243,3	235,4	103.3%	91,9	89,4	102.8%	12,4	12,5	98.7%
67.5%	32.5%	199,8	211,9	94.3%	76,0	80,4	94.4%	9,8	11,3	86.5%
50.0%	50.0%	162,5	157,0	103.5%	52,6	59,6	88.2%	8,0	8,4	95.6%
37.5%	62.5%	106,4	117,7	90.4%	46,0	44,7	103.0%	6,7	6,3	107.5%
25.0%	75.0%	84,1	78,5	107.2%	24,5	29,8	82.1%	3,0	4,2	71.1%
12.5%	87.5%	42,3	39,2	107.8%	13,7	14,9	91.6%	1,2	2,1	58.0%

Diese Daten ergeben, dass der lineare Bereich von ***AESKULISA*®** **DGP-G** von 2,09 U/ml bis 300 U/ml reicht.

10.5 Präzision

Zur Kontrolle der Assaypräzision wurde mit fünf Seren in verschiedenen Bereichen der Standardkurve die Varianz (Intra- und Inter-Assay-Varianz sowie die Lot-to-Lot Varianz) ermittelt, indem die Reproduzierbarkeit in 5 Durchgängen mit je 8 Wiederholungen untersucht wurde. Die Lot-to-Lot Varianz wurde untersucht, indem fünf Seren aus 3 verschiedenen Chargen in 8 Wiederholungen untersucht wurden.

Interassay-Varianz			**Intraassay-Varianz**			**Chargenspezifische Varianz**		
Probe Nr.	**Mittelwert (U/ml)**	**CV % (Varianz)**	**Probe Nr.**	**Mittelwert (U/ml)**	**CV % (Varianz)**	**Probe Nr.**	**Mittelwert (U/ml)**	**CV % (Varianz)**
1	3,24	21,5	1	3,24	11,3	1	2,67	7,6
2	12,1	14,8	2	12,1	10,4	2	11,5	12,4
2b	19,5	10,0	2b	19,5	9,0	-	-	-
3	24,3	13,0	3	24,3	11,7	3	22,4	9,1
4	86,2	10,8	4	86,2	9,3	4	79,8	7,2
5	256,9	11,8	5	256,9	8,5	5	265,6	8,6

Die Akzeptanzkriterien liegen für positive Proben bei ≤15 %, für grenzwertige Proben bei ≤15 % und für negative Proben bei ≤25 %.

10.6 Kalibration

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

10.7 Normalwertbereich

DGP-G Antikörper kommen bei bis zu 13,7 % der normalen Bevölkerung vor.

133 zufällig ausgewählte Blutspender wurden auf DGP-G Antikörper getestet. Darunter waren 116 Spender im Alter zwischen 16 und 45 Jahren und 17 Spender über 46 Jahre. Frauen und Männer waren in gleichen Anteilen vertreten. Eine Probe war positiv (0,8 %) mit einem Wert von 18,2 Einheiten, alle übrigen waren negativ. Der Mittelwert der Proben betrug 3,2 Einheiten mit einer Standardabweichung von 2,2 Einheiten. Der Mittelwert lag 6,9 Standardabweichungen unter der Positivitätsgrenze von 18 Einheiten.

11 Literatur

Schwertz E, et al.: Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. Clinical Chemistry 50: 2370-5, 2004.
Osman AA, et al.: B-Cell epitopes of gliadin. Clin Exp Immunol 121: 248-254, 2000.
Mothes T.: Deamidated gliadin peptides as targets for celiac disease-specific antibodies. Adv Clin Chem. 44: 35-63, 2007
Aleanzi M, et al.: Celiac disease: Antibody recognition against native and selectively deamidaion gliadin peptides. Clinical Chemistry 47: 2023-8, 2001.
Richter T, et al.; Determination of IgG and IgA antibodies against native gliadin is not helpful for the diagnosis of coeliac disease in children up to 2 years old. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 55: 21-5, 2012
Leffler DA, Schuppan D.: Update on serologic testing in celiac disease. Am J Gastroenterol. 105: 2520-4, 2010.
Kurppa K, et al.: Antibodies against deamidated gliadin peptides in early-stage celiac disease. J Clin Gastroenterol. 45: 673-8, 2011.
Vermeersch P, et al.: Diagnostic performance of IgG anti-deamidated gliadin peptide antibody assays is comparable to IgA anti-tTG in celiac disease. Clin Chim Acta. 411: 931-5, 2010
Prause C, et al.: Antibodies against deamidated gliadin as new and accurate biomarkers of childhood coeliac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 49: 52-8, 2009
Naiyer AJ, et al.: Comparison of commercially available serologic kits for the detection of celiac disease. J Clin Gastroenterol. 43: 225-32, 2009
Fasano, A. Surprises from Celiac Disease. Scientific American. 2009
Ivarsson, A., et al.: Breast-feeding protects against celiac disease. Am.J.Clin.Nutr. 75, 914–921, 2002
Lagerqvist, C., et al.: Antigliadin immunoglobulin A best in finding celiac disease in children younger than 18 months of age. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 47, 428–435. 2008
Liu, E. et al.: Natural history of antibodies to deamidated gliadin peptides and transglutaminase in early childhood celiac disease. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 45, 293–300. 2007
Losowsky, M.S. A history of coeliac disease. Dig.Dis. 26, 112–120. 2008
Maglio, M. et al.: . Serum and intestinal celiac disease-associated antibodies in children with celiac disease younger than 2 years of age. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 50, 43–48. 2010
Not, T. et al.: Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. ScandJ Gastroenterol 33, 494–498. 1998
Salmi, T.T., et al.: Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. Gut 55, 1746–1753. 2006
Schuppan, D., et al.:. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. Gastroenterology. 137, 1912–1933. 2009
Vermeersch, P. et al. Diagnostic performance of IgG anti-deamidated gliadin peptide antibody assays is comparable to IgA anti-tTG in celiac disease. Clin.Chim.Acta 411, 931–935. 2010

12 Regulatorische Symbole

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	- Cataloge number
	- Référence Catalogue	- Numéro de catálogo
	- Bestellnummer	- Αριθμός παραγγελίας
	- Número de catálogo	
LOT	- Descrizione lotto	- Lot
	- Lot	- Lote
	- Chargen Bezeichnung	- Χαρακτηρισμός παρτίδας
	- Lote	
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo	- Unique Device Identifier
	- Identifiant unique de l'appareil	- Identificador único del dispositivo
	- eindeutige Produktidentifizierung	- Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	- Identificador único do dispositivo	
CE	- Conformità europea	- EC Declaration of Conformity
	- Déclaration CE de Conformité	- Declaración CE de Conformidad
	- Europäische Konformität	- Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- Déclaracão CE de Conformidade	
Σ 96	- 96 determinazioni	- 96 tests
	- 96 tests	- 96 pruebas
	- 96 Bestimmungen	- 96 προσδιορισμοί
	- 96 Testes	
eIFU WWW.AESKU.COM	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso	- See electronical instructions for use
	- Voir les instructions d'utilisation électronique	- Siga las instrucciones electrónicas de uso
	- Elektronische Gebrauchsanweisung beachten	- Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Seguir as instruções electrónicas de utilização	
	- Da utilizzarsi entro	- Use by
	- Utilise avant le	- Utilizar antes de
	- Verwendbar bis	- Χρήση μέχρι
	- Utilizar antes de	
+2°C +8°C	- Conservare a 2-8°C (35,6-46,4°F)	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conserver 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	
CO-CAL	- Calibratore cut-off	- Cut off Calibrator
	- Etalon Seuil	- Calibrador de cut-off
	- Grenzwert Kalibrator	- Οριακός ορός Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	- Calibrador de cut-off	
CON +	- Controllo positivo	- Positive Control
	- Contrôle Positif	- Control Positivo
	- Positiv Kontrolle	- Θετικός ορός ελέγχου
	- Controlo positivo	
CON −	- Controllo negativo	- Negative Control
	- Contrôle Négatif	- Control Negativo
	- Negativ Kontrolle	- Αρνητικός ορός ελέγχου
	- Controlo negativo	
CAL	- Calibratore	- Calibrator
	- Etalon	- Calibrador
	- Kalibrator	- Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	- Calibrador	
CONJ	- Coniugato	- Conjugate
	- Conjugé	- Conjugado
	- Konjugat	- Σύζευγμα
	- Conjugado	
MP	- Micropiastra rivestita	- Coated microtiter plate
	- Microplaque sensibilisée	- Microplaca sensibilizada
	- Beschichtete Mikrotiterplatte	- Επικαλυμμένη μικροπλάκα
	- Microplaca revestida	
WASHB 50x	- Tampone di lavaggio	- Wash buffer
	- Tampon de Lavage	- Solución de lavado
	- Waschpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	- Solucão de lavagem	
SUB	- Tampone substrato	- Substrate buffer
	- Substrat	- Tampón sustrato
	- Substratpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	- Substrato	
STOP	- Reagente bloccante	- Stop solution
	- Solution d'Arrêt	- Solución de parada
	- Stopreagenz	- Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης
	- Solucão de paragem	
SB 5x	- Tampone campione	- Sample buffer
	- Tampon Echantillons	- Tampón Muestras
	- Probenpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	- Diluente de amostra	