

VERWENDUNGSSWECK

AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA ist ein patientennahes (Point-of-Care) In-vitro-Immunoassay zur qualitativen und quantitativen parallelen Bestimmung von humanen spezifischen IgA-Antikörpern gegen humane Gewebstransglutaminase (tTG), Neo-Epitope der human-en Gewebstransglutaminase (tTG neo), mikrobielle Transglutaminase (mTG), Neo-Epitope der mikrobiellen Transglutaminase (mTG neo), deamidierte Gladin-spezifische Peptide (DGP), Gladin, peptisch-tryptische Verdauungen von Gladin (Frazer-Fraktion), humane epidermale Transglutaminase (TG3) und gesamtes IgA in heparinisier-tem oder Na-EDTA-Blut, venösem oder Kapillarblut, Plasma oder Serum. Die Testergebnisse können dem Fachpersonal in Verbindung mit Anam-nese und weiteren Befunden zur Erstellung einer Ernährungsem-pfehlung oder zur Unterstützung der Diagnose (Diagnosehilfe) einer glutenbedingten Störung (GRD, engl. Gluten related disorders) dienen. Der Test ist von Fachpersonal durchzuführen, das im Umgang mit in-vitro-diagnostischen Methoden vertraut ist.

TESTPRINZIP

AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA ist ein modifiziertes ELISA-Testsystem (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Die Testkassette enthält 4 Testreihen auf denen Standards, Kontrollen und Antigene für dreifache Bestimmungen auf der Membran aufgetragen sind. Spezifische IgA-Antikörper (sIgA) aus der Probe binden an die entsprechenden Antigene. Das gebundene humane IgA wird durch einen spezifischen anti-human-IgA-Antikörper nachgewiesen. Zur Signalverstärkung wird ein an alkalische Phosphatase gekoppelter Sekundäntikörper zuge-geben. Nach Zugabe des Farbreagens wird das gebundene IgA durch ein indigo-farbenes Präzipitat identifiziert. Die sIgA-Ergebnisse können quantitativ mit einem getrennt zu erwerbenden Reader oder qualitativ durch das bloße Auge für alle Antigene abgelesen werden. Das Auslesen erfolgt durch Vergleichen der Farbsättigung (Intensität) des Antigen-signals (Mittelwert einer dreifachen Bestimmung) mit den Standardsignalen der ersten und vierten Testreihe (quantitative Auswertung) oder mit der Farbsättigung des Cut-off-Kalibrators auf der ersten Testreihe (qualitative Auswertung). Die sIgA-Konzentrationen werden in U/ml gemessen (quantitative Auswertung) oder in drei Stufen klassifiziert (qualitative Auswertung).

VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Nur zur Verwendung im Bereich der humanen In-vitro-Diagnostik. 2. Bitte lesen Sie die gesamte Gebrauchsanweisung vor der Durchführung des Tests. 3. Verwenden Sie keine Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums. 4. Bei Beschädigung der Verpackung prüfen Sie bitte sorgfältig, ob die Schutzhülle der Testkassette beschädigt ist. Überprüfen Sie auch, ob die Reagenzien-Röhrchen beschädigt oder offen sind. Im Zweifelsfall verwenden Sie den Test nicht, um fehlerhafte Ergebnisse oder eine falsche Diagnose auszuschließen. 5. Mischen Sie keine Reagenzien. 6. Das Farbreagenz enthält 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphat und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid. Ab1A (Antikörper-lösung 1A) und DILB (Probenblockverdünner) enthalten ProClin unterhalb des Konzentrationsgrenzwertes (Hautsensibilisierung). Ver-meiden Sie den Kontakt mit der Haut. Tragen Sie geeignete Schutz-handschuhe. Für weitere Informationen - Siehe Material Sicherheitsdatenblatt (erhältlich auf Anfrage). 7. Alle Komponenten sind für den Einmalgebrauch. 8. Die Testergebnisse sind nicht gültig, wenn die Vorsichtsmaßnahmen nicht eingehalten werden. 9. Koaguliertes Blut kann die Flüssigkeitswege verstopfen. 10. Alle im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetretenen schwerwiegenden Vorfälle müssen dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, gemeldet werden.

LAGERUNG

Die Lagerung sollte dunkel und kühl bei 2-8°C/36-46°F erfolgen. Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig in Einzeldosen und Schraubdeckel-röhrchen verpackt.

VERFALLSDATUM

Das Verfallsdatum ist auf den Etiketten der Verpackung angegeben. Das Verfallsdatum des Kits gilt für alle Kit-Komponenten, auch wenn das Verfallsdatum der einzelnen Komponenten anders ist! Nach dem Verfallsdatum müssen alle Testkomponenten verworfen werden.

REAGENZIEN UND MATERIAL

**Vorhandene Materialien:** Gebrauchsanweisung, Auswertebogen, Promokarte, Kontrollzertifikat (CoA), 2D-Barcode-Regelkarte für Reader, AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA Testkassette, Reagenzstände mit 9 farbkodierten Röhrchen, Blutentnahme-Beutel mit folgenden Bestandteilen: - **CE** zertifiziertes Material: Alkoholtupfer, Blutentnahmekapillare 200 µl mit Lithium Heparin, Tupfer, Pflaster - Sicherheitslanzette: steriles, **CE** zertifiziertes Produkt, welches als Stechhilfe zur Blutgewinnung dient - Spritze (Applikation von Flüssigkeiten)

1. DILB - Probenblockverdünner, 380µl, 1x (fliederfarbener Deckel) 2. WASH - Waschlösung, je 1ml, 3x (blauer Deckel) 3. Ab1A - Antikörperlösung 1A, 800µl, 1x (weißer Deckel, durchsichtiges Röhrchen) (enthält <1% polyklonalen Anti-Human-IgA-Antikörper gekoppelt an Digoxigenin) 4. Ab2 - Antikörperlösung 2, 800µl, 1x (gelber Deckel) (enthält <1% Maus monoklonalen anti-Digoxigenin Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase) 5. COLR - Farbreagenz, je 800µl, 2x (weißer Deckel, braunes Röhrchen) (enthält <1% 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphat/Nitroblau Tetrazoliumchlorid) 6. STOP - Stopp-Puffer, 1ml, 1x (grüner Deckel). **Hinweis:** Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig; Lagerung bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum.

Bestandteile aus menschlichem Material in der AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA Testkassette (getrocknetes Material auf den Teststreifen, kein Infektionsrisiko) wurden getestet und als negativ auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C befunden.

**Zusätzlich benötigtes Material, nicht im Kit enthalten:** Einweghand-schuhe, Stoppuhr. Für venöses Blut und/oder Plasmaproben: Zubehör für die venöse Blutabnahme, heparinisiertes Blutentnahmeröhrchen, Laborpipette.

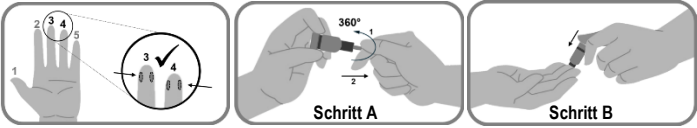
PROBENMATERIAL

Kapillarblut, das durch einen Stich in den Finger, ins Ohrläppchen oder in die Ferse (geeignet für Kinder) entnommen wurde, kann für den Test verwendet werden. Die im Kit enthaltene Blutentnahmekapillare sollte verwendet werden, um das korrekte Volumen (20 µl) einzuhalten. Heparinisiertes venöses Blut (20 µl), Plasma oder Serum (8 µl) können ebenfalls als Probe für diesen Test verwendet werden. Zur Entnahme des erforderlichen Volumens von Plasma oder Serum sollten Laborpipetten verwendet werden. Bitte folgen Sie den Anweisungen im Abschnitt "Testdurchführung", um die Probe zu entnehmen.

TESTDURCHFÜHRUNG

**Vorbereitung:** Alle Reagenzien und die Testkassette müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-30°C) gebracht werden. 1. Öffnen Sie das Test-Kit und entnehmen Sie: die Testkassette, die Spritze, den Reagenzstände und den Blutentnahme-Beutel. Legen Sie diese auf eine ebene Oberfläche. 2. Stellen Sie den Reagenzstände auf. 3. Beschriften Sie die Testkassette mit der Patienten-Nummer oder -Namen im grauen Beschriftungsfeld.

**Entnahme einer Kapillarblut-Probe:** Entnehmen Sie den Inhalt des Blutentnahme-Beutels: Alkoholtupfer, Sicherheitslanzette, Blutent-nahmekapillare 20 µl, Tupfer und Pflaster. Legen Sie alle Bestandteile auf eine saubere, ebene Oberfläche. 1. Vor der Blutentnahme massieren Sie die Fingerspitze oder legen Sie sie einige Momente in warmes Wasser, um den Blutfluss zu optimieren. 2. Reinigen Sie die Stelle, die gestochen wird (idealerweise Finger 3 oder 4, seitlich), mit dem Alkoholtupfer. 3. Nehmen Sie die Sicherheitslanzette und drehen Sie sie wie dargestellt (Schritt A) und ziehen Sie dann die Schutzkappe ab. 4. Pressen Sie die Sicherheitslanzette auf die Stelle des Fingers, die gestochen werden soll (Schritt B) und drücken Sie fest auf den Knopf, bis er sich löst. **Hinweis!** Achten Sie darauf, dass die Hand unterhalb der Herzhöhe ist. Wenn der Blutfluss zunächst langsam ist, massieren Sie sanft den Finger und stellen Sie sicher, dass die Hand unterhalb (!) der Herzhöhe ist.



5. Nehmen Sie die Blutropfen mit der Spitze der Blutentnahmekapillare auf. Halten Sie die Blutentnahmekapillare in einem leichten Winkel nach unten. Lassen Sie das Blut fließen, bis es bis zur Füllmarkierung gefüllt ist. Achten Sie darauf, dass dabei das Belüftungsloch des Saugrohrs nicht bedeckt wird. Die Füllmarkierung markiert das Probenvolumen von 20 µl. **Hinweis!** Achten Sie darauf, dass Sie 20 µl Blut für den Test verwenden, da Sie sonst keine gültigen Ergebnisse erhalten. 6. Bedecken Sie die Wunde mit einem Pflaster. 7. Öffnen Sie sofort anschließend das Probenblockverdünner-Röhrchen (fliederfarbener Deckel) und bringen Sie die Spitze der Blutentnahme-Kapillare knapp unter der Öffnung des Röhrchens in Position. Bedecken Sie das Loch am Ende des Saugröhrchens mit Ihrem Finger. Drücken Sie vorsichtig das Saugröhrchen, um das Blut in das Probenblockverdünner-Röhrchen zu drücken. Schließen Sie das Probenblockverdünner-Röhrchen und mischen Sie vorsichtig oder vortexen kurz.

**HINWEIS!** Lagern Sie das Blut nicht nach der Zugabe zum Probenblockverdünner. Sobald die Probe zum Probenblock-verdünner hinzugefügt wurde, muss sie sofort getestet werden. Wenn unbehandeltes Blut verwendet wird (z. B. ohne die Zugabe des Probenblockverdünners), dann sind die Testergebnisse ungültig. Lagern Sie das Blut nicht in den Blutentnahmekapillaren.

**Entnahme von venösem Blut, Plasma oder Serum:** 1. Verwenden Sie Standard-Laborverfahren für die Entnahme von venösem, heparinisiertem Blut. 2. Falls gewünscht, zentrifugieren Sie mittels Standard-Laborverfahren Blut, um Plasma von Blutzellen zu trennen. Das korrekte Volumen, das zum Probenblockverdünner (fliederfarbener Deckel) hinzugegeben wird, liegt bei 20 µl für Blut und 8 µl für Plasma oder Serum. Um das notwendige Volumen hinzuzufügen, sollten Labor-pipetten verwendet werden. Schließen Sie das Probenblockverdünner-Röhrchen und mischen Sie vorsichtig oder vortexen kurz.

**Zugabe der Probe:** 1. Benutzen Sie Handschuhe während der Durchführung des Tests. Der Test muss auf einer ebenen Oberfläche durchgeführt werden. 2. Öffnen Sie das Probenblockverdünner-Röhrchen mit hinzugefügter Probe (fliederfarbener Deckel) und ziehen Sie dessen Inhalt vollständig mit der Spritze auf. Achten Sie darauf, dass sich keine großen Luftblasen bilden. Stecken Sie die Spritze fest in den Fluid-Port der Testkassette und injizieren Sie den gesamten Inhalt der Spritze, indem Sie den Spritzenkolben herunterdrücken. **Inkubation: 8 Minuten.**

**Hinweis!** Ein geringer Rücklauf des Proben-Mixes beeinflusst die Testergebnisse nicht, sofern der gesamte Membranstreifen zuvor mit dem Proben-Mix benetzt wurde.

**Primäre Antikörperinkubation:** 1. Öffnen Sie das erste Röhrchen mit Waschlösung (blauer Deckel), entnehmen Sie die Lösung vollständig und injizieren Sie sie wie oben beschrieben. 2. Öffnen Sie das Röhrchen mit der Antikörperlösung 1A (weißer Deckel, durchsichtiges Röhrchen), entnehmen Sie die Lösung vollständig und injizieren Sie sie wie oben beschrieben. **Inkubation: 8 Minuten.**

**Sekundäre Antikörperinkubation:** 1. Öffnen Sie das zweite Röhrchen mit Waschlösung (blauer Deckel), entnehmen Sie die Lösung vollständig und injizieren Sie sie wie oben beschrieben. 2. Öffnen Sie das Röhrchen mit der Antikörperlösung 2 (gelber Deckel), entnehmen Sie die Lösung vollständig und injizieren Sie sie wie oben beschrieben. **Inkubation: 8 Minuten**

**Zugabe des Farbreagens:** 1. Öffnen Sie das dritte Röhrchen mit Waschlösung (blauer Deckel), entnehmen Sie die Lösung vollständig und injizieren Sie sie wie oben beschrieben. 2. Öffnen Sie beide Farbreagenz-Röhrchen (braune Röhrchen, weiße Deckel), entnehmen und injizieren Sie den gesamten Inhalt des ersten Röhrchens wie oben beschrieben. Starten Sie die Stopp-Uhr. **Innerhalb von 30 Sekunden:** Entnehmen und injizieren Sie den gesamten Inhalt des zweiten Farbreagenz-Röhrchens (braunes Röhrchen, weißer Deckel) wie oben beschrieben. **Inkubation: 5 Minuten** (Gesamt-Inkubationszeit von beiden Schritten).

**Abstoppen der Reaktion:** Öffnen Sie das Stopp-Puffer-Röhrchen (grüner Deckel), entnehmen Sie die Flüssigkeit vollständig und injizieren Sie sie wie oben beschrieben.

TESTDURCHFÜHRUNG MIT ZWEI ODER MEHR PARALLEL DURCHGEFÜHRTEN TESTS

Erfahrene Anwender von AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA Tests können mehr als einen Test parallel durchführen. Es wird empfohlen, die Tests in Abständen von mindestens 1 Minute oder einem Vielfachen zu starten, um die korrekte Handhabung während der Entwicklungsschritte zu gewährleisten. Es wird nicht empfohlen, mehr als fünf Tests parallel durchzuführen.

INTERNE KONTROLLEN

Jede Testreihe enthält prozedurale Kontrollen (Negativ- (NC) und Funktionskontrollen (FC)). Die FC-Signale erscheinen nach der Durchführung des Tests als farbige Bänder. Die erste und die vierte Testreihe enthalten Standards oder Cut-Off-Kalibrator, die für die quantitative und qualitative Auswertung der Testergebnisse verwendet werden. Standard 1 auf der ersten Testreihe gilt gleichzeitig als der Cut-Off-Kalibrator, der für die qualitative Auswertung des Tests benötigt wird. **Testreihen 1 und 4 (quantitative Auswertung):** wenn Standards oder FC fehlen oder NC ≥ Standard 1 ist, ist das Ergebnis für den gesamten Test ungültig und er muss mit einem neuen Testsatz wiederholt werden. **Testreihe 1 (qualitative Auswertung):** wenn Cut-Off-Kalibrator oder FC fehlen oder NC ≥ Cut-Off-Kalibrator ist, ist das Ergebnis für den gesamten Test ungültig. **Testreihen 2 und 3 (quantitative und qualitative Auswertung):** wenn FC fehlt oder NC ≥ Standard 1 / ≥ Cut-Off-Kalibrator ist, sind die Ergebnisse für die betroffene Testreihe (Testreihe 2 oder 3) ungültig und der Test muss mit einem neuen Testsatz wiederholt werden.

LESEN DER TESTERGEBNISSE

**Qualitative Auswertung:** Um die Ergebnisse zu bewerten, legen Sie die Testkassette so, dass der Fluid-Port nach links zeigt. In dieser Ausrichtung sind die Namen der Antigene unter den entsprechenden Testbereichen positioniert. Die Testergebnisse müssen bei guten Lichtverhältnissen ausgelesen werden. Vermeiden Sie Schattenwurf beim Auslesen der Testsignale. Lesen Sie die Testergebnisse von links oben in der ersten Testreihe (Gesamt-IgA) und dann von links nach rechts in der zweiten und dritten Testreihe ab. Diese Reihenfolge entspricht der auf dem Auswertebogen. Um die Ergebnisse qualitativ zu bewerten, wird die Signalintensität des Cut-Off-Kalibrators (Standard 1) in der ersten Testreihe (mit Pfeil auf dem Oberseitenetikett der Testkassette angezeigt) mit den Intensitäten der einzelnen Antigene verglichen (visueller Mittelwert der dreifachen Bestimmung). Besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Signalintensitäten eines Antigens innerhalb eines Triplikats, sollten zwei Signale mit den ähnlichsten Signalintensitäten für die visuelle Auswertung ausgewählt werden (☐☐☐ - das schwächere Signal nicht berücksichtigen; ☐☐☐☐ - das stärkere Signal nicht berücksichtigen). Alle Ergebnisse werden auf dem beiliegenden Auswertebogen notiert.

Mögliche Auswertungsergebnisse (Qualitative Auswertung)

|             |                                                                                      |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| negativ     | Signal-Intensität ist schwächer als der Cut-Off-Kalibrator (Standard 1)              |
| grenzwertig | Signal-Intensität ist ungefähr gleich stark wie der Cut-Off-Kalibrator (Standards 1) |
| positiv     | Signal-Intensität ist höher als der Cut-Off-Kalibrator (Standard 1)                  |

Quantitative Auswertung

Bei Verwendung eines getrennt zu erwerbenden Readers können die Ergebnisse quantitativ ausgewertet werden. Legen Sie die Testkassette in das Lesefach des Readers und lesen Sie die Ergebnisse mit Hilfe der mitgelieferten Software und der entsprechenden Regelkarte aus. Beachten Sie die Hinweise im dazugehörigen Handbuch. Eine quantitative Auswertung erfolgt automatisch anhand einer Regressionsanalyse, bei der die Grauwerte von fünf Standards (Standards 0-4) gegen die Konzentration in U/ml (arbiträre Einheiten) abgeglichen werden. Für die Testanalyse wird eine in die Regelkarte integrierte 4-Parameter-Logistische Funktion verwendet. Die Ergebnisse für die einzelnen Antigene werden in U/ml angezeigt.

Mögliche Auswertungsergebnisse (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                                       |

\* Siehe Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“

**Hinweise!** 1. Achten Sie darauf, nur Auswertebögen zu verwenden, die dem dazugehörigen AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA Kit entnommen wurden. 2. Das Auslesen der Ergebnisse sollte direkt nach der Testdurchführung vorgenommen werden, so können Verwechslungen mit anderen Testergebnissen vermieden werden. Sofern die Testkassette im Dunkeln gelagert wird, bleiben die Testergebnisse für mindestens 24 Stunden stabil.

Die Hintergrundfarbe der Ergebnisse in den Testbereichen kann sich mit der Zeit verändern. Falls sich kleine Luftbläschen in der Testkassette entwickelt haben sollten, können Sie diese entfernen, indem Sie vorsichtig mit Hilfe der Spritze etwas Luft injizieren. 3. Wenn die Standardbänder oder der Cut-Off-Kalibrator nicht sichtbar sind, so sind die Testergebnisse ungültig.

**Analytische Sensitivität:** Die analytische Sensitivität wurde durch mehrfache Analyse von Leerwert- und schwach positiven Proben und anschließender Berechnung des LoB (engl. Limit of Blank) bzw. des LoD (engl. Limit of Detection) bewertet. Die folgenden Werte wurden für alle Antigene ermittelt: LoB = 0,24 U/ml; LoD = 0,87 U/ml.

**Analytische Spezifität:** AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA weist spezifische IgA Antikörper nach. Folgende Blutbestandteilen haben keinen Einfluss auf die Testergebnisse: Triglyceride (2000 mg/dL), Hämolytat (500 mg/dL), Bilirubin (40 mg/dL) und IgG (4500 mg/dL). Kreuzreaktivitäten mit anderen Immunglobulin-Spezies sind nicht bekannt.

**Grenzen des Untersuchungsverfahrens:** Klinisch relevante interferierende Substanzen oder Einschränkungen sind nicht bekannt. Verschleppungseffekte sind nicht bekannt. Ungeeignete Primärproben: Koaguliertes Blut. Beeinflussende Faktoren/Umstände und Vorsichts-maßnahmen: siehe Abschnitte "Probenmaterial", "Testdurchführung" und "Lesen der Testergebnisse".

**Relative Sensitivität/Spezifität:** Die Testergebnisse von AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA sind im Vergleich zum CE-markierten AESKUBLOTS® Gluten Related Disorders IgA Laborsystem (Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG) bewertet worden. Der Vergleich hat folgende Werte der relativen Sensitivität/ Spezifität in Prozent ergeben: mTG neo 100/90, TG3 100/100, tTG 67/100, tTG neo 100/100, mTG -\*/100, Frazer-Fraction 75/95, Gladin 73/100, DGP 93/93.

\* Bisherige Studien haben gezeigt, dass die Blutproben, die Antikörper gegen mTG enthalten, sehr selten sind. Dies konnte für den AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA bestätigt werden. Aus diesem Grund kann die relative Sensitivität für dieses Antigen nicht ordnungsgemäß ermittelt werden.

**Referenzbereiche:** Aufgrund des Mangels an internationalen Referenzstandards ist das quantitative Messsystem in arbiträren Einheiten (U/ml) kalibriert. Die Schwellenwerte für positive Ergebnisse von sIgA sind im Abschnitt "Lesen der Testergebnisse" aufgeführt.

**Inter-Assay-Präzision:** Um die Inter-Assay-Präzision zu bestimmen, haben fünf Personen je drei Tests mit einem Kontrollserum durchgeführt (n = 15). Für jedes Antigen wurden die Mittelwerte berechnet.

\* Die Ergebnisse sind in der unteren Tabelle zusammengefasst. Für die Inter-Assay-Präzision aller Antigene wird eine Dezimalstufendifferenz von ≤ 1,0 zwischen den Assays akzeptiert.

| Antigen    | Anzahl Messungen | Mittelwert (Dezimalstufe) | Interassay-Dezimalstufen-Differenz (max vs. min) | Auswertung |
|------------|------------------|---------------------------|--------------------------------------------------|------------|
| gesamt IgA | 15               | 3,2                       | 0,4                                              | positiv    |
| mTG neo    | 15               | 2,6                       | 0,2                                              | positiv    |
| TG3        | 15               | 0,0                       | 0,1                                              | negativ    |
| tTG        | 15               | 2,5                       | 0,4                                              | positiv    |
| tTG neo    | 15               | 2,8                       | 0,3                                              | positiv    |
| mTG        | 15               | 0,0                       | 0,0                                              | negativ    |
| Frazer's F | 15               | 2,8                       | 0,4                                              | positiv    |
| Gladin     | 15               | 2,4                       | 0,2                                              | positiv    |
| DGP        | 15               | 2,0                       | 0,2                                              | positiv    |

\* Für die statistische Datenanalyse wurden die Daten, die in U/ml ermittelt wurden, in Dezimalstufen von 0 bis 3,5 eingeteilt. Im Allgemeinen entsprechen Dezimalstufen ≤ 0,99 Werten < 12,00 U/ml, Dezimalstufen ≥ 1,00 und ≤ 1,99 Werten 12,00 - 29,99 U/ml, Dezimalstufen ≥ 2,00 und ≤ 2,99 Werten 30,00 - 199,99 U/ml und Dezimalstufen ≥ 3,00 und ≤ 3,50 Werten 200,00 - 300,00 U/ml.

**Chargen-Reproduzierbarkeit:** Um die Chargen-Reproduzierbarkeit zu bestimmen, wurden mit Kontrollseren Testreihen mit drei Chargen durchgeführt. Die Chargen-Reproduzierbarkeit lag bei 96 %.

**Linearität:** Für ausgewählte Kontrollseren konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Verdünnung und Antikörperkonzentration ermittelt werden. Korrelationskoeffizient R<sup>2</sup>: > 0,95 (90% aller positiven Antigene), > 0,94 (100% aller positiven Antigene). Aufgrund der Heterogenität humaner Antikörper ist jedoch nicht auszuschließen, dass einzelne Seren ein nicht lineares Verhalten zeigen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Es ist gute Laborpraxis, die Lot-Nummern aller verwendeten Komponenten zu dokumentieren.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

In der Diagnostik von glutenbedingten Störungen ist es nicht üblich, Messergebnisse von sIgA Messergebnisse im Rahmen streng definierter Grenzen zu interpretieren. Mit einer zunehmenden Konzentration von sIgA wird eine direkte Korrelation mit Symptomen wahrscheinlicher. Eine Signalintensität ≥ 30,0 U/ml entspricht einem mittleren oder hohen sIgA-Level. **Hinweis!** Um eine Ernährungsempfehlung zu erstellen oder die Diagnose einer GRD zu unterstützen, müssen die Testergebnisse immer zusammen mit Anamnese und den auftretenden Symptomen bewertet werden. Gluten bedingte Störungen sind durch Gluten ausgelöste systemische Störungen, dazu zählen Zöliakie (CD), nicht-zöliakale Glutenempfindlich-keit (NCGS), Dermatitis herpetiformis (DH) und Weizenallergie.

CD ist eine Erkrankung des Dünndarms mit chronischem Verlauf. Bei den erkrankten Personen führt die Aufnahme von Gluten mit der Nahrung zu einer T-Zell-vermittelten immunologischen Reaktion.

Antikörper gegen Gladin, tTG und DGP korrelieren mit der Aktivität der Erkrankung und sind daher für das Fachpersonal nützlich, um die Diagnose zu unterstützen. Anti-Gladin-Antikörper können auch bei einer Gruppe von gesunden Personen gefunden werden.

Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass gegen Gladin gerichtete Antikörper von CD-Patienten eine sehr begrenzte Anzahl von spezifischen Epitopen auf dem Gladin-Molekül binden. Durch die Selektive Deamidierung von Gladin durch die Gewebstransglutaminase wird die Bindung der anti-Gladin Antikörper verstärkt. Daher weisen Testsysteme, die deamidierte (DGP) und definierte Peptide verwenden, eine höhere diagnostische Genauigkeit im Vergleich zu bisherigen anti-Gladin-Tests auf.

mTG zeigt eine erhebliche funktionelle Ähnlichkeit mit tTG im Prozess der selektiven Deamidierung von Proteinen. Durch die Quervernetzung von tTG oder mTG mit Gladin-spezifischen Peptiden wird die Bindung von Neo-Epitopen mit tTG bzw. mTG induziert. Da die Neo-Epitope den physiologischen Epitopen strukturell ähnlicher sind als bisher verwendete Antigene, können diese Antigene eine signifikante Steigerung der Sensitivität und Spezifität des Testes erzielen. Weiterhin können mTG neo-epitope in weiteren glutenbedingten Störungen gefunden werden, wie der NCGS.

Frazer-Fraktion (auch als PT-Gladin bekannt) ist ein peptisch-tryptischer Verdau des Gladins, der die spezifischen Eigenschaften des Gladins beibehält und einer Fraktion entspricht, die nach der Verdauung im Magen das Duodenum erreicht. Die Vermutung ist, dass ein natürlich vorkommendes Gemisch aus Gladin-Peptiden die Sensitivität und Spezifität der im Test detektierten anti-Gladin Antikörper deutlich erhöht.

DH ist eine chronische, blasenbildende Hauterkrankung, die mit starkem Juckreiz assoziiert ist. DH-Patienten weisen Antikörper gegen TG3 auf. Darüber hinaus können granuläre IgA-Ablagerungen unter der Haut nachgewiesen werden. Bei allen Patienten mit DH wird in der Regel auch CD als Begleiterkrankung diagnostiziert. Daher ist der serologische Nachweis von Antikörpern gegen spezifische Biomarker von CD (Gladin, Frazer-Fraktion, tTG, Neo-Epitope von tTG und DGP) in Kombination mit der Analyse der Sensibilität zu TG3 ein hilfreiches Werkzeug zur Unterstützung der Diagnose von DH.

Der Testparameter "Gesamt-IgA" dient zur Erkennung eines möglichen IgA-Mangels. Etwa 2% - 5% der Zöliakie-Patienten weisen einen IgA-Mangel auf und damit auch bei aktiver Erkrankung negative IgA-Autoantikörpertests (Signal-Intensität des Gesamt-IgA < 18 U/ml, wenn der Test quantitativ ausgewertet wird, oder schwächer als der Cut-off-Kalibrator, wenn der Test qualitativ ausgewertet wird). Bei erwiesenem IgA-Mangel wird die Untersuchung auf IgG-Antikörper gegen GRD-Antigene empfohlen.

ENTSORGUNG

Vorsichtsmaßnahmen für den Umgang mit menschlichem Blut und der sicheren Entsorgung von gebrauchten Teilen (mit Blut) müssen eingehalten werden. Bitte lesen Sie alle lokalen/internationalen Richtlinien für die Handhabung von biogefährlichem Abfall. Die restlichen Bestandteile können ggf. als nicht biologisch angesehen und entsprechend entsorgt werden.

WEITERE GRENZEN

1. Eine endgültige klinische Diagnose sollte nicht nur auf den Ergebnissen eines einzelnen diagnostischen Verfahrens beruhen, sondern unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde erstellt werden. Der in-vitro-Nachweis von spezifischem IgA sollte immer durch eine sorgfältige Anamnese und Analyse von verschiedenen Symptomen begleitet werden. 2. Gelegentlich können negative in-vitro-Ergebnisse auch bei Patienten mit GRD Symptomen auftreten, die eindeutig mit einer glutenhaltigen Diät korrelieren. 3. Patienten mit klinischen Symptomen einer glutenbedingten Störung, aber mit einem negativen Ergebnis oder einer niedrigen sIgA-Konzentration sollten für eine weitere Untersuchung zu einem Spezialisten überwiesen werden. 4. Auch Proben offensichtlich gesunder Personen können Autoantikörper aufweisen, die für glutenbedingte Störungen spezifisch sind. 5. Unter einer glutenfreien Diät sinken die spezifischen Antikörper für eine glutenbedingte Erkrankung deutlich ab, bis diese nicht mehr nachgewiesen werden können. 6. Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn der Test entsprechend den prozeduralen Anweisungen und unter Einhaltung guter Laborpraxis durchgeführt wird.

ERWARTETE WERTE

Um die erwarteten Werte zu untersuchen, wurden zufällig ausgewählte Spender auf die einzelnen GRD-Antigene getestet.

| Antigen    | Anzahl Messungen | Median [U/ml] | Mittelwert [U/ml] | Standardabweichung [U/ml] |
|------------|------------------|---------------|-------------------|---------------------------|
| mTG neo    | 60               | 0,00          | 0,38              | 1,10                      |
| TG3        | 60               | 0,33          | 3,22              | 9,75                      |
| tTG        | 60               | 0,00          | 0,60              | 1,17                      |
| tTG neo    | 60               | 0,00          | 0,26              | 0,84                      |
| mTG        | 60               | 0,00          | 1,23              | 4,87                      |
| Frazer's F | 60               | 0,00          | 0,48              | 1,12                      |
| Gladin     | 60               | 0,00          | 0,41              | 1,08                      |
| DGP        | 60               | 0,04          | 1,22              | 4,07                      |

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Bereich von Normalwerten festlegt.

In der Regel liegen die erwarteten Werte für offensichtlich gesunde Personen (Kinder, Männer und Frauen) bei Raumtemperatur (18-30°C) für alle GRD-Antigene des Tests bei < 18 U/ml. Die Schwellenwerte für positive Ergebnisse von sIgA sind im Abschnitt "Lesen der Testergebnisse" aufgeführt.

GARANTIE

Die hier vorgestellten Leistungsdaten wurden mit dem beschriebenen Verfahren durchgeführt. Jede Änderung oder Modifikation des Verfahrens, die hier nicht empfohlen wurde, kann die Ergebnisse beeinflussen, wodurch die Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG jedwede Garantien oder Gewährleistungen der Marktgängigkeit und Eignung für den Einsatz ablehnt. Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG und seine autorisierten Distributoren sind in einem solchen Fall nicht für mittelbare oder Folgeschäden haftbar.

REFERENZEN

1. Elli L, et al. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. World J Gastroenterol. (2015) 21(23):7110-7119. 2. Caio G, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. BMC Med. (2019) 17(1):142. 3. Frazer AC, et al. Gluten-induced enteropathy: the effect of partially digested gluten. Lancet (1959) 2(7097):252-255. 4. Lerner A, et al. Antibodies against neo-epitope tTG complexed to gliadin are different and more reliable than anti-tTG for the diagnosis of pediatric celiac disease. J Immunol Methods (2016) 429:15-20. 5. Lerner A, et al. Transglutaminases in dysbiosis as potential environmental drivers of autoimmunity. Front Microbiol. (2017) 8:66. 6. Lerner A und Matthias T. Possible association between celiac disease and bacterial transglutaminase in food processing: a hypothesis. Nutr Rev. (2015) 73(8):544–552. 7. Lytton SD, et al. Neo-epitope tissue transglutaminase autoantibodies as a biomarker of the gluten sensitive skin disease-dermatitis herpetiformis. Clin Chim Acta. (2013) 415:346-9. 8. Matthias T, et al. The industrial food additive microbial transglutaminase, mimics the tissue transglutaminase and is immunogenic in celiac disease patients. Autoimmun Rev. (2016) 15(12):1111-1119. 9. Mothes T. Deamidated gliadin peptides as targets for celiac disease-specific antibodies. Adv Clin Chem. (2007) 44:35-63. 10. Prause C, et al. Antibodies against deamidated gliadin as new and accurate biomarkers of childhood coeliac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. (2009) 49(1):52-58. 11. Reunala T, et al. Dermatitis herpetiformis: A common extraintestinal manifestation of coeliac disease. Nutrients (2018) 10(5): 602. 12. Salmi TT. Dermatitis herpetiformis. Clin Exp Dermatol. (2019) 44(7):728-731. 13. Singh P. Global prevalence of celiac disease: systematic review and meta-analysis. Clin Gastroenterol Hepatol. (2018) Jun;16(6):823-836.

**Richtlinien:** CLSI GP44-A4: Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests. CLSI EP17-A2: Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures.

PATENTE/WARENZEICHEN

EU-Patent: EP 2 839 290 B1, US-Patent: US 10,571,466 B2

ADRESSE

Hergestell von Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG, Mikroforum Ring 2, 55234 Wendelsheim, Germany Tel.: +49 6734 - 9622-0, Fax: +49 6734 - 9622-2222, Web: www.aesku.com  
Zusätzliche Firmen- oder Produktinformationen können jederzeit beim Hersteller angefragt werden.

Die Gebrauchsanweisung gilt für AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA (REF: 860001).

**HISTORIE:** Aktualisierung im Abschnitt „Vorhandene Materialien“ und Abbildungen zur Blutentnahme.

INTENDED USE

AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA is a near-patient (point of care) in-vitro-immunoassay intended for the qualitative and quantitative simultaneous measurement of human specific IgA antibodies against human tissue transglutaminase (tTG), neo-epitopes of human tissue transglutaminase (tTG neo), microbial transglutaminase (mTG), neo-epitopes of microbial transglutaminase (mTG neo), deamidated gliadin-specific peptides (DGP), gliadin, peptic-tryptic digests of gliadin (Frazer's fraction), human epidermal transglutaminase (TG3) and total IgA in heparinized or Na-EDTA venous or capillary whole blood, plasma or serum. The test results, in conjunction with the patient's medical history and other findings, can be used by professionals to make a nutritional recommendation or support a diagnosis of gluten related disorders (GRD). The test should be performed by qualified personnel who are familiar with in vitro diagnostic methods.

TEST PRINCIPLE

AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA is a modified ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) system. The device contains 4 rows (test areas), where standards, controls and antigens for triplicate measurement are bound to the membrane. Specific IgA (sIgA) antibodies from the sample bind to the corresponding antigens. The bound human IgA is detected by specific anti-human-IgA antibodies. A secondary antibody coupled to alkaline phosphatase is added for signal amplification. After adding the color reagent bound IgA is identified by an indigo colored precipitate. sIgA concentrations can be determined quantitatively by using a separately available reader or qualitatively by the naked eye. The result is read out by comparing the color intensity of the antigen signal (average of triplicate measurement) against the standard signals of the first and fourth test rows (quantitative evaluation) or against the signal intensity of the cut-off calibrator in the first test row (qualitative evaluation). sIgA concentrations are expressed in arbitrary units U/ml (quantitative evaluation) or classified into three levels (qualitative evaluation).

PRECAUTIONS

**1.** For human in vitro diagnostic use only. **2.** Please read the entire contents of these Instructions for Use before performing the test. **3.** Do not use reagents beyond their expiration dates. **4.** In case of damage to the packaging please inspect the protecting bag of the device carefully for damage. Make sure the reagents are not damaged or open. In case of doubt do not use the test kit to avoid incorrect results or wrong diagnosis. **5.** It is not recommended to pool any reagents. **6.** The color reagent contains 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate and nitro-blue tetrazolium chloride. Antibody solution 1A and sample blocking dilutor contain ProClin below concentration limit (skin sensitization). Avoid contact with skin. Wear suitable gloves. For more information see Material Safety Data Sheet (available on request). **7.** All components are single use only. **8.** Test results will not be valid if these precautions are not followed. **9.** Fluid paths can be blocked by coagulated blood. **10.** Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

STORAGE

Store in a dark and cool place at 2-8°C/36-46°F. All reagents are ready-to-use, single dose and packaged in screw tubes.

EXPIRATION

The expiration date is printed on labels placed on the test packaging box. The expiration date of the kit is valid for all kit components, even if expiry of single components is different! After expiry all test components have to be discarded.

REAGENTS AND MATERIALS

**Materials provided:** Instructions for use, evaluation sheet, promo card, control certificate (CoA), 2D-barcode control chart for reader, AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA device, reagent rack containing 9 color coded vials, blood sampling pouch containing:  
-  certified material: disinfection swab, blood sampling capillary 20 µl with lithium heparin, swab, band-aid  
- safety lancet: sterile,  certified product, which is used as a lancing device for blood collection  
- syringe (fluid application)

**1.** DILB – Sample blocking dilutor, 380µl, 1x (lilac lid) **2.** WASH - Washing solution, 1ml each, 3x (blue lid) **3.** Ab1A – Antibody solution 1A, 800µl, 1x (white lid, translucent tube) (contains <1% polyclonal anti-human IgA antibody coupled to digoxigenin) **4.** Ab2 - Antibody solution 2, 800µl, 1x (yellow lid) (contains <1% mouse monoclonal anti-digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase) **5.** COLR - Color reagent, 800µl each (contains <1% 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate/nitro-blue tetrazolium chloride), 2x (white lid, brown tube) **6.** STOP - Stop buffer, 1ml, 1x (green lid). **Note:** All reagents are ready for use; store at 2-8°C until expiry date.

Human material used in the AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA device (dried material on the test strips, no infection risk) was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C.

**Additional materials required but not included in the kit:** disposable gloves, timer. For venous whole blood and/or plasma samples: normal venipuncture supplies, heparinized blood collection tubes, laboratory pipette.

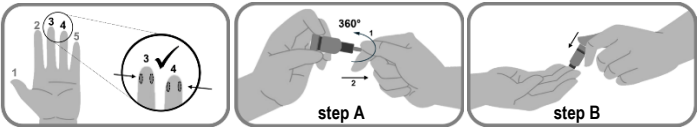
SAMPLE MATERIAL

Capillary blood from a finger prick, from earlobes or heels (in case of infants) can be used in this test. The blood sampling capillary provided in the kit should be used to collect the correct volume (20 µl). Heparinized venous blood (20 µl), plasma or serum (8 µl) may also be used as specimen for this test. In case of plasma or serum, laboratory pipettes should be used to dispense the required volume. Please follow the instructions in section "Test Procedure" to collect the sample.

TEST PROCEDURE

**Preparation:** All reagents and the assay device must be adjusted to room temperature (18-30°C) for at least 30 minutes prior to use. **1.** Open the kit and take out the device, the syringe, the reagent rack and the blood sampling pouch. Place them on a flat surface. **2.** Open and assemble the reagent rack. **3.** Label the device with the patient ID in the grey label area.

**Collection of capillary blood sample:** Open the blood sampling pouch and take out its contents: alcohol wipe, safety lancet, blood sampling capillary 20µl, gauze and band-aid. Place all items on a clean, flat surface. **1.** Massage the fingertip or put it into warm water for a few moments before puncturing so as to optimize blood flow. **2.** Clean the site to be pricked (ideally finger 3 or 4, lateral) with the alcohol wipe. **3.** Unlock the safety lancet as shown (step A) and pull off the protective cap. **4.** Place the safety lancet on the finger side to be pricked (step B) and press the button firmly. **Note!** Make sure the hand is below the heart level. If the blood flow is initially slow, gently massage the finger and check if the hand is below (!) the level of heart.



**5.** Collect the drops of blood with the tip of the blood sampling capillary. Hold the blood sampling capillary horizontal or at a slight downward angle and let the blood flow until it is properly filled. Make sure not to cover the (air) hole in the plunger. The blood stop sets the sample volume (20 µl). **CAUTION!** Make sure that you use 20 µl blood for the test, otherwise you will not get valid results. **6.** Cover the wound with the band-aid. **7.** Immediately open the sample blocking dilutor vial (lilac lid) and put the tip of the blood sampling capillary in a position just above the vial opening. Cover the hole at the end of the plunger with your finger. Gently press down the plunger to add the blood into the sample blocking dilutor vial. Close the sample blocking dilutor vial and mix gently by hand or vortex briefly.

**CAUTION! Do not store the blood after adding it to the sample blocking dilutor. Once added to the sample blocking dilutor, all samples have to be tested immediately.** If untreated blood is used (i.e. without adding whole blood to sample blocking dilutor) then the tests results will not be valid. Do not store the blood within the capillaries.

**Collection of venous blood sample, plasma sample, or serum sample:** **1.** Use standard laboratory techniques for collection of venous (heparinized) blood samples. **2.** Spin down using standard laboratory technique to separate plasma from blood cells if desired. Then open the sample blocking dilutor vial (lilac lid) and apply the correct volume of blood (20 µl), plasma or serum (8 µl), e.g. with a laboratory pipette. Close the sample blocking dilutor vial and mix gently by hand or vortex briefly.

**Adding the sample:** **1.** Gloves should be used while performing the test. The test must be performed on a flat surface. **2.** Open the sample blocking dilutor vial (lilac lid) containing the sample and completely withdraw its content with the syringe. Make sure no large air bubbles are formed inside. Place the syringe firmly on the fluid port of the assay device and inject the entire content of the syringe by pressing down the plunger. **Incubate for 8 minutes. Note!** If little backflow of the blood sample mix occurs, this does not influence the test results as long as the membrane is soaked with the blood sample mix.

**Primary antibody incubation:** **1.** Open the first wash solution vial (blue lid), withdraw the solution completely and inject as described above. **2.** Open the primary antibody vial (white lid, translucent tube), withdraw the solution completely and inject as described above. **Incubate for 8 minutes.**

**Secondary antibody incubation:** **1.** Open the second wash solution vial (blue lid), withdraw the solution completely and inject as described above. **2.** Open the secondary antibody vial (yellow lid), withdraw the solution completely and inject as described above. **Incubate for 8 minutes.**

**Color reaction:** **1.** Open the third wash solution vial (blue lid), withdraw the solution completely and inject as described above. **2.** Open the two color reagent vials (brown tubes, white lid), withdraw the solution of the first vial completely and inject as described above. Start the timer. **Within 30 sec:** Withdraw the solution of the second vial completely and inject as described above. **Incubate for 5 minutes** (total incubation time of the two steps).

**Stopping the reaction:** Open the stop buffer vial (green lid), withdraw the solution completely and inject as described above.

TEST PROCEDURE FOR TWO OR MORE PARALLEL TESTS

Experienced users of the AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA tests may perform more than one test in parallel. It is recommended to start the tests in intervals of at least 1 minute or multiples thereof to ensure proper handling during the development steps. It is not recommended to perform more than five tests in parallel.

INTERNAL CONTROLS

Each test row contains methodological controls (negative (NC) and function (FC) controls). FC signals appear as coloured bands after the test has been performed. The first and fourth test rows contain standards or cut-off calibrator that are essential for the quantitative and qualitative evaluation of the test results. Standard 1 in the first test row corresponds to the cut-off calibrator required for the qualitative evaluation of the test. **Test rows 1 and 4 (quantitative evaluation):** if standards or FC are missing or NC is ≥ standard 1, the result for the whole test device will be invalid and the test will need to be repeated using a new test kit. **Test row 1 (qualitative evaluation):** if the cut-off calibrator or FC are missing or NC is ≥ cut-off-calibrator, the result for the whole test device is invalid. **Test rows 2 and 3 (quantitative and qualitative evaluation):** if FC is missing or NC is ≥ standard 1 / ≥ cut-off calibrator, the results for the corresponding test row (test row 2 or 3) will be invalid and the test will need to be repeated using a new test kit.

ASSAY RESULT READING

**Qualitative evaluation:** To evaluate the results, position the test device with fluid port (sample inlet) pointing to the left. In this orientation the names of the antigens are positioned under the corresponding test areas. Results must be read in good light. Be cautious with shadows caused by the front label and avoid confusion with test signals. Start from the top left of the first test row (total IgA) and then read out from the left until the right end of second and third rows. This corresponds to the antigen layout in the evaluation sheet. For a qualitative evaluation of the results, compare the intensity of the cut-off calibrator (standard 1) in the first test row (shown with arrow on the upper label of the tests device) against the intensities of the individual antigens (visual average of triplicate measurement). If there is a significant difference between the signal intensities of an antigen within one triplicate, two signals with the most similar signal intensities should be selected for visual evaluation (  - ignore the weak signal;  - ignore the strong signal). Results are recorded in the corresponding evaluation sheet.

Possible assay results (qualitative evaluation)

|           |                                                                                |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|
| negative  | Signal intensity less than the cut-off calibrator (standard 1)                 |
| equivocal | Signal intensity approximately the same as the cut-off calibrator (standard 1) |
| positive  | Signal intensity greater than the cut-off calibrator (standard 1)              |

**Quantitative evaluation:** If using a separately available reader, the results can be analysed quantitatively. To do so, place the test device in the reader and read out the results using the accompanying software and corresponding control chart. Note the instructions in the corresponding manual. The quantitative evaluation is performed automatically using a regression analysis in which the raw values of five standards (standards 0-4) are fitted against the concentration in U/ml (arbitrary units). A 4-parameter logistic function integrated into the control chart is used for the test analysis. The results for each antigen are expressed in U/ml.

Possible assay results (quantitative evaluation)

| Result *      | sIgA concentration (arbitrary units, U/ml) |
|---------------|--------------------------------------------|
| negative      | < 12.00                                    |
| equivocal     | 12.00 – 17.99                              |
| low positive  | 18.00 – 29.99                              |
| positive      | 30.00 – 199.99                             |
| high positive | ≥ 200.00                                   |

\* refer to the section „Interpretation of Results“

**Note!** 1. Take care to use only the evaluation sheet that is part of the corresponding AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA kit. **2.** The reading of the test results should be done immediately after the test procedure to avoid confusion with other tests. Test results remain stable for at least 24 h if stored in the dark. The background color of the test areas might change with time. In case small air bubbles are present they may be removed by carefully inflating the device with some air using the syringe provided until the test areas are bubble free. **3.** If the standard bands or cut-off calibrator are not visible, test results are invalid.

**Analytical sensitivity** has been assessed by multiple analysis of blank and low positive samples followed by calculation of the Limit of Blank (LoB) and Limit of Detection (LoD), respectively. The following overall values have been determined for all antigens: LoB = 0.24 U/ml; LoD = 0.87 U/ml.

**Analytical specificity:** AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA detects specific IgA antibodies. No significant influences on the test results could be observed with the interfering substances: triglycerides (2000 mg/dL), hemolysate (500 mg/dL), bilirubin (40 mg/dL), and IgG (4500 mg/dL). No cross-reactivity with other immunoglobulin species is known.

**Limitations of the examination procedure:** Clinically relevant interfering substances or limitations are not known. Carry-over effects are not known. Unsuitable primary samples: coagulated blood. Affecting factors/circumstances and precautions: refer to the sections "Sample Material", "Test Procedure", and "Assay Result Reading".

**Relative sensitivity/specificity:** The test results of AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA have been evaluated in comparison to the CE marked AESKUBLOTS® Gluten Related Disorders IgA test system (Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG). The comparison showed following values of relative sensitivity/specificity in percent: mTG neo 100/90, TG3 100/100, tTG 67/100, tTG neo 100/100, mTG - \*/100, Frazer's Fraction 75/95, gliadin 73/100, DGP 93/93.

\* Previous studies have shown that the blood samples containing antibodies against mTG are quite rare. This observation has also been confirmed when using AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA. For this reason, the relative sensitivity of this antigen cannot be properly estimated.

**Reference ranges:** Due to the lack of an international reference standards, this assay is calibrated in arbitrary units (U/ml). For the threshold values used for positive result ranges of sIgA, refer to the section "Assay Result Reading".

**Inter-assay precision:** Three assays with control serum were performed by five persons to determine inter-assay precision (n = 15). The mean values were determined separately for each antigen.\* The results are summarized in the table below. A decimal level difference of ≤ 1.0 between the assays is accepted for the inter-assay precision of all antigens.

\* In statistical data analysis, the data obtained in U/ml have been categorized into decimal levels 0 – 3.5. In general, decimal levels ≤ 0.99 represent < 12.00 U/ml results, decimal levels ≥ 1.00 and ≤ 1.99 represent 12.00 – 29.99 U/ml results, decimal levels ≥ 2.00 and ≤ 2.99 represent 30.00 – 199.99 U/ml results, and decimal levels ≥ 3.00 and ≤ 3.50 represent 200.00 – 300.00 U/ml results.

| Antigen    | Number of measurements | Mean (decimal level) | Inter assay decimal level difference (max vs. min) | Analysis |
|------------|------------------------|----------------------|----------------------------------------------------|----------|
| total IgA  | 15                     | 3.2                  | 0.4                                                | positive |
| mTG neo    | 15                     | 2.6                  | 0.2                                                | positive |
| TG3        | 15                     | 0.0                  | 0.1                                                | negative |
| tTG        | 15                     | 2.5                  | 0.4                                                | positive |
| tTG neo    | 15                     | 2.8                  | 0.3                                                | positive |
| mTG        | 15                     | 0.0                  | 0.0                                                | negative |
| Frazer's F | 15                     | 2.8                  | 0.4                                                | positive |
| gliadin    | 15                     | 2.4                  | 0.2                                                | positive |
| DGP        | 15                     | 2.0                  | 0.2                                                | positive |

**Lot to Lot precision:** Assay with control sera were performed with three lots.

The Lot to Lot precision was 96%

**Linearity:** For chosen control sera, a linear correlation between dilution and antibody concentration has been shown. Correlation coefficient R<sup>2</sup> of the linear straight line: > 0.95 (90% of all positive antigens), > 0.94 (100% of all positive antigens). Due to the heterogeneity of human antibodies, it cannot be excluded that individual sera might show a non-linear behaviour.

QUALITY CONTROL

It is good laboratory practice to record lot numbers of all components used.

INTERPRETATION OF RESULTS

In the diagnostics of GRD it is not usual to consider particular values of sIgA as strictly defined limits. In general, with an increasing sIgA concentration toward GRD antigen-biomarkers, a direct correlation with symptoms is more probable. Signal intensities ≥ 30.0 U/ml correspond to a moderate or high sIgA level. **Note!** In order to make a nutritional recommendation or support a diagnosis of GRD, the test results must always be evaluated together with the medical history and any symptoms that occur.

GRDs are disorders caused by gluten, which include celiac disease (CD), non-celiac gluten sensitivity (NCGS), dermatitis herpetiformis (DH) and wheat allergy.

CD is a disorder of the small intestine with a chronic course. In affected individuals, the intake of gluten with food leads to a T-cell mediated immunological reaction.

Antibodies against gliadin, tTG and DGP correlate with the activity of the disease and thus are useful for professionals to support a diagnosis. Anti-gliadin antibodies may also be found in a group of healthy individuals.

Recent studies have shown that antibodies directed against gliadin of CD patients bind a very limited number of specific epitopes on the gliadin molecule. Selective deamidation of gliadin by tissue transglutaminase results in enhanced binding by anti-gliadin antibodies.

Assays using deamidated (DGP) and defined peptides have been shown to have higher diagnostic accuracy for CD when compared to standard anti-gliadin assays.

mTG shows substantial functional similarity with tTG in the process of selective deamidation of proteins. The cross-link of tTG or mTG with gliadin-specific peptides results in neo-epitopes of tTG and mTG, respectively.

As these neo-epitopes are structurally closer to the physiological antigens, they show a markedly increased sensitivity and specificity. Furthermore, mTG neo-epitopes biomarkers may provide evidence not only for the early stages of CD but also for NCGS.

Frazer's fraction (also known as PT-gliadin) represents a peptic-tryptic digests of the gliadin, which retains the reactive properties of gliadin and mimic the fraction that reaches the duodenum after gastric digestion. The assumption is that a naturally occurring mixture of gliadin peptides significantly increases the sensitivity and specificity of anti-gliadin antibodies.

DH is a chronic, blistering skin disease associated with severe itching. DH patients possess antibodies against TG3. Additionally, granular IgA deposits can be detected under the skin. For all patients with DH, CD can usually be diagnosed as a comorbid condition. Therefore, the serological detection of the antibodies against specific biomarkers of CD (gliadin, Frazer's fraction, tTG, neo-epitopes of tTG and DGP) in combination with analysis of the sensitivity towards TG3 is a useful tool to support the diagnosis of DH.

The "total IgA" test parameter is used for the detection of possible IgA deficiency. Approximately 2% - 5% of CD patients display an IgA deficiency and thus negative IgA autoantibody tests (signal intensity of total IgA < 18 U/ml when the AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA test is evaluated quantitatively or lower than the cut-off calibrator when the test is evaluated qualitatively), even when the disease is active. The determination of specific IgG antibodies against GRD antigen-biomarkers is recommended for patients with confirmed IgA deficiency.

DISPOSAL

Precautions for the handling of human blood and safe waste disposal of used parts (containing blood) must be observed. Please refer to all local/national guidelines for biohazard handling. The rest of the kit may not be considered biohazard and can be disposed accordingly.

FURTHER LIMITATIONS

**1.** A final clinical diagnosis of GRD should not be based on the results of any single diagnostic method, but must only be made after all clinical and laboratory findings have been evaluated. In vitro evidence of sIgA against GRD antigen-biomarkers should always be accompanied by full medical history and analysis of any symptoms. **2.** Negative in vitro results may occasionally occur in patients with GRD symptoms that clearly correlate with gluten-containing diet. **3.** Patients with clinical symptoms suggestive of GRD but a negative result or low sIgA concentration should be referred to a specialist for further investigation. **4.** Samples from apparently healthy individuals may also contain autoantibodies specific for GRDs. **5.** It should be noted that under a gluten-free diet, specific antibodies against GRD antigen-biomarkers decrease significantly until they are no longer detectable. **6.** Reliable and reproducible results will be obtained when the assay is performed according to the procedural instructions and when following good laboratory practices.

EXPECTED VALUES

To investigate the expected range, randomly selected donors have been tested on each of the GRD antigen-biomarkers.

| Antigen    | Number of measurements | Median [U/ml] | Mean [U/ml] | Standard Deviation [U/ml] |
|------------|------------------------|---------------|-------------|---------------------------|
| mTG neo    | 60                     | 0.00          | 0.38        | 1.10                      |
| TG3        | 60                     | 0.33          | 3.22        | 9.75                      |
| tTG        | 60                     | 0.00          | 0.60        | 1.17                      |
| tTG neo    | 60                     | 0.00          | 0.26        | 0.84                      |
| mTG        | 60                     | 0.00          | 1.23        | 4.87                      |
| Frazer's F | 60                     | 0.00          | 0.48        | 1.12                      |
| gliadin    | 60                     | 0.00          | 0.41        | 1.08                      |
| DGP        | 60                     | 0.04          | 1.22        | 4.07                      |

It is recommended that each laboratory establishes its own range of normal values.

In general, the expected values for apparently healthy individuals (children, men, and women) are < 18 U/ml at room temperature (18-30°C) for all GRD antigens of the test. For the threshold values of the positive result ranges of sIgA, refer to the section "Assay Result Reading".

WARRANTY

The performance data presented here was obtained using the procedure indicated. Any change or modification to the procedure not recommended here may affect the results, in which case Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG disclaims all warranties expressed, implied or statutory, including the implied warranty of merchantability and fitness for use. Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG and its authorized distributors, in such event, shall not be liable for damages indirect or consequential.

REFERENCES

**1.** Elli L, et al. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. World J Gastroenterol. (2015) 21(23):7110-7119. **2.** Caio G, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. BMC Med. (2019) 17(1):142. **3.** Frazer AC, et al. Gluten-induced enteropathy: the effect of partially digested gluten. Lancet (1959) 2(7097):252-255. **4.** Lerner A, et al. Antibodies against neo-epitope tTg complexed to gliadin are different and more reliable then anti-tTg for the diagnosis of pediatric celiac disease. J Immunol Methods (2016) 429:15-20. **5.** Lerner A, et al. Transglutaminases in dysbiosis as potential environmental drivers of autoimmunity. Front Microbiol. (2017) 8:66. **6.** Lerner A and Matthias T. Possible association between celiac disease and bacterial transglutaminase in food processing: a hypothesis. Nutr Rev. (2015) 73(8):544–552. **7.** Lytton SD, et al. Neo-epitope tissue transglutaminase autoantibodies as a biomarker of the gluten sensitive skin disease-dermatitis herpetiformis. Clin Chim Acta. (2013) 415:346-9. **8.** Matthias T, et al. The industrial food additive microbial transglutaminase, mimics the tissue transglutaminase and is immunogenic in celiac disease patients. Autoimmun Rev. (2016) 15(12):1111-1119. **9.** Mothes T. Deamidated gliadin peptides as targets for celiac disease-specific antibodies. Adv Clin Chem. (2007) 44:35-63. **10.** Prause C, et al. Antibodies against deamidated gliadin as new and accurate biomarkers of childhood coeliac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. (2009) 49(1):52-58. **11.** Reunala T, et al. Dermatitis herpetiformis: A common extraintestinal manifestation of coeliac disease. Nutrients (2018) 10(5): 602. **12.** Salmi TT. Dermatitis herpetiformis. Clin Exp Dermatol. (2019) 44(7):728-731. **13.** Singh P. Global prevalence of celiac disease: systematic review and meta-analysis. Clin Gastroenterol Hepatol. (2018) Jun;16(6):823-836.

**Guidelines:** CLSI GP44-A4: Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests. CLSI EP17-A2: Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures.

PATENTS/TRADEMARKS

EU-Patent: EP 2 839 290 B1, US-Patent: US 10,571,466 B2

ADDRESS

Manufactured by Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG, Mikroforum Ring 2, 55234 Wendelsheim, Germany Tel: +49 6734 - 9622-0, Fax: +49 6734 - 9622-2222, Web: www.aesku.com

Additional company and product information can be requested at any time.

The instructions for use apply to AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA (REF: 860001).

**HISTORY:** Update in section "Materials provided" and illustration for collection of capillary blood sample.

|                                                                                       |                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
|  | (DE) In-vitro-Diagnostikum<br>(EN) In vitro diagnostic medical device        |
|  | (DE) Gebrauchsanweisung beachten<br>(EN) Consult instructions for use        |
|  | (DE) Artikelnummer<br>(EN) Article number                                    |
|  | (DE) Charge<br>(EN) Batch code                                               |
|  | (DE) Verwenden bis<br>(EN) Use by                                            |
|  | (DE) Ausreichend für <1> Prüfungen<br>(EN) Content sufficient for < 1 > test |
|  | (DE) Nicht wiederverwenden<br>(EN) Do not reuse                              |
|  | (DE) Temperaturbegrenzung<br>(EN) Temperature limitation                     |
|  | (DE) Achtung<br>(EN) Caution                                                 |
|  | (DE) CE-Konformitätskennzeichnung<br>(EN) CE Marking of conformity           |
|  | (DE) Hersteller<br>(EN) Manufacturer                                         |

#### USO PREVISTO

El inmunoensayo *in vitro* AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA es una prueba de análisis en proximidad al paciente (diagnóstico inmediato) diseñada para la medición cualitativa y cuantitativa simultánea de anticuerpos IgA humanos contra transglutaminasa tisular humana (tTG), neoepítotos de la transglutaminasa tisular humana (tTG neo), transglutaminasa microbiana (mTG), neoepítotos de transglutaminasa microbiana (mTG neo), péptidos de gliadina desaminados (DGP), gliadina, digerido péptico/tríptico de gliadina (fracción de Frazer), transglutaminasa epidérmica humana (TG3) e IgA total en plasma o sangre entera o venosa o capilar heparinizada o con Na-EDTA. El profesional sanitario puede utilizar los resultados de la prueba, combinados con la anamnesis del paciente y otros hallazgos para hacer recomendaciones nutricionales o respaldar un diagnóstico de trastornos relacionados con el gluten (TRG). La prueba debe realizarla personal cualificado y familiarizado con los métodos de diagnóstico *in vitro*.

#### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA es un sistema de ensayo ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática) modificado. Contiene 4 filas (áreas de prueba) en las que los estándares, controles y antígenos de medición triplicada se unen a la membrana. Los anticuerpos específicos de IgA (slgA) de la muestra se unen a los antígenos correspondientes. La IgA humana unida se detecta mediante anticuerpos contra la IgA humana específicos. Se agrega un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina a efectos de amplificación de señal. Tras agregar el reactivo de color, la IgA unida se identifica mediante un precipitado de color indigo. Las concentraciones de slgA se pueden determnar cuantitativamente (mediante un lector disponible por separado) o cualitativamente (a simple vista). La lectura del resultado se realiza comparando la intensidad de color de la señal del antígeno (promedio de la medición triplicada) con las señales estándar de la primera y la cuarta filas de prueba (evaluación cuantitativa) o con la intensidad de señal del calibrador cut-off en la primera fila de prueba (evaluación cualitativa). Las concentraciones de slgA se expresan en unidades arbitrarias U/ml (evaluación cuantitativa) o se clasifican en tres niveles (evaluación cualitativa).

#### PRECAUCIONES

1. Exclusivamente para uso en diagnóstico *in vitro*. 2. Lea el contenido completo de estas instrucciones de uso antes de realizar la prueba. 3. No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad. 4. En caso de daños en el envase, inspeccione detenidamente la bolsa de protección del dispositivo para determinar su integridad. Asegúrese de que los reactivos no están dañados ni abiertos. En caso de duda, no utilice el kit de prueba a fin de evitar resultados incorrectos o errores de diagnóstico. 5. No es recomendable combinar varios reactivos. 6. El reactivo de color contiene 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato y nitroazul de tetrazolio. La solución de anticuerpos 1A y el diluyente de bloqueo de muestra contienen ProClin por debajo del límite de concentración (sensibilización de la piel). Evite el contacto con la piel. Lleve guantes apropiados. Para obtener más información, consulte la ficha técnica de seguridad de materiales (disponible a solicitud). 7. Todos los componentes son de un solo uso. 8. Los resultados de prueba no serán válidos si no se siguen estas precauciones. 9. Las vías para el líquido pueden bloquearse debido a la sangre coagulada. 10. Cualquier incidente grave producido en relación con el dispositivo se deberá comunicar al fabricante y la autoridad competente del Estado miembro en el que el usuario o el paciente resida.

#### ALMACENAMIENTO

Almacenar en un lugar oscuro y frío a 2-8 °C/36-46 °F. Todos los reactivos están preparados para su uso y se suministran en dosis única y envasados en tubos con tapón de rosca.

#### CADUCIDAD

La fecha de caducidad va impresa en las etiquetas colocadas en la caja de envasado de la prueba. La fecha de caducidad del kit es válida para todos los componentes del kit, aunque la caducidad de los componentes específicos sea diferente. Tras su caducidad, todos los componentes de prueba se deberán desechar.

#### REACTIVOS Y MATERIALES

**Materiales suministrados:** Instrucciones de uso, ficha de evaluación, tarjeta promocional, certificado de control (CoA), diagrama de control de código de barras 2D para el lector, dispositivo AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA, gradilla de reactivos con 9 viales con código de color, bolsa de material para extracción de sangre con:

- material con certificación **CE**: toallita de desinfección, tubo capilar para muestras de sangre de 20 µl con heparina de litio, toallita, tirita
- lanceta: producto estéril con certificado **CE** que sirve como dispositivo de punción para la extracción de sangre
- jeringa (líquidos de aplicación)

1. DILB: diluyente de bloqueo de muestra, 380 µl, 1 unidad (tapa lila)
**2. WASH:** solución de lavado, 1 ml cada unidad, 3 (tapa azul)
3. Ab1A: solución de anticuerpos 1A, 800 µl, 1 unidad (tapa blanca, tubo transparente) (contiene <1 % de anticuerpos contra la IgA humana policlonal asociados a digoxigenina)
**4. Ab2:** solución de anticuerpos 2, 800 µl, 1 unidad (tapa amarilla) (contiene <1 % de anticuerpos monoclonales anti-digoxigenina murinos asociados a fosfatasa alcalina)
**5. COLR:** reactivo de color, 800 µl cada (contiene <1 % de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato y nitroazul de tetrazolio), 2 unidades (tapa blanca, tubo marrón)
**6. STOP:** tampón de parada, 1 ml, 1 unidad (tapa verde).
**Nota:** Todos los reactivos están preparados para su uso; almacenar a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad.

El material humano utilizado en el dispositivo AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA (material seco en las tiras de prueba, sin riesgo de infecciones) se sometió a prueba, con resultados negativos para VIH, hepatitis B y hepatitis C.

**Otros materiales necesarios no incluidos en el kit:** guantes desechables, temporizador. Para muestras de plasma venoso y/o sangre entera venosa: material de venipunción normal, tubos de extracción de sangre heparinizados, pipetas de laboratorio.

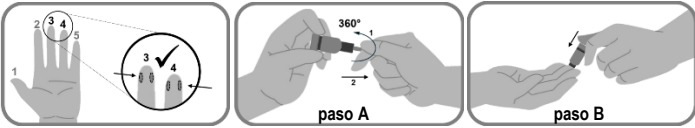
#### MATERIAL DE MUESTRA

En esta prueba se puede utilizar sangre capilar obtenida mediante punción en los dedos o en los lóbulos de la oreja o los tobillos (en caso de lactantes). El tubo capilar para muestras de sangre incluido en el kit se debe utilizar para extraer el volumen correcto (20 µl). Como muestra, también se puede utilizar sangre venosa (20 µl), plasma o suero (8 µl) heparinizado. En caso de utilizar plasma o suero, se deberán emplear pipetas de laboratorio para dispensar el volumen apropiado. Siga las instrucciones de la sección "Método analítico" para obtener la muestra.

#### MÉTODO ANALÍTICO

**Preparación:** Todos los reactivos y el dispositivo de prueba deben dejarse a temperatura ambiente (18-30 °C) durante un mínimo de 30 minutos antes de su uso. 1. Abra el kit y retire el dispositivo, la jeringa, la gradilla para reactivos y la bolsa de material para extracción de sangre. Coloque todos los componentes sobre una superficie plana. 2. Abra y monte la gradilla para reactivos. 3. Etiquete el dispositivo; para ello coloque el ID de paciente en el área de la etiqueta gris.

**Obtención de muestras de sangre capilar:** Abra la bolsa de material para extracción de sangre y extraiga su contenido: toallita de alcohol, lanceta de seguridad, tubo capilar para muestras de sangre de 20 µl, gasa y tirita. Coloque todos los elementos sobre una superficie limpia y plana. 1. Masajea la punta del dedo o colóquela en agua templada durante unos momentos antes de realizar la punción a fin de mejorar el flujo de sangre. 2. Limpie la zona en la que se va a realizar la punción (¡idealmente dedo 3 o 4, lateral) con la toallita de alcohol. 3. Desbloquee la lanceta de seguridad como se muestra (paso A) y retire la tapa de protección. 4. Coloque la lanceta de seguridad sobre el lado del dedo en el que vaya a realizar la punción (paso B) y pulse firmemente el botón. **Nota** Asegúrese de que la mano está por debajo del nivel del corazón. Si el flujo de sangre es lento inicialmente, masajee suavemente el dedo y compruebe si la mano está por debajo (!) del nivel del corazón.



5. Recoja las gotas de sangre con la punta del tubo capilar para muestras de sangre. Sujete el tubo capilar para muestras de sangre horizontal o ligeramente inclinado hacia abajo y permita que la sangre fluya hasta que se haya llenado por completo. Asegúrese de no cubrir el orificio (de aire) del émbolo. La marca indica el límite del volumen de muestra de sangre (20 µl).
**PRECAUCIÓN** Asegúrese de usar 20 µl de sangre para la prueba, de lo contrario no obtendrá resultados válidos. 6. Cubra la herida con la tirita. 7. Abra inmediatamente el vial de diluyente de bloqueo de muestra (tapa lila) y coloque la punta del tubo capilar para muestras de sangre inmediatamente encima de la abertura del vial. Cubra el orificio del extremo del émbolo con el dedo. Pulse suavemente el émbolo para agregar la sangre al vial de diluyente de bloqueo de muestra. Cierre el vial de diluyente de bloqueo de muestra y agite manualmente la solución con suavidad o mezcle con el vórtex brevemente.

**PRECAUCIÓN!** No almacene la sangre después de haberla agregado al diluyente de bloqueo de muestra. Una vez agregadas al diluyente de bloqueo de muestra, todas las muestras se deberán analizar inmediatamente. Si se utiliza sangre sin tratar (es decir, la sangre entera no se ha agregado al diluyente de bloqueo de muestra) los resultados de las pruebas no serán válidos. No almacene la sangre en los tubos capilares.

**Obtención de muestras de sangre venosa, plasma o suero:** 1. Use técnicas de laboratorio estándar para obtener muestras de sangre venosa (heparinizada). 2. Centrifugue la muestra con una técnica de laboratorio estándar para separar el plasma de las células sanguíneas si lo desea. A continuación, abra la tapa del vial del diluyente de bloqueo de muestra (tapa lila) y aplique el volumen de sangre correcto (20 µl), plasma o suero (8 µl), p. ej., con una pipeta de laboratorio. Cierre el vial de diluyente de bloqueo de muestra y agite manualmente la solución con suavidad o mezcle con el vórtex brevemente.

**Procedimiento para agregar la muestra:** 1. Se deben utilizar guantes mientras se realiza la prueba. La prueba se debe realizar sobre una superficie plana. 2. Abra el vial de diluyente de bloqueo de muestra (tapa lila) con la muestra y extraiga por completo su contenido con la jeringa. Asegúrese de que no se forman burbujas de aire grandes en el interior.

Coloque la jeringa de forma que quede fijada firmemente al puerto de líquidos del dispositivo de análisis y empuje el émbolo para inyectar todo el contenido de la jeringa.
**Incube durante 8 minutos.**
**Nota** En caso de que se produzca un pequeño reflujo en la mezcla de la muestra de sangre, no influirá en los resultados de prueba mientras la membrana esté empapada con la mezcla.

**Incubación de anticuerpos primarios:** 1. Abra el primer vial de solución de lavado (tapa azul), extraiga por completo la solución e inyecte como se indicó anteriormente. 2. Abra el vial de anticuerpos primarios (tapa blanca, tubo transparente), extraiga por completo la solución e inyecte como se indicó anteriormente.
**Incube durante 8 minutos.**

**Incubación de anticuerpos secundarios:** 1. Abra el segundo vial de solución de lavado (tapa azul), extraiga por completo la solución e inyecte como se indicó anteriormente. 2. Abra el vial de anticuerpos secundarios (tapa amarilla), extraiga por completo la solución e inyecte como se indicó anteriormente.
**Incube durante 8 minutos.**

**Color de reacción:** 1. Abra el tercer vial de solución de lavado (tapa azul), extraiga por completo la solución e inyecte como se indicó anteriormente. 2. Abra los dos viales de reactivo de color (tubos marrones, tapa blanca), extraiga por completo la solución del primer vial e inyecte como se indicó anteriormente. Inicie el temporizador.
**Después de 30 segundos:** Extraiga por completo la solución del segundo vial e inyecte como se indicó anteriormente.
**Incube durante 5 minutos** (tiempo de incubación total de los dos pasos).

**Para interrumpir la reacción:** Abra el vial del tampón de parada (tapa verde), extraiga por completo la solución e inyecte como se indicó anteriormente.

#### MÉTODO ANALÍTICO PARA DOS O MÁS PRUEBAS PARALELAS

Los usuarios que ya tengan experiencia en el uso de las pruebas AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA pueden realizar varias pruebas simultáneamente. Se recomienda iniciar las pruebas a intervalos de al menos 1 minuto (o múltiplos) para garantizar una manipulación adecuada durante los pasos de desarrollo. No se recomienda realizar más de cinco pruebas en paralelo.

#### CONTROLES INTERNOS

Cada fila de prueba contiene controles metodológicos (los controles negativo (NC) y de función (FC)). Las señales FC aparecen en forma de banda coloreada una vez completada la prueba. La primera y la cuarta filas de prueba incluyen estándares o un calibrador cut-off, elementos esenciales para las evaluaciones cuantitativa y cualitativa de los resultados de prueba. El estándar 1 de la primera fila de prueba corresponde al calibrador cut-off necesario para la evaluación cualitativa de la prueba.
**Filas de prueba 1 y 4 (evaluación cuantitativa):** si las señales de estándares o FC faltan o NC es ≥ estándar 1, el resultado de todo el dispositivo de prueba se considerará no válido y la prueba deberá repetirse con un nuevo kit de prueba.
**Fila de prueba 1 (evaluación cualitativa):** si las señales de estándares o FC faltan o NC es ≥ calibrador cut-off, el resultado de todo el dispositivo de prueba se considerará no válido.
**Filas de pruebas 2 y 3 (evaluaciones cuantitativa y cualitativa):** si la señal de FC falta o NC es ≥ estándar 1/≥ calibrador cut-off, los resultados de la fila de prueba correspondiente se considerarán no válidos y la prueba deberá repetirse con un nuevo kit de prueba..

#### LECTURA DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

**Evaluación cualitativa:** Para evaluar los resultados, coloque el dispositivo de prueba con el puerto de líquido (entrada de muestra) orientado hacia la izquierda. En esta orientación, los nombres de los antígenos se colocarán debajo de las áreas de prueba correspondientes. Los resultados se deben leer con una iluminación adecuada. Evite las zonas de sombra provocadas por la etiqueta frontal para evitar confusiones con las señales de prueba. Comience desde la parte superior izquierda de la primera fila de prueba (IgA total) y después continúe la lectura hacia fuera desde la izquierda hasta el extremo derecho de la segunda y tercera filas. Esta lectura corresponde al formato de antígeno de la ficha de evaluación. Para realizar una evaluación cualitativa de los resultados, compare la intensidad del calibrador cut-off (estándar 1) de la primera fila de prueba (mostrada con una flecha en la etiqueta superior del dispositivo de prueba) con las intensidades de cada antígeno (promedio visual de medición triplicada). Si observa diferencias significativas entre las intensidades de señal de un antígeno en un triplicado, se deberán seleccionar las señales con las intensidades más similares para evaluación visual ( - ignore la señal más débil; - ignore la señal más intensa). Los resultados se registran en la ficha de evaluación correspondiente.

#### Posibles resultados del ensayo (evaluación cualitativa)

|               |                                                                          |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------|
| negativo      | Intensidad de señal inferior a la del calibrador cut-off (estándar 1)    |
| indeterminado | Intensidad de señal muy similar a la del calibrador cut-off (estándar 1) |
| positivo      | intensidad de señal superior al calibrador cut-off (estándar 1)          |

**Evaluación cuantitativa:** Si se utiliza el lector disponible por separado, el resultados se pueden analizar cuantitativamente. Para ello, coloque el dispositivo de prueba en el lector y realice una lectura de los resultados mediante el software incluido y el diagrama de control correspondiente. Consulte las instrucciones del manual correspondiente. La evaluación cuantitativa se ejecuta automáticamente mediante un análisis de regresión en el que los valores sin procesar de cinco estándares (estándares 0-4) se ajustan de acuerdo con la concentración en U/ml (unidades arbitrarias). Una función logística de 4 parámetros integrada en el diagrama de control se utiliza para el análisis de la prueba. Los resultados de cada antígeno se expresan en U/ml.

#### Posibles resultados del ensayo (evaluación cuantitativa)

| Resultado *   | Concentración de slgA (unidades arbitrarias, U/ml) |
|---------------|----------------------------------------------------|
| negativo      | < 12,00                                            |
| indeterminado | 12,00 – 17,99                                      |
| positivo bajo | 18,00 – 29,99                                      |
| positivo      | 30,00 – 199,99                                     |
| positivo alto | ≥ 200,00                                           |

\* consulte la sección "Interpretación de los resultados"

**Nota 1.** Procure utilizar solo la ficha de evaluación suministrada con el kit AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA. 2. La lectura de los resultados de la prueba se debe realizar inmediatamente después del método analítico para evitar confusiones con las otras pruebas. La estabilidad de los resultados se mantendrá durante un mínimo de 24 h si se almacenan en un lugar oscuro. El color de fondo de las áreas de prueba podría cambiar con el paso del tiempo. En caso de que se observen burbujas de aire pequeñas, quizá se puedan eliminar inflando cuidadosamente el dispositivo con algo de aire mediante la jeringa suministrada hasta eliminarlas por completo. 3. Si las bandas de estándar o el calibrador cut-off no son visibles, los resultados de la prueba no son válidos.

La **sensibilidad analítica** se ha evaluado mediante varios análisis de muestras de blanco y positivo bajo, seguidos del cálculo del límite de blanco (LoB) y el límite de detección (LoD), respectivamente. Se han determinado los siguientes valores generales para todos los antígenos: LoB = 0,24 U/ml; LoD = 0,87 U/ml.

**Especificidad analítica:** AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA permite detectar anticuerpos IgA específicos. En los resultados de prueba no se pudieron observar influencias significativas con las sustancias interferentes: triglicéridos (2000 mg/dl), hemolizado (500 mg/dl), bilirrubina (40 mg/dl) e IgG (4500 mg/dl). No se ha observado ninguna reactividad cruzada con otras especies de inmunoglobulina.

**Limitaciones del procedimiento de examen:** No se observaron limitaciones ni sustancias interferentes clínicamente significativas. No se observaron efectos residuales. Muestras primarias no adecuadas: sangre coagulada. Factores y circunstancias que afectan a los resultados y precauciones: consulte las secciones "Material de muestra", "Método analítico" y "Lectura de los resultados del ensayo".

**Especificidad/sensibilidad relativa:** Se ha realizado una evaluación de comparación de los resultados de la prueba AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA con los de la prueba AESKUBLOTS® Gluten Related Disorders IgA con marca CE (Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG). En la comparación se obtuvieron los siguientes valores de especificidad/sensibilidad relativa: en porcentajes: mTG neo 100/90, TG3 100/100, tTG 67/100, tTG neo 100/100, mTG -\*/100, fracción de Frazer 75/95, gliadina 73/100, DGP 93/93.

\* En estudios anteriores se ha demostrado que las muestras de sangre que contienen anticuerpos contra mTG son muy poco frecuentes. Esta observación también se ha confirmado al utilizar AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA. Por este motivo, la sensibilidad relativa de este antígeno no se puede determinar adecuadamente.

**Intervalos de referencia:** Debido a la falta de estándares de referencia internacional, este ensayo se calibró en unidades arbitrarias (U/ml). Para obtener información sobre los valores de umbral utilizados para intervalos de resultado positivos de slgA, consulte la sección "Lectura de los resultados del ensayo".

**Precisión interensayo:** Cinco personas realizaron tres ensayos con suero de control durante cinco días para determinar la precisión interensayo (n = 15). Los valores medios se determinaron por separado en cada antígeno.\* Los resultados se resumen en la tabla siguiente. Una diferencia de punto decimal <1,0 entre los ensayos se acepta para la precisión interensayo de todos los antígenos.

\* En el análisis de datos estadísticos, los datos obtenidos en U/ml se han categorizado por punto decimal entre 0 y 3,5. En general, los puntos decimales ≤0,99 representan resultados <12,00 U/ml, los puntos decimales ≥1,00 y ≤1,99 representan resultados de 12,00 a 29,99 U/ml, los puntos decimales ≥2,00 y ≤2,99 representan resultados de 30,00 a 199,99 U/ml y los puntos decimales ≥3,00 y ≤3,50 representan resultados de 200,00 a 300,00 U/ml.

| Antígeno     | Número de mediciones | Media (punto decimal) | Diferencia de punto decimal interensayo (comparación entre valor máximo y mínimo) | Análisis |
|--------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------|
| IgA total    | 15                   | 3,2                   | 0,4                                                                               | positivo |
| mTG neo      | 15                   | 2,6                   | 0,2                                                                               | positivo |
| TG3          | 15                   | 0,0                   | 0,1                                                                               | negativo |
| tTG          | 15                   | 2,5                   | 0,4                                                                               | positivo |
| tTG neo      | 15                   | 2,8                   | 0,3                                                                               | positivo |
| mTG          | 15                   | 0,0                   | 0,0                                                                               | negativo |
| F. de Frazer | 15                   | 2,8                   | 0,4                                                                               | positivo |
| gliadina     | 15                   | 2,4                   | 0,2                                                                               | positivo |
| DGP          | 15                   | 2,0                   | 0,2                                                                               | positivo |

**Precisión entre lotes:** Se realizaron ensayos con sueros de control con tres lotes. La precisión entre lotes fue del 96 %

**Linealidad:** En los sueros de control elegidos, se ha demostrado una correlación lineal entre la dilución y la concentración de anticuerpos. Coeficiente de correlación R<sup>2</sup> de línea recta (lineal): >0,95 (90 % de todos los antígenos positivos), >0,94 (100% de todos los antígenos positivos). Debido a la heterogeneidad de los anticuerpos humanos, no se puede excluir que un suero específico demuestre un comportamiento no lineal.

#### CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan registrar los números de lote de todos los componentes utilizados.

#### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Durante el diagnóstico de TRG, frecuentemente se tienen en cuenta valores concretos de slgA como límites estrictamente definidos. En general, con una concentración de slgA en aumento que indica biomarcadores de antígeno de TRG, la probabilidad de correlación directa con los síntomas es mayor. Las intensidades de señal ≥30,0 U/ml corresponden a niveles de slgA moderados o altos.
**Nota!** A fin de hacer una recomendación nutricional o respaldar un diagnóstico de trastornos relacionados con el gluten (TRG), los resultados de la prueba siempre deben evaluarse en combinación con la anamnesis y cualquier síntoma que pueda producirse.

Los TRG son trastornos 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.

La EC es un trastorno del intestino delgado con evolución crónica. En los pacientes afectados, la ingesta de alimentos con gluten provoca una reacción inmunitaria mediada por linfocitos T.

Los anticuerpos contra gliadina, tTG y DGP están correlacionados con la actividad de la enfermedad y, en consecuencia, son útiles a la hora de respaldar un diagnóstico realizado por profesionales. Los anticuerpos antigliadina también se pueden encontrar en ciertos grupos de individuos sanos.

En estudios recientes se ha demostrado que los anticuerpos específicos antigliadina de pacientes con EC se unen a un número muy limitado de epítotos específicos en la molécula de gliadina. La desamidación selectiva de la gliadina por la transglutaminasa del tejido mejora la unión de los anticuerpos antigliadina. Los ensayos en los que se utilizan péptidos definidos y desaminados (DGP) son más exactos para diagnosticar la EC que los ensayos antigliadina estándar.

mTG demuestra una significativa similitud funcional con tTG en el proceso de desamidación selectiva de las proteínas. La reticulación de tTG o mTG con péptidos específicos de gliadina da como resultado neoepítotos de tTG y mTG, respectivamente. Puesto que estos neoepítotos están estructuralmente más cerca de los antígenos fisiológicos, demuestran un aumento significativo de la sensibilidad y la especificidad. Asimismo, los biomarcadores de los neoepítotos de mTG pueden proporcionar datos sobre la presencia de no solo la EC, sino también de la SGNC.

La fracción de Frazer (también llamada gliadina PT) representa un digerido péptico/tríptico de la gliadina que retiene las propiedades reactivas de la gliadina e imita la fracción que alcanza el duodeno tras la digestión gástrica. La hipótesis es que una mezcla natural de péptidos de gliadina aumenta significativamente la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos antigliadina.

La DH es una es una enfermedad cutánea ampollosa crónica asociada a un prurito pronunciado. Los pacientes con DH poseen anticuerpos contra TG3. Asimismo, se pueden detectar depósitos granulares de IgA debajo de la piel. En todos los pacientes con DH, la EC normalmente se puede diagnosticar como una comorbilidad. Por lo tanto, la detección serológica de los anticuerpos contra biomarcadores específicos de la EC (gliadina, fracción de Frazer, tTG, neoepítotos de tTG y DGP) en combinación con el análisis de la sensibilidad hacia TG3, es una herramienta útil para respaldar el diagnóstico de DH.

El parámetro de prueba "IgA total" se utiliza para la detección de una posible deficiencia de IgA. Aproximadamente el 2 % - 5 % de los pacientes que presentan una deficiencia de IgA y, en consecuencia, pruebas de autoanticuerpo IgA negativas (intensidad de señal de IgA total <18 U/ml si la prueba AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA se evalúa cuantitativamente o inferior al calibrador cut-off si se evalúa cualitativamente), incluso cuando la enfermedad está activa. La determinación de las IgG específicas contra biomarcadores de antígeno de TRG se recomienda en pacientes con deficiencia de IgA confirmada.

#### ELIMINACIÓN

Se deben tomar precauciones a la hora de manipular sangre humana y los componentes utilizados deben desecharse de forma segura (que contengan sangre). Consulte las directrices locales/nacionales sobre manipulación de residuos de riesgo biológico. El resto del kit no puede considerarse material de riesgo biológico, por lo que deberá eliminarse en consecuencia.

#### OTRAS LIMITACIONES

1. Un diagnóstico clínico final de TRG no se debe basar en los resultados de un único método de diagnóstico y solo se debe realizar una vez evaluados todos los hallazgos clínicos y de laboratorio. Los datos *in vitro* de slgA contra los biomarcadores del antígeno de TRG siempre deben ir acompañados por una anamnesis completa y el análisis de cualquier síntoma. 2. Ocasionalmente, pueden obtenerse resultados *in vitro* negativos en pacientes con síntomas de TRG que están claramente correlacionados con una dieta que contiene gluten. 3. Los pacientes con síntomas clínicos que indican TRG, pero con resultados negativos o concentración de slgA baja, se deben derivar al especialista para realizar más investigaciones. 4. Las muestras de personas aparentemente sanas también pueden incluir autoanticuerpos específicos de los TRG. 5. Cabe destacar que, en personas que siguen una dieta sin gluten, los anticuerpos específicos contra los biomarcadores del antígeno de TRG se reducen significativamente hasta que dejan de detectarse. 6. Para obtener resultados fiables y reproducibles, el ensayo se debe realizar de acuerdo con las instrucciones del procedimiento y de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.

#### VALORES ESPERADOS

Para analizar el intervalo esperado, se han realizado pruebas de detección de biomarcadores del antígeno de TRG en donantes seleccionados aleatoriamente.

| Antígeno     | Número de mediciones | Mediana [U/ml] | Media [U/ml] | Desviación estándar [U/ml] |
|--------------|----------------------|----------------|--------------|----------------------------|
| mTG neo      | 60                   | 0,00           | 0,38         | 1,10                       |
| TG3          | 60                   | 0,33           | 3,22         | 9,75                       |
| tTG          | 60                   | 0,00           | 0,60         | 1,17                       |
| tTG neo      | 60                   | 0,00           | 0,26         | 0,84                       |
| mTG          | 60                   | 0,00           | 1,23         | 4,87                       |
| F. de Frazer | 60                   | 0,00           | 0,48         | 1,12                       |
| gliadina     | 60                   | 0,00           | 0,41         | 1,08                       |
| DGP          | 60                   | 0,04           | 1,22         | 4,07                       |

Se recomienda que cada laboratorio establezca un intervalo propio de valores normales.

En general, los valores esperados para individuos aparentemente sanos (niños, hombres y mujeres) es <18 U/ml a temperatura ambiente (18-30 °C) en todos los antígenos de TRG de la prueba. Para obtener información sobre los valores de umbral utilizados para intervalos de resultado positivos de slgA, consulte la sección "Lectura de los resultados del ensayo".

#### GARANTÍA

Los datos de rendimiento proporcionados en el presente documento se obtuvieron mediante el procedimiento indicado. Cualquier cambio o modificación no recomendada del procedimiento detallado en estas instrucciones de uso podría afectar a los resultados, en cuyo caso Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG rechaza toda garantía, ya sea expresa o implícita o legal, incluidas las garantías implícitas de comercialidad e idoneidad de uso. En tal caso, Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG y sus distribuidores autorizados no se considerarán responsables por daños indirectos o consecuentes.

#### REFERENCIAS

1. Elli L, et al. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. World J Gastroenterol. (2015) 21(23):7110-7119.
**2.** Caio G, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. BMC Med. (2019) 17(1):142.
**3.** Frazer AC, et al. Gluten-induced enteropathy: the effect of partially digested gluten. Lancet (1959) 270(97):252-255.
**4.** Lerner A, et al. Antibodies against neo-epitope tTG complexed to gliadin are different and more reliable than anti-tTG for the diagnosis of pediatric celiac disease. J Immunol Methods (2016) 429:15-20.
**5.** Lerner A, et al. Transglutaminases in dysbiosis as potential environmental drivers of autoimmunity. Front Microbiol. (2017) 8:66.
**6.** Lerner A and Matthias T. Possible association between celiac disease and bacterial transglutaminase in food processing: a hypothesis. Nutr Rev. (2015) 73(8):544–552.
**7.** Lytton SD, et al. Neo-epitope tissue transglutaminase autoantibodies as a biomarker of the gluten sensitive skin disease-dermatitis herpetiformis. Clin Chim Acta. (2013) 415:346-9.
**8.** Matthias T, et al. The industrial food additive microbial transglutaminase, mimics the tissue transglutaminase and is immunogenic in celiac disease patients. Autoimmun Rev. (2016) 15(12):1111-1119.
**9.** Mothes T. Deamidated gliadin peptides as targets for celiac disease-specific antibodies. Adv Clin Chem. (2007) 44:35-63.
**10.** Prause C, et al. Antibodies against deamidated gliadin as new and accurate biomarkers of childhood coeliac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. (2009) 49(1):52-58.
**11.** Reunala T, et al. Dermatitis herpetiformis: A common extraintestinal manifestation of coeliac disease. Nutrients (2018) 10(5): 602.
**12.** Salmi TT. Dermatitis herpetiformis. Clin Exp Dermatol. (2019) 44(7):728-731.
**13.** Singh P. Global prevalence of celiac disease: systematic review and meta-analysis. Clin Gastroenterol Hepatol. (2018) Jun;16(6):823-836.

**Directrices:** CLSI GP44-A4: Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests (Procedimientos de manipulación y procesamiento de muestras de sangre para análisis de laboratorio comunes). CLSI EP17-A2: Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures (Evaluación de la capacidad de detección de los procedimientos de medición de los laboratorios clínicos).

#### PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

Patente en la UE: EP 2 839 290 B1, Patente en EE. UU.: US 10 571 466 B2

#### DIRECCIÓN

Fabricado por Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG. Mikroforum Ring 2, 55234 Wendelsheim, Alemania Tel.: +49 6734 - 9622-0, Fax: +49 6734 -

#### DESTINAZIONE D'USO

AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA è un test immunologico in vitro per uso decentrato, per la misurazione simultanea qualitativa e quantitativa degli anticorpi IgA umani specifici contro la transglutaminasi tissutale umana (tTG), i neo-epitopi della transglutaminasi tissutale umana (tTG neo), la transglutaminasi microbica (mTG), i neo-epitopi della transglutaminasi microbica (mTG neo), i peptidi specifici per la gliadina deamidata (DGP), la gliadina, la sostanza derivante dalla digestione peptica-triptica della gliadina (frazione di Frazer), la transglutaminasi epidermica umana (TG3) e le IgA totali nel sangue intero venoso o capillare eparinizzato o Na-EDTA, nel plasma o nel siero. I risultati del test, insieme all'anamnesi del paziente e ad ulteriori riscontri, possono essere utilizzati dagli operatori sanitari per definire raccomandazioni nutrizionali o corroborare un'eventuale diagnosi di disturbi correlati al glutine. Il test deve essere eseguito da personale qualificato con esperienza nei metodi diagnostici in vitro.

#### PRINCIPIO DEL TEST

AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA è un sistema ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) modificato. Il dispositivo contiene 4 finestre (zone di test) in cui gli standard, i controlli e gli antigeni per la misurazione in triplicato sono legati alla membrana. Gli anticorpi specifici IgA (sIgA) del campione si legano agli antigeni corrispondenti. Le IgA umane legate vengono rilevata dagli anticorpi specifici anti-IgA-umane. Viene quindi aggiunto un secondo anticorpo associato alla fosfatasi alcalina per amplificare il segnale. Dopo aver aggiunto il reagente colorante, le IgA legate vengono identificate per la presenza di un precipitato color indaco. La concentrazione delle sIgA si può misurare quantitativamente con un lettore separato oppure qualitativamente a occhio nudo. Per leggere il risultato si confronta l'intensità cromatica del segnale dell'antigene (media della misurazione in triplicato) con i segnali degli standard nella prima e nella quarta finestra di test (valutazione quantitativa) o con l'intensità del segnale del calibratore cut-off nella prima finestra di test (valutazione qualitativa). Le concentrazioni di sIgA sono espresse in unità arbitrarie U/ml (valutazione quantitativa) o classificate in tre livelli (valutazione qualitativa).

#### PRECAUZIONI

**1.** Il kit è destinato esclusivamente alla diagnostica in vitro per uso umano. **2.** Leggere interamente le istruzioni per l'uso prima di eseguire il test. **3.** Non utilizzare i reagenti oltre le date di scadenza. **4.** Qualora la confezione fosse danneggiata, ispezionare attentamente l'involucro protettivo del dispositivo per verificarne l'integrità. Controllare che i reagenti non siano danneggiati o aperti. In caso di dubbio, per evitare di incorrere in risultati inesatti o diagnosi errate, non utilizzare il kit. **5.** Non è consigliato combinare i reagenti. **6.** Il reagente colorante contiene 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato e nitro-blu tetrazolico (DGP). La soluzione anticorpale 1A e il diluente bloccante del campione contengono ProClin al di sotto dei limiti di concentrazione (sensibilizzazione cutanea). Evitare il contatto diretto con la pelle. Indossare guanti protettivi. Per ulteriori informazioni consultare la scheda di dati di sicurezza (disponibile a richiesta). **7.** Tutti i componenti sono monouso. **8.** Per garantire la validità dei risultati è necessario attenersi alle precauzioni indicate. **9.** Il sangue coagulato può bloccare i percorsi dei fluidi. **10.** Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utilizzatore e/o il paziente.

#### CONSERVAZIONE

Conservare al buio e al fresco, a una temperatura di 2-8 °C/36-46 °F. Tutti i reagenti sono pronti all'uso, monouso e confezionati in provette filettate.

#### SCADENZA

La data di scadenza è stampata sulle etichette applicate alla scatola dei test. La data di scadenza è comune a tutti i componenti del kit, anche se la data di scadenza dei singoli componenti è diversa. Dopo la scadenza è necessario smaltire tutti i componenti del test.

#### REAGENTI E MATERIALI

**Materiali forniti:** istruzioni per l'uso, scheda di valutazione, scheda promozionale, certificato di controllo (CoA), scheda di controllo con codice a barre 2D per il lettore, dispositivo AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA per i disturbi correlati al glutine, rack porta reagenti contenente 9 provette codificate per colore, busta per il prelievo del campione ematico contenente:

- materiale certificato **CE**: tampone disinfettante, capillare di prelievo da 20 µl con eparina di litio, tampone, cerotto  
- lancetta: prodotto sterile, certificato **CE**, che funge da pungidito per il prelievo di sangue  
- siringa (applicazione di liquidi)

**1.** DILB – Diluente bloccante del campione, 380 µl, 1 (tappo viola) **2.** WASH - Soluzione di lavaggio, 1 ml ognuna, 3 unità, (tappo blu) **3.** Ab1A – Soluzione anticorpale 1A, 800 µl, 1 unità (tappo bianco, provetta semitrasparente) (contiene < 1% di anticorpo policlonale IgA anti-umane associato a digossigenina) **4.** Ab2 - Soluzione anticorpale 2, 800 µl, 1 (tappo giallo) (contiene < 1% anticorpo monoclonale murino anti-digossigenina associato con fosfatasi alcalina) **5.** COLR - Reagente colorante, 800 µl ognuna (contiene < 1% di 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato/nitro-blu tetrazolico cloruro.), 2 unità, (tappo bianco, provetta marrone) **6.** STOP - Tampone di arresto, 1 ml, 1 unità (tappo verde). **Nota:** Tutti i reagenti sono pronti all'uso; conservare a 2-8 °C fino alla data di scadenza.

Il materiale umano utilizzato nel dispositivo AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA (materiale disidratato sulle strisce reattive, nessun rischio di infezione) è stato testato ed è risultato negativo per HIV, epatite B ed epatite C.

**Materiali aggiuntivi richiesti ma non acclusi al kit:** guanti monouso, timer. Per i campioni di sangue intero venoso e/o plasma: normale strumentazione per prelievo ematico da venipuntura, provette eparinizzate, pipetta da laboratorio.

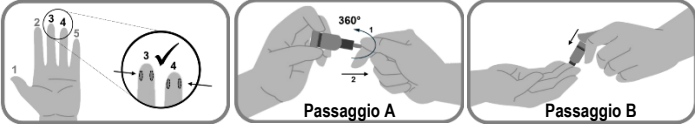
#### MATERIALE DEL CAMPIONE

Per questo test è possibile utilizzare sangue capillare prelevato tramite puntura sul polpastrello, sui lobi delle orecchie o sui talloni (nei neonati). Il capillare di prelievo fornito nel kit deve essere utilizzato per raccogliere il volume corretto (20 µl). Per questo test è possibile utilizzare sangue venoso eparinizzato (20 µl), plasma o siero (8 µl). In caso di plasma o siero, utilizzare le pipette da laboratorio per erogare il volume richiesto. Per prelevare il campione seguire le istruzioni riportate alla sezione "Procedura del test".

#### PROCEDURA DEL TEST

**Preparazione:** prima dell'uso, tutti i reagenti e il dispositivo per il test devono essere tenuti a temperatura ambiente (18-30 °C) per almeno 30 minuti. **1.** Aprire il kit ed estrarre il dispositivo, la siringa, il rack portareagenti e la busta per prelievo del campione ematico. Collocare il materiale su una superficie piana. **2.** Aprire e assemblare il rack portareagenti. **3.** Etichettare il dispositivo con l'ID del paziente nella zona dell'etichetta grigia.

**Prelievo di sangue capillare:** aprire la busta per il prelievo del campione ematico ed estrarne il contenuto: salvietta imbevuta di alcol, lancetta di sicurezza, capillare di prelievo da 20 µl, garza e cerotto. Collocare tutto il materiale su una superficie piana e pulita. **1.** Massaggiare il polpastrello oppure immergerlo per un po' in acqua calda prima della puntura, al fine di aumentare l'afflusso del sangue. **2.** Detergere il sito della puntura (idealmente il dito 3 o 4, sul lato) con la salvietta. **3.** Sbloccare la lancetta di sicurezza come mostrato in figura (Passaggio A) e rimuovere il cappuccio protettivo. **4.** Posizionare la lancetta di sicurezza sul dito da pungere (Passaggio B) e premere con decisione il pulsante. **Nota:** verificare che la mano del paziente sia più in basso rispetto al cuore. Se l'afflusso di sangue inizialmente è lento, massaggiare delicatamente il dito e verificare che la mano si trovi al di sotto del livello del cuore.



**5.** Raccogliere le gocce di sangue con la punta del capillare di prelievo. Mantenere il capillare in posizione orizzontale o leggermente inclinato verso il basso, lasciando che il sangue scorra fino a raggiungere il livello adeguato. Non coprire il foro (dell'aria) nello stantuffo. La tacca sul capillare indica il volume del campione (20 µl). **ATTENZIONE** Utilizzare 20 µl di sangue, altrimenti i risultati non saranno attendibili. **6.** Coprire la ferita con il cerotto. **7.** Aprire immediatamente la provetta del diluente bloccante (tappo viola) e posizionare la punta del capillare di prelievo appena sopra l'apertura della provetta. Coprire il foro all'estremità dello stantuffo con il dito. Premere delicatamente lo stantuffo per trasferire il sangue nella provetta del diluente bloccante. Chiudere la provetta del diluente bloccante e miscelare delicatamente a mano o nel vorticare.

**ATTENZIONE! Non conservare il sangue dopo averlo aggiunto al diluente bloccante. Ogni campione deve essere testato immediatamente dopo averlo aggiunto al diluente bloccante.** Se viene utilizzato sangue non trattato (ovvero non aggiunto al diluente bloccante) i risultati del test non saranno validi. Non conservare il sangue all'interno del capillare di prelievo.

**Raccolta di sangue venoso, plasma o siero:** **1.** Utilizzare le tecniche di laboratorio standard per la raccolta di sangue venoso (eparinizzato). **2.** Se necessario, centrifugare con una tecnica di laboratorio standard per separare il plasma dalle cellule ematiche. Aprire quindi la provetta del diluente bloccante (tappo viola) e applicare il volume corretto di sangue (20 µl), di plasma o di siero (8 µl), ad esempio con una pipetta da laboratorio. Chiudere la provetta del diluente bloccante e miscelare delicatamente a mano o nel vorticare.

**Aggiunta del campione:** **1.** Utilizzare i guanti per eseguire il test. Il test deve essere eseguito su una superficie piana. **2.** Aprire la provetta del diluente bloccante (tappo viola) contenente il campione e prelevare tutto il contenuto con la siringa. Verificare che non si formino bolle d'aria grandi. Posizionare la siringa sull'apertura di introduzione del campione e iniettare l'intero contenuto della siringa premendo lo stantuffo verso il basso. **Incubare per 8 minuti.** **Nota:** un minimo reflusso di campione ematico non compromette i risultati del test, a condizione che la membrana sia adeguatamente imbevuta.

**Incubazione dell'anticorpo primario:** **1.** Aprire la prima provetta della soluzione di lavaggio (tappo coperchio blu), prelevare tutta la soluzione e iniettarla come descritto sopra. **2.** Aprire la provetta dell'anticorpo primario (tappo bianco, provetta semitrasparente), prelevare tutta la soluzione e iniettarla come descritto sopra. **Incubare per 8 minuti.**

**Incubazione dell'anticorpo secondario:** **1.** Aprire la seconda provetta della soluzione di lavaggio (tappo blu), prelevare tutta la soluzione e iniettarla come descritto sopra. **2.** Aprire la provetta dell'anticorpo secondario (tappo giallo), prelevare tutta la soluzione e iniettarla come descritto sopra. **Incubare per 8 minuti.**

**Reazione cromatica:** **1.** Aprire la terza provetta della soluzione di lavaggio (tappo blu), prelevare tutta la soluzione e iniettarla come descritto sopra. **2.** Aprire le due provette del reagente colorante (provette marroni, tappo bianco), prelevare tutta la soluzione della prima provetta e iniettarla come descritto sopra. Avviare il timer. **Entro 30 secondi:** prelevare tutta la soluzione della seconda provetta e iniettarla come descritto sopra. **Incubare per 5 minuti** (incubazione totale dei due passaggi).

**Arresto della reazione:** aprire la provetta del tampone di arresto della reazione (tappo verde), prelevare tutta la soluzione e iniettarla come descritto sopra.

#### PROCEDURA PER DUE O PIÙ TEST PARALLELI

Gli operatori esperti nell'uso del test AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA possono eseguire più di un test in parallelo. Suggeriamo di iniziare i test a intervalli di almeno 1 minuto o più, in modo da garantire una gestione corretta dei vari passaggi. Il test è consigliabile eseguire più di cinque test in parallelo.

#### CONTROLLI INTERNI

Ogni finestra di test contiene controlli metodologici (negativo, NC) e funzionale (FC). I segnali FC compaiono come bande colorate dopo l'esecuzione del test. La prima e la quarta finestra di test contengono gli standard o il calibratore cut-off, fondamentali per la valutazione quantitativa e qualitativa dei risultati del test. Lo standard 1 nella prima finestra di test corrisponde al calibratore cut-off richiesto per la valutazione qualitativa del test. **Finestre di test 1 e 4 (valutazione quantitativa):** se gli standard o il controllo FC non sono visibili, oppure se il controllo NC è ≥ allo standard 1, il risultato dell'intero dispositivo non è valido, ed è necessario ripetere il test utilizzando un nuovo kit. **Finestra di test 1 (valutazione qualitativa):** se il calibratore cut-off o il controllo FC non sono visibili o se il controllo NC è ≥ al calibratore cut-off, il risultato dell'intero dispositivo di test non è valido. **Finestra di test 2 e 3 (valutazione quantitativa e qualitativa):** se il controllo FC non è visibile oppure se il controllo NC è ≥ allo standard 1/ ≥ al calibratore cut-off, i risultati della finestra di test corrispondente non sono validi ed è necessario ripetere il test utilizzando un nuovo kit.

#### LETTURA DEL RISULTATO DEL TEST

**Valutazione qualitativa:** per valutare i risultati, posizionare il dispositivo di test con l'apertura di introduzione del campione rivolta verso sinistra. In questa posizione i nomi degli antigeni risultano sotto le aree di test corrispondenti. Leggere i risultati in buone condizioni di illuminazione. Fare attenzione alle ombre create dall'etichetta anteriore ed evitare di fare confusione con i segnali di test. Iniziare dalla parte superiore sinistra della prima finestra (IgA totali) leggere da sinistra fino all'estremità destra della seconda e della terza finestra. Questo corrisponde alla disposizione dell'antigene nella scheda di valutazione. Per una valutazione qualitativa dei risultati, confrontare l'intensità del calibratore cut-off (standard 1) nella prima finestra (mostrata dalla freccia sull'etichetta superiore del dispositivo di test) con le intensità dei singoli antigeni (media visiva della misurazione in triplicato). Se c'è una differenza significativa tra le intensità del segnale di un antigene in un triplicato, per la valutazione visiva selezionare i due segnali con le intensità più simili (  ) - ignorare il segnale debole;  - ignorare il segnale forte). I risultati vengono registrati nella scheda di valutazione corrispondente.

|          |                                                                                          |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Negativo | L'intensità del segnale è inferiore al calibratore cut-off (standard 1)                  |
| Dubbio   | L'intensità del segnale è approssimativamente uguale al calibratore cut-off (standard 1) |
| Positivo | L'intensità del segnale è superiore a quella del calibratore cut-off (standard 1)        |

**Valutazione quantitativa:** con un lettore disponibile a parte è possibile analizzare i risultati quantitativamente. A tal fine, posizionare il dispositivo di test nel lettore e leggere i risultati utilizzando il software e il grafico di controllo. Prendere visione delle istruzioni nel manuale. La valutazione quantitativa viene eseguita automaticamente utilizzando un'analisi di regressione in cui i valori grezzi di cinque standard (standard 0-4) sono adattati alla concentrazione in U/ml (unità arbitrarie). Per l'analisi del test viene utilizzata una funzione logistica a 4 parametri integrata nel grafico di controllo. I risultati per ogni antigene sono espressi in U/ml.

| Risultato*               | Concentrazione sIgA (unità arbitrarie, U/ml) |
|--------------------------|----------------------------------------------|
| Negativo                 | < 12,00                                      |
| Dubbio                   | 12,00 – 17,99                                |
| Debolmente asso positivo | 18,00 – 29,99                                |
| Positivo                 | 30,00 – 199,99                               |
| Fortemente positivo      | ≥ 200,00                                     |

\* fare riferimento alla sezione "Interpretazione dei risultati".

**Nota:** **1.** utilizzare solo la scheda di valutazione nel kit AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA. **2.** Per evitare confusione con altri test, leggere i risultati subito dopo il test. I risultati del test rimangono stabili per almeno 24 h se conservati al buio. Lo sfondo colorato delle aree di test potrebbe subire alterazioni nel corso del tempo. Le eventuali piccole bolle d'aria possono essere eliminate immettendo aria nel dispositivo con la siringa fornita fino a quando non spariscono. **3.** Se le bande degli standard o del calibratore cut-off non sono visibili, i risultati del test non sono validi.

**La sensibilità analitica** è stata valutata con più analisi di bianchi e campioni debolmente positivi, seguite dal calcolo del limite di bianco (LoB) e del limite di rivelabilità (LoD), rispettivamente. Per tutti gli antigeni sono stati determinati i seguenti valori generali: LoB = 0,24 U/ml; LoD = 0,87 U/ml.

**Specificità analitica:** il dispositivo AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA rileva anticorpi IgA specifici. Non si osservano influenze significative sui risultati del test con le sostanze interferenti trigliceridi (2000 mg/dL), emolisato (500 mg/dL), bilirubina (40 mg/dL) e IgG (4500 mg/dL). Non è nota alcuna reattività crociata con altre specie di immunoglobuline.

**Limiti della procedura dell'esame:** non sono noti limiti né sostanze interferenti clinicamente rilevanti. Non sono noti effetti di carry-over. Campioni primari non idonei: sangue coagulato. Fattori/circostanze significativi e precauzioni: fare riferimento alle sezioni "Materiale del campione", "Procedura del test" e "Lettura del risultato del test".

**Sensibilità/specificità relativa:** i risultati del test AESKUCARE®Gluten Related Disorders IgA sono stati valutati confrontandoli con il test AESKUBLOTS® Gluten Related Disorders IgA con marcatura CE (Aesku Diagnostics GmbH & Co. KG). Dal confronto sono emersi i seguenti valori di sensibilità/specificità relativa in percentuale: mTG neo 100/90, TG3 100/100, tTG 67/100, tTG neo 100/100, mTG <sup>-</sup>/100, frazione di Frazer 75/95, gliadina 73/100, DGP 93/93.

\* Studi precedenti dimostravano che i campioni ematici contenenti anticorpi contro le mTG sono piuttosto rari. Questa osservazione è stata confermata anche con il dispositivo AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA. Pertanto, la sensibilità relativa di questo antigene non può essere stimata adeguatamente.

**Intervali di riferimento:** a causa della mancanza di uno standard di riferimento internazionale questo test è calibrato in unità arbitrarie (U/ml). Per i valori soglia utilizzati per gli intervalli di positività delle sIgA fare riferimento alla sezione "Lettura del risultato del test".

**Precisione inter-test:** per determinare la precisione inter-test, tre test con siero di controllo sono stati eseguiti da cinque operatori (n = 15). I valori medi sono stati determinati separatamente per ciascun antigene\*. I risultati sono riassunti nella tabella seguente. Per la precisione inter-test di tutti gli antigeni si ritiene accettabile una differenza di livello decimale ≤ 1,0 tra i test.

\* Nell'analisi dei dati statistici, i dati ottenuti in U/ml sono stati categorizzati in livelli decimali 0 – 3,5. In generale, i livelli decimali ≤ 0,99 rappresentano risultati < 12,00 U/ml, i livelli decimali ≤ 1,00 e ≤ 1,99 rappresentano risultati 12,00 – 29,99 U/ml, livelli decimali ≥ 2,00 e ≤ 2,99 rappresentano risultati 30,00 – 199,99 U/ml e livelli decimali ≥ 3,00 e ≤ 3,50 rappresentano risultati 200,00 – 300,00 U/ml.

| Antigene   | Numero di misurazioni | Media (livello decimale) | Differenza inter-test a livello decimale (max vs. min) | Analisi  |
|------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------|----------|
| IgA totali | 15                    | 3,2                      | 0,4                                                    | Positivo |
| mTG neo    | 15                    | 2,6                      | 0,2                                                    | Positivo |
| TG3        | 15                    | 0,0                      | 0,1                                                    | Negativo |
| tTG        | 15                    | 2,5                      | 0,4                                                    | Positivo |
| tTG neo    | 15                    | 2,8                      | 0,3                                                    | Positivo |
| mTG        | 15                    | 0,0                      | 0,0                                                    | Negativo |
| Frazer's F | 15                    | 2,8                      | 0,4                                                    | Positivo |
| Gliadin    | 15                    | 2,4                      | 0,2                                                    | Positivo |
| DGP        | 15                    | 2,0                      | 0,2                                                    | Positivo |

**Precisione fra lotti:** i test con sieri di controllo sono stati eseguiti con tre lotti. La precisione fra lotti è risultata del 96%.

**Linearità:** per i sieri di controllo selezionati, si nota una correlazione lineare tra la concentrazione di diluizione e la concentrazione dell'anticorpo. Coefficiente di correlazione R<sup>2</sup>: > 0,95 (90% di tutti gli antigeni positivi), > 0,94 (100% di tutti gli antigeni positivi). A causa dell'eterogeneità degli anticorpi umani non si può escludere che singoli sieri mostrino un comportamento non lineare.

#### CONTROLLO QUALITÀ

È buona prassi di laboratorio registrare i numeri di lotto di tutti i componenti utilizzati.

#### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Nella diagnosi dei disturbi correlati al glutine non è consuetudine considerare determinati valori di sIgA come limiti strettamente definiti. In generale, una concentrazione crescente di sIgA verso i biomarcatori antigenici dei disturbi correlati al glutine rende più probabile una correlazione diretta con i sintomi. Intensità del segnale ≤ 30,0 U/ml corrispondono a un livello moderato o alto di sIgA. **Nota:** per definire raccomandazioni nutrizionali o corroborare una diagnosi di disturbi correlati al glutine, i risultati del test devono essere sempre valutati insieme all'anamnesi e a qualsiasi eventuale sintomo del paziente.

I disturbi correlati al glutine (GRD) sono disturbi innescati dal glutine e includono la celiachia (CD), la sensibilità non celiaca al glutine (NCGS), la dermatite erpetiforme (DH) e l'allergia al grano.

La celiachia è un disturbo dell'intestino tenue con un decorso cronico. Nei soggetti che ne sono affetti, l'assunzione di glutine attraverso il cibo porta a una reazione immunologica mediata dalle cellule T.

Gli anticorpi anti-gliadina, la tTG e i DGP sono correlati all'attività della malattia e risultano pertanto utili agli operatori sanitari per corroborare la diagnosi. Gli anticorpi anti-gliadina possono trovarsi anche in individui sani. Studi recenti hanno dimostrato che gli anticorpi diretti contro la gliadina nei pazienti celiaci si legano a un numero molto limitato di epitopi specifici sulla molecola di gliadina.

La deamidazione selettiva della gliadina ad opera della transglutaminasi tissutale determina un legame potenziato dagli anticorpi anti-gliadina. I test che usano peptidi deamidati (DGP) e definiti hanno dimostrato un'accuratezza diagnostica maggiore per la malattia celiaca rispetto ai test anti-gliadina standard.

La mTG mostra una sostanziale analogia funzionale con la tTG nel processo di deamidazione selettiva delle proteine. Il legame crociato della tTG o della mTG con i peptidi specifici per la gliadina risulta in neo-epitopi rispettivamente della tTG e della mTG. Poiché tali neo-epitopi sono strutturalmente più vicini agli antigeni fisiologici, mostrano una sensibilità e una specificità segnatamente aumentate. Inoltre, i biomarcatori dei neo-epitopi della mTG possono fornire evidenze non solo nei primi stadi della malattia celiaca, ma anche nella sensibilità non celiaca al glutine (NCGS).

La frazione di Frazer (nota anche come PT-gliadina) è una sostanza risultante dalla digestione peptica-triptica della gliadina che conserva le proprietà reattive della gliadina e mimla la frazione che raggiunge il duodeno dopo la digestione gastrica. L'ipotesi è che una miscela di peptidi di gliadina di origine naturale aumenti significativamente la sensibilità e la specificità degli anticorpi anti-gliadina.

La dermatite erpetiforme (DH) è una malattia dermatologica cronica, vescicolosa e associata a intenso prurito. I pazienti affetti da DH hanno gli anticorpi contro la TG3. Inoltre, è possibile rilevare depositi granulari di IgA sotto la pelle. Per tutti i pazienti affetti da DH, la malattia celiaca può essere generalmente diagnosticata come condizione di comorbidità. Pertanto, la determinazione sierologica degli anticorpi contro i biomarcatori specifici della CD (gliadina, frazione di Frazer, tTG, neo-epitopi della tTG e DGP), insieme all'analisi della sensibilità verso le TG3, è uno strumento utile per corroborare la diagnosi di DH.

Il parametro di test "IgA totali" è utilizzato per determinare una possibile carenza di IgA. Circa il 2-5% dei pazienti presenta carenza di IgA e pertanto i test anticorpali per le IgA risultano negativi (intensità del segnale delle IgA totali < 18 U/ml ove il test AESKUCARE® Gluten Related Disorders IgA viene usato per la valutazione quantitativa o inferiore rispetto al calibratore cut-off quando il test viene usato per la valutazione qualitativa), anche quando la malattia è attiva. Si raccomanda di eseguire la determinazione degli anticorpi IgG specifici contro i biomarcatori antigenici dei disturbi correlati al glutine nei pazienti ai quali è stata confermata la carenza di IgA.

#### SMALTIMENTO

È necessario seguire le indicazioni specifiche per la manipolazione del sangue umano e per lo smaltimento sicuro dei rifiuti dei componenti (contenenti sangue) utilizzati. Fare riferimento a tutte le linee guida locali/nazionali per la gestione del rischio biologico. Il resto del kit può essere considerato privo di rischio biologico e può pertanto essere smaltito di conseguenza.

#### ULTERIORI LIMITAZIONI

**1.** La diagnosi clinica finale di un disturbo correlato al glutine non deve basarsi solo sui risultati di un singolo metodo diagnostico, ma deve essere formulata solo in seguito alla valutazione di tutti i riscontri clinici e di laboratorio. La presenza in vitro delle sIgA contro i biomarcatori antigenici dei disturbi correlati al glutine deve sempre essere accompagnata da un'anamnesi completa e dall'analisi di qualsiasi sintomo. **2.** Si possono occasionalmente registrare risultati negativi ai test in vitro nei pazienti che presentano sintomi da GRD con chiara correlazione a una dieta contenente glutine. **3.** I pazienti che presentano sintomi clinici riconducibili a GRD ma negativi o debolmente positivi al test delle sIgA devono essere invitati a rivolgersi a uno specialista per ulteriori approfondimenti. **4.** Anche i campioni di soggetti apparentemente sani possono contenere autoanticorpi specifici dei disturbi correlati al glutine. **5.** Si considera che, con una dieta priva di glutine, gli anticorpi specifici contro i biomarcatori antigenici dei GRD diminuiscono notevolmente fino a non essere più rilevabili. **6.** Per ottenere risultati attendibili e ripetibili è necessario eseguire il test secondo le istruzioni operative e seguendo le buone prassi di laboratorio.

#### VALORI ATTESI

Per studiare l'intervallo atteso, donatori selezionati a caso sono stati testati per ciascun biomarcatore antigenico per i GRD.

| Antigene   | Numero di misurazioni | Mediana [U/ml] | Media [U/ml] | Deviazione standard [U/ml] |
|------------|-----------------------|----------------|--------------|----------------------------|
| mTG neo    | 60                    | 0,00           | 0,38         | 1,10                       |
| TG3        | 60                    | 0,33           | 3,22         | 9,75                       |
| tTG        | 60                    | 0,00           | 0,60         | 1,17                       |
| tTG neo    | 60                    | 0,00           | 0,26         | 0,84                       |
| mTG        | 60                    | 0,00           | 1,23         | 4,87                       |
| Frazer's F | 60                    | 0,00           | 0,48         | 1,12                       |
| Gliadin    | 60                    | 0,00           | 0,41         | 1,08                       |
| DGP        | 60                    | 0,04           | 1,22         | 4,07                       |

È consigliabile che ogni laboratorio stabilisca il proprio range di valori normali.

In generale, i valori attesi per i soggetti apparentemente sani (bambini, uomini e donne) sono < 18 U/ml a temperatura ambiente (18-30 °C) per tutti gli antigeni GRD del test. Per i valori soglia degli intervalli dei risultati positivi delle sIgA fare riferimento alla sezione "Lettura del risultato del test".

#### GARANZIA

I dati di prestazione qui presentati sono stati ottenuti seguendo la procedura esposta. Ogni modifica procedurale non prevista da questo documento può influire sui risultati; in tale circostanza Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG declina ogni garanzia esplicita, implicita o legale, ivi inclusa la garanzia implicita della commerciabilità e dell'idoneità all'uso. In tale eventualità Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG e i suoi distributori autorizzati non potranno essere ritenuti responsabili per danni indiretti o consequenziali.

#### BIBLIOGRAFIA

**1.** Elli L, et al. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. World J Gastroenterol. (2015) 21(23):7110-7119. **2.** Caio G, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. BMC Med. (2019) 17(1):142. **3.** Frazer AC, et al. Gluten-induced enteropathy: the effect of partially digested gluten. Lancet (1959) 2(7097):252-255. **4.** Lerner A, et al. Antibodies against neo-epitope tTG complexed to gliadin are different and more reliable then anti-tTG for the diagnosis of pediatric celiac disease. J Immunol Methods (2016) 429:15-20. **5.** Lerner A, et al. Transglutaminases in dysbiosis as potential environmental drivers of autoimmunity. Front Microbiol. (2017) 8:66. **6.** Lerner A and Matthias T. Possible association between celiac disease and bacterial transglutaminase in food processing: a hypothesis. Nutr Rev. (2015) 73(8):544–552. **7.** Lytton SD, et al. Neo-epitope tissue transglutaminase autoantibodies as a biomarker of the gluten sensitive skin disease-dermatitis herpetiformis. Clin Chim Acta. (2013) 415:346-9. **8.** Matthias T, et al. The industrial food additive microbial transglutaminase, mimics the tissue transglutaminase and is immunogenic in celiac disease patients. Autoimmun Rev. (2016) 15(12):1111-1119. **9.** Mothes T. Deamidated gliadin peptides as targets for celiac disease-specific antibodies. Adv Clin Chem. (2007) 44:35-63. **10.** Prause C, et al. Antibodies against deamidated gliadin as new and accurate biomarkers of childhood coeliac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. (2009) 49(1):52-58. **11.** Reunala T, et al. Dermatitis herpetiformis: A common extraintestinal manifestation of coeliac disease. Nutrients (2018) 10(5): 602. **12.** Salmi TT. Dermatitis herpetiformis. Clin Exp Dermatol. (2019) 44(7):728-731. **13.** Singh P. Global prevalence of celiac disease: systematic review and meta-analysis. Clin Gastroenterol Hepatol. (2018) Jun;16(6):823-836.

**Linee guida:** CLSI GP44-A4: Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests. CLSI EP17-A2: Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures.

#### BREVETTI/MARCHI COMMERCIALI

Brevetto dell'Unione europea: EP 2 839 290 B1, Brevetto degli Stati Uniti: US 10,571,466 B2

#### INDIRIZZO

Produttore da Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG, Mikroforum Ring 2, 55234 Wendelsheim, Germania Tel.: +49 6734 - 9622-0, Fax: +49 6734 - 9622-2222, Sito Internet: www.aesku.com

Su richiesta è possibile ricevere ulteriori informazioni aziendali e approfondimenti relativi al prodotto.