

Arbeitsanleitung/Manual

anti-htTG slgA ELISA

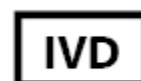
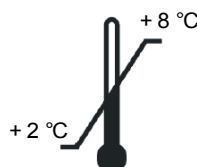
*Zur in vitro Bestimmung der anti-humanen
Gewebetransglutaminase slgA Antikörper in Stuhl*

*For the in vitro determination of anti-human tissue
transglutaminase slgA antibodies in stool*

Gültig ab / Valid from 25.03.2011



K 9393



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
1. VERWENDUNGSZWECK	5
2. EINLEITUNG	5
3. TESTPRINZIP	5
4. INHALT DER TESTPACKUNG	7
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	7
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	8
7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	8
8. PROBENVORBEREITUNG	9
9. TESTDURCHFÜHRUNG	9
HINWEISE	10
PIPETTIERSHEMA	11
10. ERGEBNISSE	12
11. QUALITÄTSKONTROLLE	12
ERWARTETE ERGEBNISSE	12
12. TESTCHARAKTERISTIKA	13
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	13
13. LITERATUR	13
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14

Tabel of content	Page
1. INTENDED USE	17
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	17
4. MATERIAL SUPPLIED	19
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	20
7. PRECAUTIONS	20
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	21
9. ASSAY PROCEDURE	22
PROCEDURAL NOTES	22
TEST PROCEDURE	23
10. RESULTS	24
11. QUALITY CONTROL	24
EXPECTED VALUES	24
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	25
13. REFERENCES	25
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung der anti-humanen **Gewebetransglutaminase slgA-Antikörpern** aus Stuhl. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Dieterich und Mitarbeiter identifizierten 1997 die **Gewebstransglutaminase** (tTG = tissue transglutaminase) als das Hauptantigen der Endomysium-Antikörper, die charakteristisch für die Zöliakie sind.

Bei den meisten Zöliakie-Patienten liegen häufig mehrere Funktionsstörungen vor, wie z.B. Malabsorption, Unfruchtbarkeit, Osteoporose und verzögertes Wachstum bei Kindern.

Es gibt zahlreiche Berichte über eine Reihe anderer Autoimmunerkrankungen, die mit einer Zöliakie assoziiert sind. Dazu gehören Dermatitis herpetiformis Duhring, Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis, IgA-Nephritis, neuro-psychiatrische Störungen, Hashimoto-Thyreoditis / M. Basedow und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von bösartigem T-Zell-lymphom.

Da die Prävalenz zöliakieassoziierter Autoimmunerkrankungen meistens hoch ist, wird empfohlen, die Autoantikörper gegen **Gewebstransglutaminase** als Marker für Zöliakie zu bestimmen.

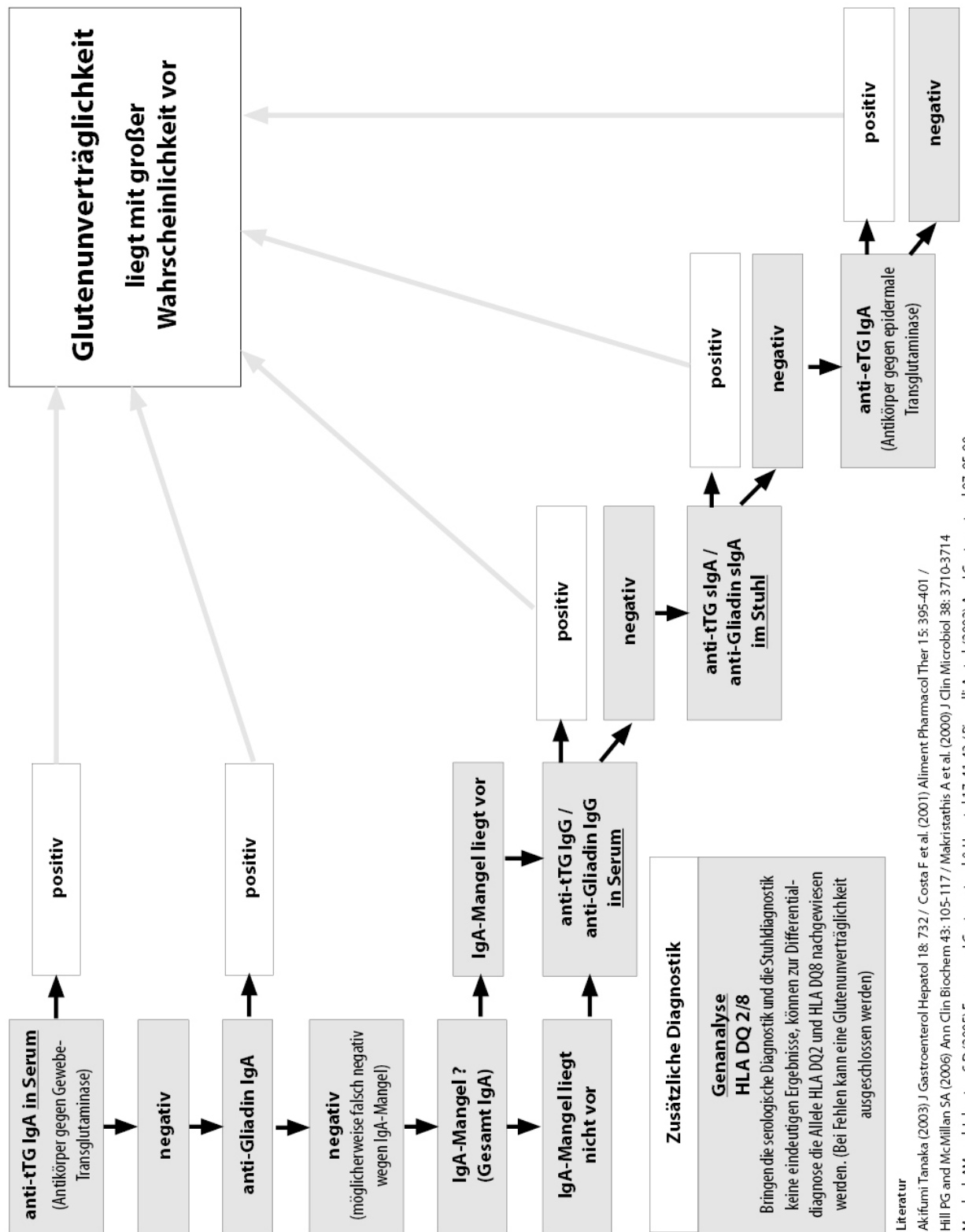
Indikationen

- Autoimmunerkrankungen
- Nahrungsmittelunverträglichkeiten
- Siehe auch unseren Vorschlag für Stufendiagnostik bei Verdacht auf Glutenunverträglichkeit auf Seite 6.

3. TESTPRINZIP

Das Antigen Transglutaminase ist auf einer Mikrotiterplatte fixiert. Die in der Probe vorhandenen Anti-htTG-slgA-Antikörper binden in einem Inkubationsschritt an das Antigen. Nach einem Waschschrift wird mit einem POD-markierten anti-htTG-slgA-Antikörpermischung detektiert. Die gebundene Peroxidase-Menge ist direkt proportional den Anti-ht Transglutaminase-slgA-Antikörpern. Als Substrat wird TMB eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

Unser Vorschlag zur Stufendiagnostik bei Verdacht auf Glutenunverträglichkeit (Laborbeitrag):



Literatur

Akifumi Tanaka (2003) J Gastroenterol Hepatol 18: 732 / Costa F et al. (2001) Aliment Pharmacol Ther 15: 395-401 / Hill PG and McMillan SA (2006) Ann Clin Biochem 43: 105-117 / Makristathis A et al. (2000) J Clin Microbiol 38: 3710-3714 / Murdock AM and Johnston S D (2005) European J Gastroenterol & Hepatol 17: 41-43 / Picarelli A et al. (2002) Am J Gastroenterol 97: 95-98

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 9393MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet (einzeln abbrechbare Kavitäten)	12 x 8 Vertiefungen
K 9393WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 9393K	CONJ	Konjugat (Peroxidase-markiert), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9393KO1	CTRLNEG	Kontrollen negativ, lyophilisiert	4 vials
K 9393KO2	CTRLPOS	Kontrollen positiv, lyophilisiert	4 vials
K 9393CK	CTRLCUTOFF	Cut-off Kontrolle, lyophilisiert	4 vials
K 9393TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9393AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm

*Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25°C (≤18,2 MΩ cm).

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

Der verdünnte Waschpuffer dient als Extraktionspuffer (siehe Probenvorbereitung, Punkt 8).

- Die lyophilisierten **CTRLNEG, CTRLPOS und CTRLCUTOFF** (Kontrollen, negativ, positiv bzw. cut-off) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für die Kontrollen sind dem Datenblatt zu entnehmen. Rekonstituierte Kontrollen können **nicht** aufbewahrt werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlprobenextraktion

1a. Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 0,75 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	0,75 ml
Verdünnungsfaktor:	1:50

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **0,75 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) Das Röhrchen solange mischen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres „einweichen“ (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.

- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens (türkiser Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Bei dem Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

1b. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim (Best. Nr. 10 745 804 322)

Alternativ kann ein anderes Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet werden. Bei dem Roche Probenvorbereitungssystem werden 100 mg Stuhlprobe in 5 ml Extraktionspuffer mit Hilfe eines Vibrationsmischers (z. B. Vortex) homogenisiert. Anschließendes Zentrifugieren wird empfohlen.

Verdünnungsfaktor: 1:50

100 µl des Überstandes (**1a. oder 1b.**) werden in den Test eingebracht.

Stuhlsuspensionen können nicht gelagert werden.

Rohstuhlproben können bei -20°C 4 Wochen gelagert werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Kontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Pipettierschema

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.

Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden.

Die PLATE (vorbeschichtete Mikrotiterplatte) vor Gebrauch **5x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl CTRLNEG, CTRLPOS und CTRLCUTOFF** (Kontrollen, negativ, positiv bzw. cut-off) und vorbereitete **SAMPLE** (Proben) pro Vertiefung pipettieren.
2. **2 Stunden** bei **2–8 °C** inkubieren.
3. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100 µl** CONJ (Konjugat) in jede Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei **2–8 °C** inkubieren.
6. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **100 µl** SUB (TMB-Substratlösung) pro Vertiefung pipettieren.
8. **15-25 Minuten** (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubieren.*
9. **50 µl** STOP (Stopplösung) pro Vertiefung zusetzen und kurz mischen.
10. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von **450 nm** messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (**STD**) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von **405 nm** wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

10. ERGEBNISSE

$$\text{Cut off} = 100 \text{ U/l} = OD_{\text{Cut-off Kontrolle}}^*$$

***Die gekennzeichneten Parameter können bei automatisierter Abarbeitung abweichend angegeben werden müssen. Bitte sprechen Sie hierzu den Hersteller an.**

Beispiel cut off

Proben, die eine höhere mittlere optische Dichte haben als die OD der Cut-off Kontrolle, sind somit positiv.

Beispiel positive Patientenprobe

Patienten Extinktion = 0.685

Extinktion_{Cut-off Kontrolle} = 0.234 = 100 U/l

$$X = \frac{0.685 * 100}{0.234} = 292.7 \text{ U/l}$$

Die Berechnung gilt nur für eine Stuhlprobenverdünnung von 1:50.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen oder Stuhl Pools bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Proben nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

Stuhl: < 100 U/l

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Zwei Proben wurden 20-mal in einem anti-ht-Transglutaminase-slgA-Antikörper-ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 20

Probe	Anti-htTG-slgA-Ak / Mittelwert [U/l]	Intra-Assay Vk [%]
1	160.9	5.7
2	83.4	9.8

Inter-Assay-Variation

Es wird die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen geprüft. Zwei Proben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im anti-ht-Transglutaminase-slgA-Antikörper-ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 12

Probe	Anti-htTG-slgA-Ak / Mittelwert [U/l]	Inter-Assay Vk [%]
1	134.8	12.2
2	41.6	16.4

13. LITERATUR

1. Dieterich et al.: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. (1997) NatMed 7(3)
2. Rieken et al.: Gewebettransglutaminase als Autoantigen bei der einheimischen Sprue. (1998) Dtsch.med.Wschr.123, 1454-1460
3. Green et al.: The Diagnosis of celiac disease 1998. (1998) Clinical Perspectives Gastroenterology.
4. Mothes: Zöliakie-Bedeutung von Transglutaminasen und Autoantikörpern. (1997) Münch.med. Wschr.139.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren verwendet wurden, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/ Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen nur zur *in vitro* Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller- der Immundiagnostik AG zurück zu senden.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

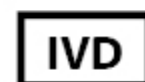
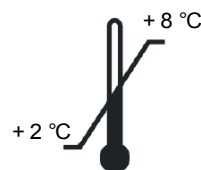
anti-htTG sIgA ELISA

*For the in vitro determination of anti-human tissue
transglutaminase sIgA antibodies in stool*

Valid from 25.03.2011



K 9393



Immundiagnostik AG

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of **anti-human tissue Transglutaminase slgA antibodies** in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Dieterich et al. have shown, that tissue **transglutaminase** (tTG) is the predominant endomysial auto antigen characteristic for celiac disease.

In most celiac patients, usually several disorders are observed, e.g. malabsorption, infertility, osteoporosis and delayed growth of children. But it has also been widely reported that celiac disease is associated with a whole series of autoimmune diseases like Dermatitis herpetiformis Duhring, Diabetes mellitus, rheumatoid Arthritis, IgA-nephritis, neuro-psychiatric disorders, Hashimoto-Thyreoditis / M. Basedow and an increased risk of developing malignant T cell lymphoma.

Because the prevalence of associated autoimmune diseases in most cases is high, it is advisable to determine the auto antibodies against tissue **transglutaminase** (tTG) as a marker for celiac disease.

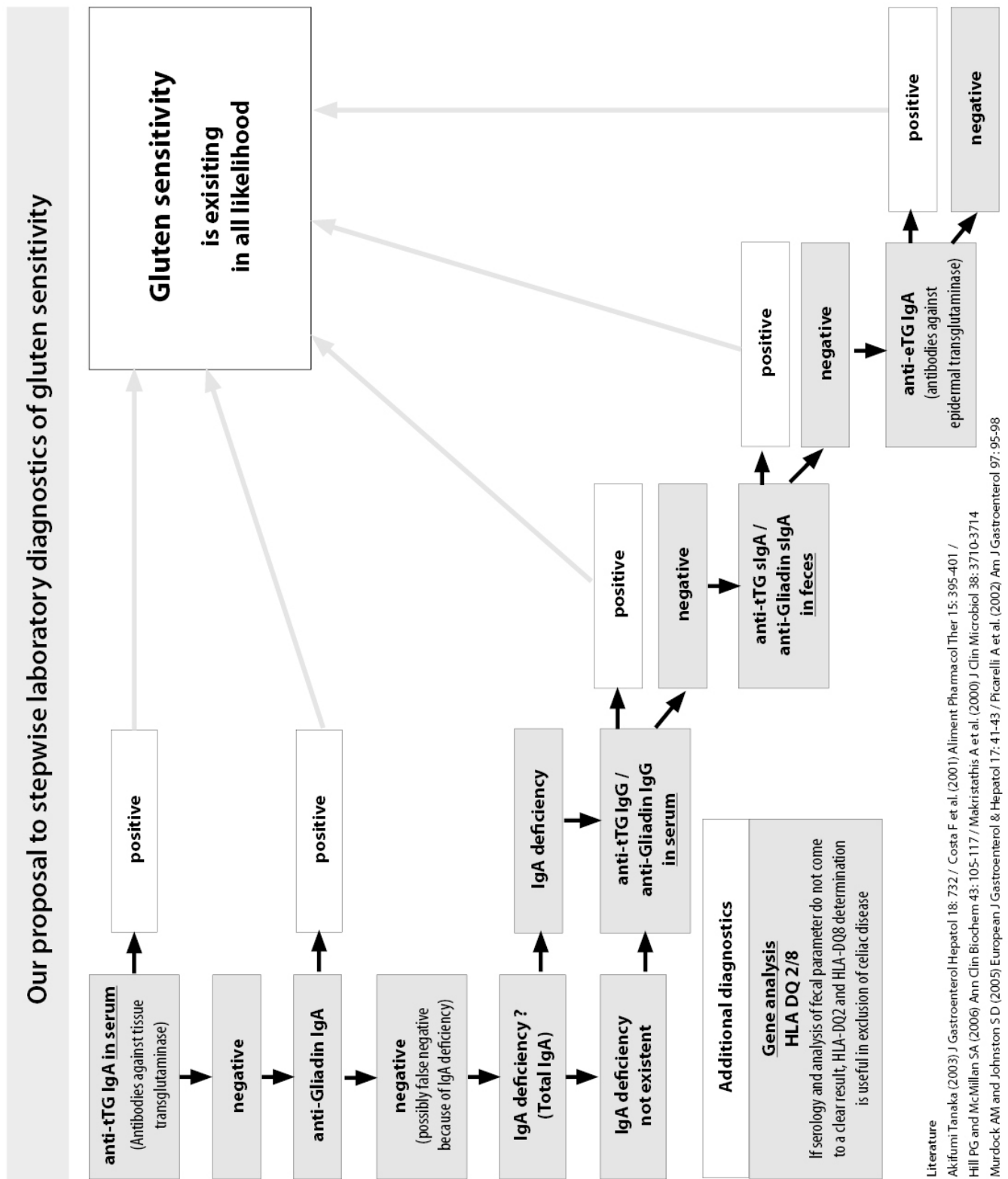
Indication

- Autoimmune disease
- Food intolerance

See also our proposal for stepwise diagnosis of gluten sensitivity on page 18.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay** (ELISA) is used for semi-quantitative determination of anti-htTG slgA antibodies in faeces. In a first incubation step, the anti-htTG slgA antibodies in the sample are bound to their antigen (human, recombinant Transglutaminase), which is immobilized to the surface of the microtiter plates. To remove all unbound foreign substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a POD-labeled slgA antibody mix is added. After another washing step, to remove all unbound antibodies, the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stop solution is then added to stop the reaction. The color converts from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the amount of bound antibodies and can be determined photometrically at 450 nm.



4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 9393MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 9393WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 9393K	CONJ	Conjugate (Peroxidase-labeled), ready to use	1 x 15 ml
K 9393KO1	CTRLNEG	Control negative, lyophilized	4 vials
K 9393KO2	CTRLPOS	Control positive, lyophilized	4 vials
K 9393CK	CTRLCUTOFF	Cut-off Control, lyophilized	4 vials
K 9393TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	1 x 15 ml
K 9393AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm

*Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25°C (≤18.2 MΩ cm).

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be dissolved at 37°C using a water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** could be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
The diluted wash buffer is used as extraction buffer (see Sample preparation, Point 8).
- The lyophilized **CTRLNEG, CTRLPOS and CTRLCUTOFF** (controls, negative, positive and cut-off) are stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Reconstitution details are given in the data sheet. Diluted controls are not stable and cannot be stored.
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C.**

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

8. SAMPLE PREPARATION

Extraction of the stool sample

1a. Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instruction for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the used amount of stool sample and the volume of the buffer.

SAS with 0.75 ml Buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	0.75 ml
Dilution Factor:	1:50

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw Stool Sample has to be thawed. For remarkably inhomogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) **Fill the empty sample tube** with **0.75 ml** of ready-to-use extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert yellow dipstick into sample. The lower part of the dipstick exhibits notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off and leave 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for app. 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for app. 10 minutes until sediment has settled down. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the turquoise ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure, the sediment will not be dispersed again.

1b. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany (Cat. No. 10 745 804 322)

Alternatively, other stool sample preparation kits (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) can be used. In the Roche sample preparation kit, 100 mg of stool sample are suspended in 5 ml of extraction buffer using a vibrator mixer (e.g. Vortex mixer). Centrifugation of the suspension is recommended.

Dilution Factor: **1:50**

100 µl of the resulting supernatant (**1a. or 1b.**) is used for the assay.

The stool suspension is not stable and cannot be stored.

Raw stool can be stored at –20°C for 4 weeks. Avoid thawing and freezing cycles.

9. ASSAY PROCEDURE*Procedural notes*

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components have been defined by the producer. Any variations of the test procedure, without consulting the producer, may influence the test results. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well.

Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

Wash the PLATE (precoated microtiter plate) 5 x with 250 µl ELISA diluted wash buffer. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.

Carry out the tests in duplicate.

1. Add **100 µl** of **CTRLNEG, CTRLPOS and CTRLCUTOFF** (controls, negative, positive and cut-off) and diluted **SAMPLE** (patient samples).
2. Incubate for **2 hours** at **2-8 °C**.
3. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer.
4. Add **100 µl** of CONJ (conjugate).
5. Incubate for **1 hour** at **2-8 °C**.
6. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250µl** ELISA wash buffer.
7. Add **100 µl** SUB (TMB substrate solution).
8. Incubate for **15 - 25 minutes** at room temperature.*
9. Add **50 µl** STOP (stop solution) and mix shortly.
10. Determine **absorption** immediately with an ELISA reader at **450 nm**. If the highest extinction of the standards (**STD**) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

10. RESULTS

Calculation

$$\text{Cut off} = 100 \text{ U/l} = OD_{\text{Cut off control}}^*$$

***The labeled parameters may need to be changed when running the test on automated systems. Please contact the producer for details.**

For example: cut off

Samples with a mean extinction higher than the OD of the cut off control are positive.

For example : positive patient

Patient extinction = 0.685

Extinction_{Cut off control} = 0.234 = 100 U/l

$$X = \frac{0.685 * 100}{0.234} = 292.7 \text{ U/l}$$

The calculation is for stool dilution of 1:50.

11. QUALITY CONTROL

Control samples or stool pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of control samples, should be evaluated for plausibility using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable range, the results for the patient sample may not be valid.

Expected values

htTG-sIgA-antibodies in stool <100 U/l

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik anti-ht Transglutaminase-slgA-antibody-ELISA test was calculated from 20 replicate determinations on each one of two samples.

Intra-Assay CV n= 20

Sample	htTG-slgA Ab mean value [U/l]	Intra-Assay CV [%]
1	160.9	5.7
2	83.4	9.8

The reproducibility of the results of two samples on different days was tested. The two samples were measured by different technicians on different days using the anti-ht Transglutaminase-slgA-antibody-ELISA test.

Inter-Assay CV n= 12

Sample	htTG-slgA Ab mean value [U/l]	Inter-Assay CV [%]
1	134.8	12.2
2	41.6	16.4

13. REFERENCES

1. Dieterich et al.: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. (1997) NatMed 7(3)
2. Rieken et al.: Gewebettransglutaminase als Autoantigen bei der einheimischen Sprue. (1998) Dtsch.med.Wschr.123, 1454-1460
3. Green et al.: The Diagnosis of celiac disease 1998. (1998) Clinical Perspectives Gastroenterology.
4. Mothes: Zöliakie-Bedeutung von Transglutaminasen und Autoantikörpern. (1997) Münch.med. Wschr.139.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- All reagents in the kit package are for research use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number