

REF 41421 	ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG		
GEBRAUCHS- ANLEITUNG	IVD	+2°C  +8°C  100	CE

VERWENDUNGSZWECK

Der Test *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* ist ein Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) für die quantitative Bestimmung, mit dem speziellen *ZENIT RA Analysegerät*, von spezifischen Antikörpern der Klasse IgG gegen deamidierte Gliadinpeptide in humanen Serum- oder Plasmaproben (EDTA, Heparin). Dieser Test dient als diagnostisches Hilfsmittel bei der Beurteilung von glutenbedingter Enteropathie (Zöliakie) und Dermatitis herpetiformis Duhring.

ACHTUNG: Ärztliche Entscheidungen dürfen nicht ausschließlich auf dem Ergebnis dieses Tests beruhen, sondern sind auf der Grundlage der Beurteilung aller verfügbaren klinischen und Labordaten zu treffen.

KLINISCHE BEDEUTUNG

Zöliakie oder Glutenintoleranz ist eine Autoimmunerkrankung, die bei genetisch empfindlichen Personen auftritt und durch eine Ernährung reich an Getreidesorten wie Weizen, Gerste und Roggen ausgelöst wird¹. Die genetische Prädisposition ist hauptsächlich mit einigen Genen des HLA-Systems verbunden, insbesondere mit den Genotypen DQ2 und DQ8, die bei 95-98 % der Zöliakiepatienten vorliegen, in der allgemeinen Bevölkerung jedoch nur mit einem Anteil von 20 bis 30 % anzufinden sind^{2,3}. Die Häufigkeit von Zöliakie in der weißen Bevölkerung liegt bei etwa 1:100, d.h. etwa eine von 30 Personen mit den von den Genen HLA-DQ2/DQ8 kodierten Allelen entwickelt Zöliakie^{4,5}.

Gliadin ist der Proteinbestandteil von Gluten, der den autoimmunen Prozess auslösen kann; der Kontakt von Gliadinpeptiden mit Zellen des Immunsystems in der Submukosa des Darms kann erfolgen, wenn die intestinale Durchlässigkeit durch das von den Enterozyten abgesonderte Zonulin verändert wird. Gliadin ist ein ausgezeichnetes Substrat für das Enzym Gewebstransglutaminase (t-TG); die deamidierende und transamidierende Wirkung von t-TG auf die Gliadinpeptide verändert die Gesamtladung der Substanz und erlaubt so deren Bindung an die HLA-Antigene DQ2-DQ8, die von den Zellen mit den Antigenen exprimiert werden, so dass sich ein Komplex aus HLA DQ2-DQ8/deamidierten Peptiden/t-TG bildet. Dieser Komplex wird von den T-CD4-Lymphozyten⁶ erkannt, die den immunologischen Prozess auslösen, mit Aktivierung der T-Effektorzellen, Produktion von Zytokinen, starker Vermehrung von B-Lymphozyten und Synthese von Antikörpern gegen t-TG⁷ und Gliadinpeptide^{8,9}. Das Ergebnis ist ein entzündlicher Prozess mit

verschiedenen histologischen Erscheinungsbildern, die bis zu (reversiblen) Schädigungen der Darmschleimhaut, z.B. Zottenatrophie, hinreichen.

Serologische Tests sind von entscheidender Bedeutung bei der Diagnose von Zöliakie und bei der Überwachung der Compliance mit der Behandlung, die aus einer glutenfreien Ernährung besteht. Wie in den internationalen Richtlinien angegeben, ist der erste Ansatz zur Diagnose von Zöliakie ein Suchtest für Autoantikörper der Klasse IgA gegen t-TG, zusammen mit der Bestimmung der IgA insgesamt; dieses Vorgehen wird empfohlen, da Personen mit absolutem IgA-Mangel ($\text{IgA} \leq 5 \text{ mg/dl}$)¹⁰ ein zehnmal höheres relatives Risiko für die Entwicklung von Zöliakie haben als die normale Bevölkerung¹¹.

Die hohe Sensitivität und Spezifität (96-98 % bzw. 93-95 %)¹² der Transglutaminase-IgA-Autoantikörper zusammen mit der Objektivität und der vollständigen Automatisierung des Tests haben dazu geführt, dass die Suche nach Anti-t-TG-IgA in den letzten Jahren die anderen serologischen Untersuchungen für Zöliakie ersetzt hat¹³. Die Bestimmung von Anti-Endomysium-IgA (EMA) spielt jedoch eine wichtige bestätigende Rolle bei allen für Anti-t-TG-IgA positiven Seren; dies ist durch die sehr hohe Spezifität (99-100 %) der EMA bedingt, auch wenn die interpretativen Aspekte dieses Tests bedeutend bleiben. Bei selektivem IgA-Mangel ist die Bestimmung der Anti-t-TG-IgG zusammen mit der Bestimmung der IgG-Antikörper gegen deamidierte Gliadinpeptide (a-DGP) erforderlich.

Es wurde vor kurzem nachgewiesen, dass Zöliakiepatienten spezifische Antikörper gegen einige deamidierte Gliadinpeptide bilden. Im Gegensatz zu Gliadin-Antikörpern insgesamt, die auch bei gesunden Personen und bei anderen intestinalen Erkrankungen vorkommen und daher eine geringere Spezifität aufweisen, sind die DGP-Antikörper hochspezifisch bei der Identifizierung von Personen mit Glutenintoleranz¹⁴.

DGP-Antikörper der Klasse IgA haben eine Sensitivität von 86-95 % und eine Spezifität von 91-95 %, während bei den Antikörpern der Klasse IgG die Sensitivität bei 84-98 % und die Spezifität bei 95-98 % liegt; diese Charakteristiken machen eine Anwendung bei pädiatrischen Patienten¹⁵ empfehlenswert, bei denen die Bildung dieser Antikörper der Bildung von Anti-Transglutaminase-IgA voranzugehen scheint. Darüber hinaus ist ein Test auf DGP-Antikörper, sowohl der Klasse IgA als auch IgG, unabhängig vom Alter bei solchen Patienten empfehlenswert, die auf Zöliakie hinweisende Symptome haben, aber bei denen t-TG- oder EMA-Autoantikörper nicht oder nur mit geringem Titer vorliegen¹⁶.

Bei Zöliakiepatienten, die sich glutenfrei ernähren, wird ein progressiver Rückgang der t-TG- und Gliadin-Antikörper beobachtet. Der Rückgang der Titer der IgG-Antikörper erfolgt langsamer im Vergleich zu den Antikörpern der Klasse IgA.

PRINZIP DER METHODE

Der Kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* für die quantitative Bestimmung von spezifischen IgG gegen deamidierte Gliadinpeptide verwendet eine indirekte immunologische Methode in zwei Schritten auf der Grundlage des Chemilumineszenzprinzips.

Das spezifische Antigen wird zur Beschichtung der Magnetpartikel verwendet (Festphase), und ein Antikörper gegen humane IgG wird mit einem Acridiniumester-Derivat markiert (Konjugat).

Während der ersten Inkubation binden sich die spezifischen Antikörper in der Probe, in den Kalibratoren oder in den Kontrollseren an die Festphase.

Während der zweiten Inkubation reagiert das Konjugat mit den an die Festphase gebundenen Gliadin-IgG-Antikörpern.

Nach jeder Inkubation wird das nicht an die Festphase gebundene Material mittels Absaugen und anschließendem Waschen entfernt.

Die Menge des markierten Konjugats, das an die Festphase gebunden wurde, wird mittels Aktivierung der Chemilumineszenzreaktion und Messung des Lichtsignals bewertet. Das erzeugte Signal wird in relativen Lichteinheiten (RLU - Relative Light Unit) ausgedrückt und zeigt die Konzentration der in der Probe, in den Kalibratoren und in den Kontrollseren vorliegenden spezifischen Antikörper an.

AUTOMATISIERUNG

Das *ZENIT RA Analysegerät* führt automatisch alle Schritte durch, die im Protokoll für den Test vorgesehen sind: Hinzufügen von Proben, Kalibratoren, Kontrollseren, Magnetpartikeln, Konjugat und Aktivierungslösungen für die Chemilumineszenz in den Reaktionsbehälter; magnetische Trennung und Waschen der Partikel; Messen des emittierten Lichts.

Das System berechnet die Testergebnisse der Proben und Kontrollseren mittels der gespeicherten Kalibrierungskurve und druckt einen Bericht aus, der alle Informationen bezüglich des Tests und des Patienten enthält.

MATERIALIEN UND REAGENZIEN

Mitgelieferte Materialien und Reagenzien

REAG	1	MP	2.5 mL
------	---	----	--------

Magnetpartikel, beschichtet mit Gliadin-Antigen (spezifische deamidierte Peptide), in Phosphatpuffer mit Stabilisatorproteinen, Tensid, Pro-Clin 300 und Natriumazid (< 0,1 %) als Konservierungsmittel.

REAG	2	CONJ	25 mL
------	---	------	-------

Monoklonale Mausantikörper gegen humane IgG, mit einem Acridiniumester-Derivat markiert (Konjugat), in Phosphatpuffer mit Stabilisatorproteinen und Natriumazid (< 0,1 %) als Konservierungsmittel.

REAG	3	DIL	25 mL
------	---	-----	-------

Probenverdünnungsmittel: Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem inaktiven blauen Farbstoff, Pro-Clin 300 und Gentamicin-SO₄ als Konservierungsmittel.

REAG	4	CAL A	1.6 mL
------	---	-------	--------

Humanserum mit niedriger Konzentration von Gliadin-IgG-Antikörpern in Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem inaktiven blauen Farbstoff, Pro-Clin 300 und Gentamicin-SO₄ als Konservierungsmittel.

REAG	5	CAL B	1.6 mL
------	---	-------	--------

Humanserum mit hoher Konzentration von Gliadin-IgG-Antikörpern in Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem inaktiven blauen Farbstoff, Pro-Clin 300 und Gentamicin-SO₄ als Konservierungsmittel.

Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Die Reagenzien 1, 2 und 3 sind in einem gemeinsamen Behälter, der Reagenzienkartusche, zusammengestellt.

Die Konzentrationen der Kalibratoren sind in AU/ml (Arbitrary Units - willkürliche Einheiten) angegeben und gegen einen internen Referenzstandard kalibriert. Die für jede Produktcharge spezifischen Konzentrationswerte sind in der im Kit enthaltenen DATA DISK verzeichnet.

DATA DISK

Mini-DVD mit Informationen zu allen Produkte der Reihe ZENIT RA (Reagenzien, Kalibratoren, Kontrollseren, Hilfsreagenzien), aktualisiert bis zur letzten Produktionscharge, unter Ausschluss der Produkte, die zum Zeitpunkt der Zusammenstellung der neuen DATA DISK abgelaufen sind.

Es reicht aus, die DATA DISK mit der höchsten Chargennummer aufzubewahren, um die für den korrekten Betrieb des Systems notwendigen Informationen auf dem jeweils aktuellsten Stand zu halten.

Benötigte, im Kit nicht mitgelieferte Materialien und Reagenzien

- | | |
|---|-----------------|
| - ZENIT RA Analysegerät | Best.-Nr. 41400 |
| - ZENIT RA Cuvette Cube
Packung mit 960 Küvetten | Best.-Nr. 41402 |
| - ZENIT RA System Liquid
1 Flasche mit 0,5 Liter Lösung 10x (Systemflüssigkeit). | Best.-Nr. 41409 |
| - ZENIT RA Wash Solution
1 Flasche mit 0,5 Liter Lösung 20x (Waschlösung). | Best.-Nr. 41407 |

- ZENIT RA Trigger Set Best.-Nr. 41403
1 Flasche mit 250 ml Trigger A (Voraktivierungslösung)
1 Flasche mit 250 ml Trigger B (Aktivierungslösung)

- ZENIT RA D-SORB Solution Best.-Nr. 41436
Packung mit 2 Flaschen mit je 1 Liter gebrauchsfertiger Lösung.

- ZENIT RA Cartridge Checking System Best.-Nr. 41401

- ZENIT RA Top Cap Set Best.-Nr. 41566
300 Verschlusskappen zum Verschließen der Kalibratorbehälter nach der ersten Anwendung.

Andere empfohlene Reagenzien

ZENIT RA CELIAC CONTROL SET Best.-Nr. 41452
3 Fläschchen mit je 1,5 ml Gliadin-AK-negativem Humanserum und 3 Fläschchen mit je 1,5 ml Gliadin-AK-positivem Humanserum.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die mit dem Kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* gelieferten Reagenzien dienen ausschließlich der In-vitro-Diagnostik und dürfen nicht in vivo bei Menschen oder Tieren verwendet werden.

Dieses Produkt ist von professionellen Anwendern unter strikter Beachtung der in diesem Dokument vorliegenden Anweisungen zu verwenden.

Menarini kann nicht für Verluste oder Schäden verantwortlich gemacht werden, die aus einer nicht den mitgelieferten Anweisungen entsprechenden Anwendung entstehen.

Sicherheitsmaßnahmen

Dieses Produkt enthält Materialien tierischer Herkunft und ist daher wie Infektionserreger enthaltendes Material zu behandeln.

Dieses Produkt enthält Bestandteile menschlicher Herkunft. Alle für die Herstellung der Reagenzien in diesem Kit verwendeten Serum- oder Plasmaeinheiten wurden mit von der FDA genehmigten Methoden auf das Vorliegen von HBsAg, HCV-Antikörpern, HIV1-Antikörpern und HIV2-Antikörpern untersucht und für nicht reaktiv befunden.

Da jedoch keine Untersuchungsmethode die Abwesenheit von Krankheitserregern garantieren kann, sind alle Materialien menschlicher Herkunft als potentiell infiziert anzusehen und entsprechend zu handhaben.

Falls die Verpackung beschädigt wird und Reagenzien austreten, schützen Sie sich mit einer geeigneten persönlichen Schutzausrüstung (Kittel, Handschuhe, Schutzbrille) und dekontaminieren Sie den betroffenen Bereich mit einer verdünnten Natriumhypochloritlösung.

Entsorgen Sie das für die Reinigung verwendete Material und die von dem Materialaustritt betroffenen Verpackungen gemäß den nationalen Vorschriften für die Entsorgung potentiell infizierter Abfälle.

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Da Natriumazid mit Blei, Kupfer oder verbleitem Messing reagieren und so in den Abflussrohren explosive Azide bilden kann, wird empfohlen, die Reagenzien oder Abfälle nicht in den Abfluss zu entsorgen, sondern die nationalen Vorschriften für die Entsorgung potentiell gefährlicher Abfälle zu befolgen.

Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung

Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten ist es notwendig, dass Sie sich strikt an diese Gebrauchsanleitung halten und die Angaben in der Bedienungsanleitung des Analysegerätes genau befolgen.

Die mit dem Kit gelieferten Reagenzien sind nur mit dem *ZENIT RA Analysegerät* zu verwenden.

Die Bestandteile der Reagenzienkartusche können nicht aus der Kartusche entfernt und wieder zusammengestellt werden.

Den Kit nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

ZUBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle mit dem Kit gelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Die mit dem Kit gelieferten Reagenzien bei 2-8 °C aufrecht und im Dunkeln aufbewahren.

Unter diesen Bedingungen sind die Reagenzienkartusche und die Kalibratoren vor dem Öffnen bis zum Verfallsdatum haltbar.

Nach dem Öffnen kann die Reagenzienkartusche 60 Tage lang angewendet werden, wenn sie im Kühlschrank bei 2-8 °C oder im Gerät aufbewahrt wird.

Nach dem Öffnen können die Kalibratoren 60 Tage lang angewendet werden, wenn sie im Kühlschrank bei 2-8 °C aufbewahrt werden und pro Lauf nicht länger als 6 Stunden im Gerät verbleiben.

Reagenzien und Kalibratoren nicht einfrieren.

ZUBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Die Bestimmung ist mit humanen Serum- oder Plasmaproben (EDTA - Heparin) durchzuführen.

Von der Verwendung lipämischer, hämolytischer und trüber Proben wird abgeraten.

Wenn die Bestimmung mehr als 8 Stunden nach der Entnahme erfolgt, trennen Sie das Serum von dem Blutklumpen oder das Plasma von den roten Blutkörperchen und füllen Sie die Probe aus den primären Geltrennröhrchen in sekundäre Reagenzröhrchen ohne Zusätze um.

Vor der Untersuchung können die Proben höchstens 7 Tage lang im Kühlschrank bei 2-8 °C aufbewahrt werden.

Wenn die Bestimmung nach mehr als 7 Tagen durchgeführt wird, sind die Proben einzufrieren (< -20 °C).

Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Einfrieren.

VERFAHREN

Halten Sie sich genauestens an die Anweisungen in der Bedienungsanleitung des Gerätes, um eine zuverlässige Analyseleistung zu erhalten.

Einsetzen der Reagenzien

Alle mit dem Kit gelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Vor dem Einsetzen der Kartusche in das System muss der Behälter mit den Magnetpartikeln durch horizontales Drehen geschüttelt werden, um die Resuspendierung der Partikel zu erleichtern. Dabei ist die Bildung von Schaum zu vermeiden.

Setzen Sie die Reagenzienkartusche mit Hilfe der entsprechenden Führung in den Reagenzienbereich des Gerätes ein und lassen Sie sie vor der Anwendung mindestens 30 Minuten lang schütteln.

Bei Einsetzen der Reagenzienkartusche wird gleichzeitig deren identifizierender Barcode abgelesen. Falls das Etikett der Kartusche beschädigt ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, können die identifizierenden Daten der Reagenzienkartusche von Hand eingegeben werden.

Das Gerät sorgt automatisch für das kontinuierliche Schütteln der Magnetpartikel.

Wenn die Reagenzienkartusche aus dem Gerät entfernt wird, ist sie bei 2-8 °C aufrecht und im Dunkeln aufzubewahren.

Einsetzen der Kalibratoren und Kontrollseren

Die Kalibratoren und Kontrollseren des Systems ZENIT RA sind gebrauchsfertig. Lassen Sie die Kalibratoren und Kontrollseren 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen und schütteln Sie vorsichtig den Inhalt, von Hand oder mit dem Vortex-Mixer, ohne dass sich dabei Schaum bildet. Den Behälter nicht umdrehen und die Perforationskappe nicht abnehmen (gelbe Kappe für Kalibratoren und grüne oder blaue Kappe für Kontrollseren).

Wenn die Kalibratoren oder Kontrollseren zum ersten Mal verwendet werden, drücken Sie die Perforationskappe bis zum Anschlag nach unten. Dadurch wird die Membran, die den Behälter versiegelt, perforiert, so dass die enthaltene Flüssigkeit entnommen werden kann. Die Absenkung der Perforationskappe wird angezeigt, indem gleichzeitig der rote Streifen am oberen Ende des Etiketts verdeckt wird (Abb. 1 - „Versiegelter Behälter“ und „Perforierter Behälter“).

Wenn die Kalibratoren oder Kontrollseren bereits verwendet wurden, ist der Behälter mit einer Verschlusskappe (weiße Kappe) versehen, und der rote Streifen des Etiketts ist verdeckt.

In das Gerät dürfen nur Behälter ohne Verschlusskappe (weiße Kappe) und mit verdecktem rotem Streifen des Etiketts eingesetzt werden (siehe Abb. 1 - „Perforierter Behälter“).

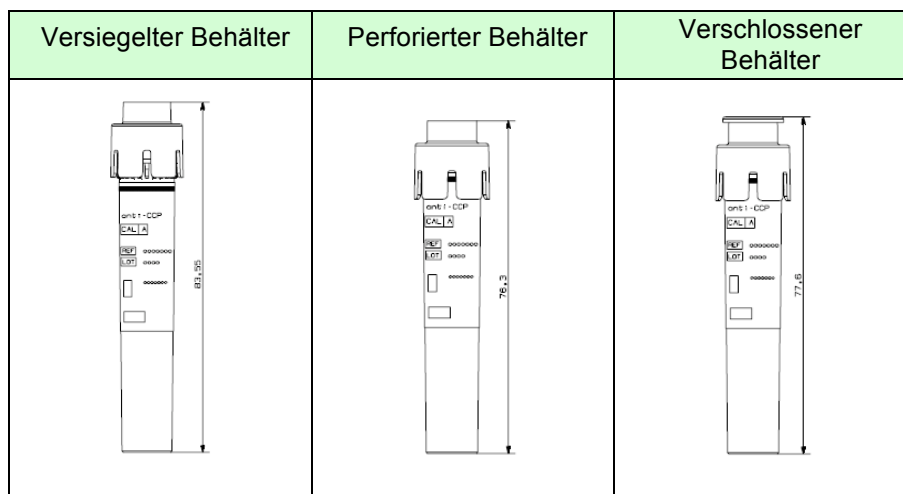
Setzen Sie nach Ablesen des Barcodes die Kalibratoren oder Kontrollseren in den Probenbereich des Gerätes ein. Falls das Etikett beschädigt ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, können die Daten des Barcodes auch von Hand eingegeben werden.

Die Konzentrationswerte der in den Kalibratoren und Kontrollseren vorliegenden Gliadin-IgG-Antikörper sind auf der DATA DISK verzeichnet und werden automatisch an das Analysegerät übertragen. Falls die Daten nicht übertragen werden, können sie von Hand eingegeben werden.

Am Ende des Laufs sind die Behälter der Kalibratoren und Kontrollseren mit den dafür bestimmten Verschlusskappen (weiße Kappen) zu verschließen und bis zu ihrer nächsten Anwendung bei 2-8 °C aufzubewahren (Abb. 1 - „Verschlossener Behälter“).

Die Kalibratoren können höchstens viermal verwendet werden.

Abbildung 1: Anordnung der Behälter



Einsetzen der Proben

Identifizieren Sie die Proben mit Hilfe des Barcodelesers und setzen Sie sie in das entsprechende Fach des Gerätes ein. Falls die Probe nicht mit einem Barcode versehen ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, können die identifizierenden Daten der Probe von Hand eingegeben werden.

Wählen Sie für jede Probe die angeforderten Parameter aus.

Kalibrierung

Das ZENIT RA Analysegerät verwendet eine gespeicherte Kalibrierungskurve (Masterkurve), die vom Hersteller für jede Charge der Reagenzienkartuschen erzeugt wird.

Die Parameter der Masterkurve sind zusammen mit den Konzentrationswerten der Kalibratoren auf der DATA DISK gespeichert und werden in die Datenbank des Gerätes übertragen.

Die Kalibratoren A und B werden verwendet, um entsprechend dem verwendeten Gerät und den Reagenzien im Gerät die Masterkurve nachzukalibrieren.

Analysieren Sie zum Nachkalibrieren die beiden Kalibratoren A und B dreifach und die Kontrollseren einfach. Die mit den Kontrollseren erhaltenen Konzentrationswerte ermöglichen es, die neue Kalibrierung zu validieren.

Nachdem die Nachkalibrierung der Masterkurve akzeptiert und gespeichert wurde, können alle nachfolgenden Proben ohne weitere Kalibrierung analysiert werden, es sei denn, es tritt einer der folgenden Fälle ein:

- eine Reagenzienkartusche einer neuen Charge wird in das Gerät eingesetzt;
- die Werte der Kontrollseren liegen nicht innerhalb des Akzeptanzbereiches;
- es wurden Wartungsverfahren am Gerät durchgeführt;
- die Gültigkeit der nachkalibrierten Masterkurve ist abgelaufen.

Die Gültigkeit der nachkalibrierten Masterkurve für den Kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* beträgt 15 Tage.

Die Nachkalibrierung wird vom Gerät automatisch verwaltet.

Quantitative Bestimmung

Drücken Sie die Starttaste.

1. Das System saugt 100 µl Probenverdünnungsmittel, 20 µl Magnetpartikel, 100 µl Probenverdünnungsmittel und 6 µl Probe oder Kontrollserum an (für die Kalibratoren wird das positive Serum mit dem Probenverdünnungsmittel vorverdünnt geliefert, und das entnommene Volumen beträgt 106 µl). Die angesaugten Lösungen und Suspensionen werden in die Reaktionsküvette gegeben.
2. Die Reaktionsküvette wird 10 Minuten lang bei 37 °C im Karussell inkubiert.
3. Nach dieser Inkubationsphase werden die Magnetpartikel getrennt und gewaschen.
4. In die Küvette werden 200 µl Konjugat gegeben.
5. Die Reaktionsküvette wird 10 Minuten lang bei 37 °C im Karussell inkubiert.
6. Nach dieser letzten Inkubationsphase werden die Magnetpartikel getrennt und gewaschen, und die Küvette wird in die Messkammer überführt.
7. Die in RLU angegebene Menge des an die Festphase gebundenen Konjugats ist direkt proportional zu der Konzentration der in der Probe vorliegenden Gliadin-IgG-Antikörper.
8. Die erhaltenen Ergebnisse werden auf die Kalibrierungskurve aufgetragen und in Konzentrationen umgerechnet.

Proben mit Konzentrationswerten über dem oberen Messgrenzwert können verdünnt und erneut getestet werden. Der neue Wert wird mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor multipliziert, um das Endergebnis zu erhalten.

QUALITÄTSKONTROLLE

Um die Gültigkeit der Bestimmung zu garantieren, müssen an jedem Tag, an dem dieser Test durchgeführt wird, Kontrollseren mit unterschiedlichen Konzentrationen (mindestens ein negatives und ein positives Serum) gemessen werden.

Falls Ihr Labor für die Überprüfung der Ergebnisse der Bestimmung die häufigere Anwendung oder die Anwendung einer höheren Anzahl von Kontrollseren erfordert, befolgen Sie die im Labor festgelegten Qualitätskontrollverfahren.

Wenn Kontrollseren des Systems ZENIT RA verwendet werden, sind die erwarteten Mittelwerte und die Akzeptanzgrenzen in der auch mit den Kontrollseren gelieferten DATA DISK angegeben.

Falls andere Kontrollseren angewendet werden, sind vor deren Anwendung die mit den Reagenzien und dem System ZENIT RA erwarteten Werte zu bestimmen.

Wenn die Werte der Kontrollseren nicht in den angegebenen Akzeptanzbereich fallen, sind die zugehörigen Testergebnisse nicht gültig, und die entsprechenden Proben müssen erneut getestet werden.

In diesen Fällen ist es vor der Wiederholung der Bestimmung nötig, das Verfahren zur Nachkalibrierung durchzuführen.

BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Berechnung der Ergebnisse

Das System berechnet automatisch die Konzentration der in den untersuchten Proben vorliegenden Gliadin-IgG-Antikörper. Die Werte können auf dem Bildschirm eingesehen oder ausgedruckt werden.

Die Konzentrationen werden in AU/ml angegeben.

Die Konzentration des Analyten in der Probe wird berechnet, indem das erhaltene Ergebnis jeder Probe auf einer Kalibrierungskurve abgelesen wird; letztere wird mittels einer 4-Parameter-Logistic-Fitfunktion erstellt (4PL, Y erwogen) und regelmäßig entsprechend den mit der Bestimmung der Kalibratoren erhaltenen Ergebnisse korrigiert.

Detaillierte Informationen zur Berechnung der Ergebnisse durch das System finden Sie in dessen Bedienungsanleitung.

Interpretation der Ergebnisse

Der Messbereich für die quantitative Bestimmung mit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* ist: 0,0 - 200 AU/ml.

Werte unter 0,0 AU/ml sind extrapolierte Werte und können als „gleich 0,0 AU/ml“ angegeben werden.

Werte über 200 AU/ml können als „über 200 AU/ml“ angegeben oder nach geeigneter Verdünnung erneut getestet werden.

Die Ergebnisse der Proben können wie folgt interpretiert werden:

(AU/ml)	Interpretation
< 10	Die Probe ist als negativ für das Vorliegen von Gliadin-IgG-AK anzusehen.
≥ 10	Die Probe ist als positiv für das Vorliegen von Gliadin-IgG-AK anzusehen.

Die obengenannten Werte sind nur vorgeschlagene Werte. Jedes Labor muss seine eigenen Referenzbereiche erstellen.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

Für Diagnosezwecke sind die mit dem Kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* und dem Analysesystem *ZENIT RA* erhaltenen Ergebnisse zusammen mit anderen dem Arzt zur Verfügung stehenden klinischen und Labordaten zu verwenden.

Ein bakterielle Verunreinigung der Proben und Wärmeinaktivierung können das Ergebnis der Bestimmung beeinträchtigen.

Heterophile Antikörper in Humanserumproben können mit Reagenzien auf Immunglobulinbasis reagieren und so immunologische In-vitro-Bestimmungen beeinträchtigen. Solche Proben können bei Analyse mit dem Kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* zu abnormalen Werten führen.

ERWARTETE WERTE

Es wurden Proben von 100 zufällig ausgewählten Spendern untersucht, um das Vorliegen von Gliadin-IgG-Antikörpern zu überprüfen.

Von diesen Probe war 1 positiv und 99 waren negativ; der Mittelwert lag bei 1,2 AU/ml und die Standardabweichung bei 1,54 AU/ml.

Mit diesen Ergebnissen wurde die Erfassungsgrenze berechnet („Limit of Blank“, LoB = der höchste Wert, der in einer Reihe von Proben ohne den Analyten erwartet werden kann). Die Erfassungsgrenze wurde als das 95. Perzentil der negativen Bevölkerung bestimmt und liegt bei 3,7 AU/ml mit der Reagenziencharge 2.

KLINISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Mit dem Kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* wurden 62 Proben von erstmals diagnostizierten Zöliakiepatienten (durch histologische Untersuchungen bestätigt) und 104 Proben von Personen ohne Zöliakie (60 Spender, 30 Patienten mit entzündlichen und funktionellen Darmerkrankungen und 14 Patienten mit IgA-Mangel) untersucht. Alle Zöliakieproben, die 60 Spender und die 30 Patienten mit entzündlichen und funktionellen Darmerkrankungen zeigten eine Konzentration der Gesamt-IgA (bestimmt mit einer

immunnephelometrischen Methode) im Normalbereich. Die Proben mit IgA-Mangel zeigten eine Konzentration der Gesamt-IgA (bestimmt mit einer immunnephelometrischen Methode) unter 5 mg/dl.

In der mutmaßlich negativen untersuchten Population (keine Zöliakie) waren 4 Proben (3 aus der Gruppe mit Darmerkrankungen und 1 aus der Gruppe mit IgA-Mangel) positiv und 100 Proben negativ:

- **Diagnostische Spezifität: 96,2 %**

In der mutmaßlich positiven untersuchten Population (Zöliakie) waren 17 Proben negativ und 45 Proben positiv:

- **Diagnostische Sensitivität: 72,6 %**

Gemäß den Ergebnissen der diagnostischen Spezifität und Sensitivität liegt die **diagnostische Übereinstimmung bei 87,3 %**.

Darüber hinaus wurden 8 Proben von erstmals diagnostizierten Zöliakiepatienten mit IgA-Mangel untersucht: alle waren positiv für Gliadin-IgG-Antikörper.

LEISTUNGEN

Warnung: Die angegebenen Daten stellen nicht die Funktionsspezifikationen des Kits dar, sondern sind der experimentelle Nachweis dafür, wie der Kit auf die vom Hersteller vorgesehene Art innerhalb dieser Spezifikationen funktioniert.

Präzision und Wiederholbarkeit

Für die Bewertung der Präzision und Wiederholbarkeit des Kits *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* wurde ein Protokoll auf der Grundlage der Richtlinien des Dokumentes EP5-A2 der Clinical and Laboratory Standards (CLSI) verwendet.

Die **Präzision** wurde berechnet, indem die Ergebnisse von 20 Wiederholungen von vier Seren (ein negatives und drei positive mit verschiedenen Konzentrationen von Gliadin-IgG-AK), die mit zwei verschiedenen Reagenzienchargen während desselben analytischen Laufs untersucht wurden, analysiert wurden.

Die Konzentration des für Gliadin-IgG-AK negativen Serums (LOB1) lag zwischen 1,4 und 2,3 AU/ml bzw. zwischen 1,4 und 3,1 AU/ml mit den Reagenzienchargen 1 bzw. 2.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der 3 positiven Seren.

Probe	Reagenziencharge Nr.	Mittlere Konzentration (AU/ml)	SD	VK%
P1	1	18,1	0,55	3,0
	2	21,3	0,93	4,4
P2	1	32,2	0,72	2,2
	2	36,1	0,79	2,2
P3	1	62,8	1,66	2,6
	2	71,6	1,45	2,0

Die **Wiederholbarkeit** wurde berechnet, indem die Ergebnisse der einfachen Bestimmung von vier Seren (ein negatives und drei positive mit verschiedenen Konzentrationen von Gliadin-IgG-AK), durchgeführt mit zwei verschiedenen Reagenzienchargen in 15 verschiedenen Läufen, analysiert wurden.

Die Konzentration des für Gliadin-IgG-AK negativen Serums (N4) lag zwischen 0,0 und 1,1 AU/ml bzw. zwischen 0,0 und 1,0 AU/ml mit den Reagenzienchargen 1 bzw. 2.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der 3 positiven Seren.

Probe	Reagenziencharge Nr.	Mittlere Konzentration (AU/ml)	SD	VK%
P1	1	19,9	0,98	4,9
	2	21,4	1,05	4,9
P2	1	36,5	1,91	5,2
	2	38,9	1,86	4,8
P3	1	68,4	4,67	6,8
	2	70,7	4,00	5,7

Linearität der Verdünnungen

Für die Bewertung der Linearität der Verdünnungen des Kits *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* wurde ein Protokoll auf der Grundlage der Richtlinien des Dokumentes EP6-A der Clinical and Laboratory Standards (CLSI) verwendet.

Es wurden Verdünnungsreihen von 3 Seren mit hoher Konzentration von Gliadin-IgG-AK bestimmt; die Verdünnungen wurden mit dem Probenverdünnungsmittel durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Probe	Verdünnungsfaktor	Gemessene Konzentration (AU/ml)	Erwartete Konzentration (AU/ml)	Wiederfindung %
1	1	83,2	-	(100)
	2	43,7	41,6	105,0
	4	22,8	20,8	109,6
	8	11,5	10,4	110,6
	16	6,0	5,2	115,4
2	1	91,0	-	(100)
	2	44,1	45,5	96,9
	4	23,1	22,7	101,8
	8	11,9	11,4	104,4
	16	6,4	5,7	112,3
3	1	100,1	-	(100)
	2	38,2	50,0	76,4
	4	20,4	25,0	81,6
	8	10,6	12,5	84,8
	16	5,6	6,3	88,9

Es ist auf jeden Fall darauf hinzuweisen, dass möglicherweise nicht alle Seren bei Messung verschiedener Verdünnungen innerhalb des Messbereiches lineare Ergebnisse erbringen, da das Ergebnis nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Affinität der in der Probe vorliegenden Antikörper abhängt.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Kits *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG*, die als **Nachweisgrenze** (*Limit of Detection - LoD*, d.h. die geringste Menge des Analyten, die mit der Methode gemessen werden kann) angegeben wird, wurde mit einem Protokoll auf der Grundlage der Richtlinien des Dokumentes EP17-A der Clinical and Laboratory Standards (CLSI) und mit der Gleichung $LoD = LoB + C_{\beta} SD_s$ bewertet (wobei LoB die Erfassungsgrenze und SD_s die geschätzte Standardabweichung der Verteilung der Probe mit niedriger Konzentration ist und C_{β} vom 95. Perzentil der Standard-Gaußverteilung abgeleitet wird).

Es wurden 4 Proben mit niedriger Konzentration des Analyten verwendet, die in 15 verschiedenen Versuchen mit zwei verschiedenen Reagenzienchargen einfach bestimmt wurden.

Als Nachweisgrenze des Kits *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* wurde 6,0 AU/ml bestimmt.

Zusammen mit klinischen Überlegungen und den Ergebnissen von Vergleichen mit Referenzmethoden hat der Wert der Nachweisgrenze zur Definition des Cut-Off-Wertes beigetragen.

Analytische Spezifität: Interferenzen

Eine Studie auf der Grundlage der Richtlinien des Dokumentes EP7-A2 der CLSI hat gezeigt, dass das Vorliegen der nachfolgend angeführten, potentiell interferierenden Substanzen in der Probe bis zu den untersuchten Konzentrationen die Leistung des Tests nicht beeinträchtigt.

Potentiell interferierende Substanzen	Höchste untersuchte Konzentration
Freies Bilirubin	20 mg/dl
Konjugiertes Bilirubin	28 mg/dl
Hämoglobin	1000 mg/dl
Fettsäuren	3000 mg/dl

Von der Anwendung lipämischer, hämolytischer oder trüber Proben wird jedoch abgeraten.

Analytische Spezifität: Kreuzreaktionen

Um eventuelle Kreuzreaktionen des für die Sensitivierung der Magnetpartikel verwendeten Antigens zu beurteilen, wurde eine Untersuchung mit 22 Proben durchgeführt, die alle hohe Konzentrationen anderer Autoantikörper aufwiesen und negativ für Gliadin-IgG-AK waren.

Die verwendeten Proben setzten sich wie folgt zusammen: SS-A (2), SS-B (3), U1-snRNP (1), Jo-1 (2), Scl-70 (3), dsDNA (3), Cenp B (2), Histon (2), nukleolär (1), MPO (1), PR3 (1) und CCP (1).

Die Untersuchung hat keine bedeutsamen Kreuzreaktionen des Antigens in der Festphase mit den anderen Autoantikörpern gezeigt.

Sättigungseffekt bei hohen Konzentrationen

Einige immunologische Methoden können unterschätzte Werte für den Analyten anzeigen (Hook-Effekt), wenn sie zur Bestimmung von Proben mit extrem hohen Analytenkonzentrationen verwendet werden.

Da die von dem Kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* verwendete Methode eine Methode mit zwei Inkubationen ist, ist sie von diesem Effekt nicht betroffen.

Eine Probe mit einer extrem hohen Konzentration (oberhalb des Messbereiches) von Gliadin-IgG-Antikörpern hat bestätigt, dass bis zu einer Konzentration von 1970 AU/ml kein Hook-Effekt eintritt.

Relative Sensitivität und Spezifität

Das Vorliegen von Gliadin-IgG-Antikörpern wurde in 135 Proben mit dem Kit *ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG* und mit einer im Handel erhältlichen ELISA-Methode bestimmt.

Die untersuchten Proben stammten von Zöliakiepatienten bei der Erstdiagnose, von Zöliakiepatienten unter glutenfreier Ernährung, von Zöliakiepatienten und Patienten ohne Zöliakie mit IgA-Mangel und von normalen Personen.

Bei 9 Proben stimmten die Ergebnisse des ZENIT-RA-Tests und des im Handel erhältlichen Tests nicht überein.

Die **relative Übereinstimmung** ist daher 93,3 % (126/135).

Die **relative Sensitivität** ist 97,1 % (34/35).

Die **relative Spezifität** ist 92,0 % (92/100).

LITERATUR

1. Stern M, Cicilitira P, van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Mendez E, et al. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J Gastroenterology Hepatol* 2001; 13:741-7.
2. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993; 105:910-22.
3. Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M, Louka AS, Clot F, Percopo S, et al. HLA-DQ relative risk for celiac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigens* 2004; 63: 562-7.
4. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994; 342:200-3.
5. Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, et al. Prevalence of coeliac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 2003; 348: 2517-24.
6. Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Jung G, Fleckenstein B, Sollid LM. Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. *J Immunol* 2005; 175: 254-61.

7. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3: 797-801.
8. Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, Garcilazo S, Waggener M. Celiac disease: antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clin Chem* 2001; 47: 2023-8.
9. Schwertz E, Kahlenberg F, Sack U, Ritcher T, Stern M, Conrad K, et al. Serological assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. *Clin Chem* 2004; 50: 2370-5.
10. Latiff AH, Kerr MA. The clinical significance of immunoglobulin A deficiency. *Ann Clin Biochem* 2007; 44:131-9.
11. Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR, and the Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and "Club del Tenue" working groups on celiac disease. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. *Gut* 1998; 42: 362-5.
12. Roston A, Dubè C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C, et al. The diagnostic accuracy of serological test for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology* 2005; 128:S38-46.
13. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Caradonna M, Cerni L, Villalta D, et al. The role of anti-tissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of celiac disease: a French-Italian multicentre study. *J Clin Pathol* 2003; 56:389-93.
14. Berger R, Schimdt G. Evaluation of six anti-gliadin antibody assays. *J Immunol Methods* 1996; 191:77-86.
15. Basso D, Guariso G, Fogar P, Meneghel A, Zambon CF, Navaglia F, et al. Antibodies against syntetic deamidated gliadin peptides for celiac disease diagnosis and follow up in children. *Clin Chem* 2009; 55: 150-7
16. Tonutti E, Visentini D, Picierno A, Bizzarro N, Villalta D, Bozzoli R, et al. Diagnostic efficacy of the ELISA tests for the detection of deamidated anti gliadin antibodies in the diagnosis and monitoring of celiac disease. *J Clin Lab Anal.* 2009; 23(3): 172-4.



TECHNOGENETICS S.r.l.
Viale Casiraghi 471
20099 – Sesto San Giovanni (MI)
Italien

AUSTRIA

Vertrieb durch

A. Menarini G.m.b.H
Pottendorfer Strasse, 25-27 - A - 1120 Wien
Tel. +43 1 80 41 5760 - Fax +43 1 80 43 194
www.menarinidiagnostics.at

GERMANY

Vertrieb durch

A. Menarini Diagnostics Deutschland
Eine Division der Berlin-Chemie AG
Glienicke Weg 125 - 12489 Berlin
Tel. +49 30 67 07 30 00 - Fax +49 30 67 07 30 20
www.menarinidiagnostics.de