

anti-htTG IgA ELISA

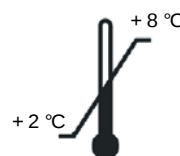
Zur in vitro Bestimmung von anti-human-Gewebetransglutaminase IgA Antikörpern in Serum und Plasma

For the in vitro determination of anti-human -tissue-Transglutaminase IgA antibodies in serum and plasma

Gültig ab/valid from 20.05.2011



K 9399



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

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

1. INTENDED USE	15
2. PRINCIPLE OF THE TEST	15
3. MATERIAL SUPPLIED	16
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
6. PRECAUTIONS	19
7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	19
8. ASSAY PROCEDURE	19
PROCEDURAL NOTES	19
TEST PROCEDURE	20
9. RESULTS	21
10. LIMITATIONS	21
11. QUALITY CONTROL	21
EXPECTED VALUES	21
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	22
13. TECHNICAL HINTS	23
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **anti humaner Gewebetransglutaminase IgA Antikörpern** aus Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung der anti-Gewebetransglutaminase Antikörper IgA (anti-htTG IgA). In einem ersten Inkubationsschritt werden die Antikörper aus der Probe an das auf der Platte fixierte Antigen gebunden. Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion der gebundenen IgA anti-Gewebetransglutaminase Antikörper durch Zugabe eines Konjugats, eines peroxidase-markierten Antikörpers (POD-AK). Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung beendet. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem anti-Gewebetransglutaminase IgA Antikörper-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Indikationen

- Siehe unseren Vorschlag für Stufendiagnostik bei Verdacht auf Gluten-unverträglichkeit auf Seite 6.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

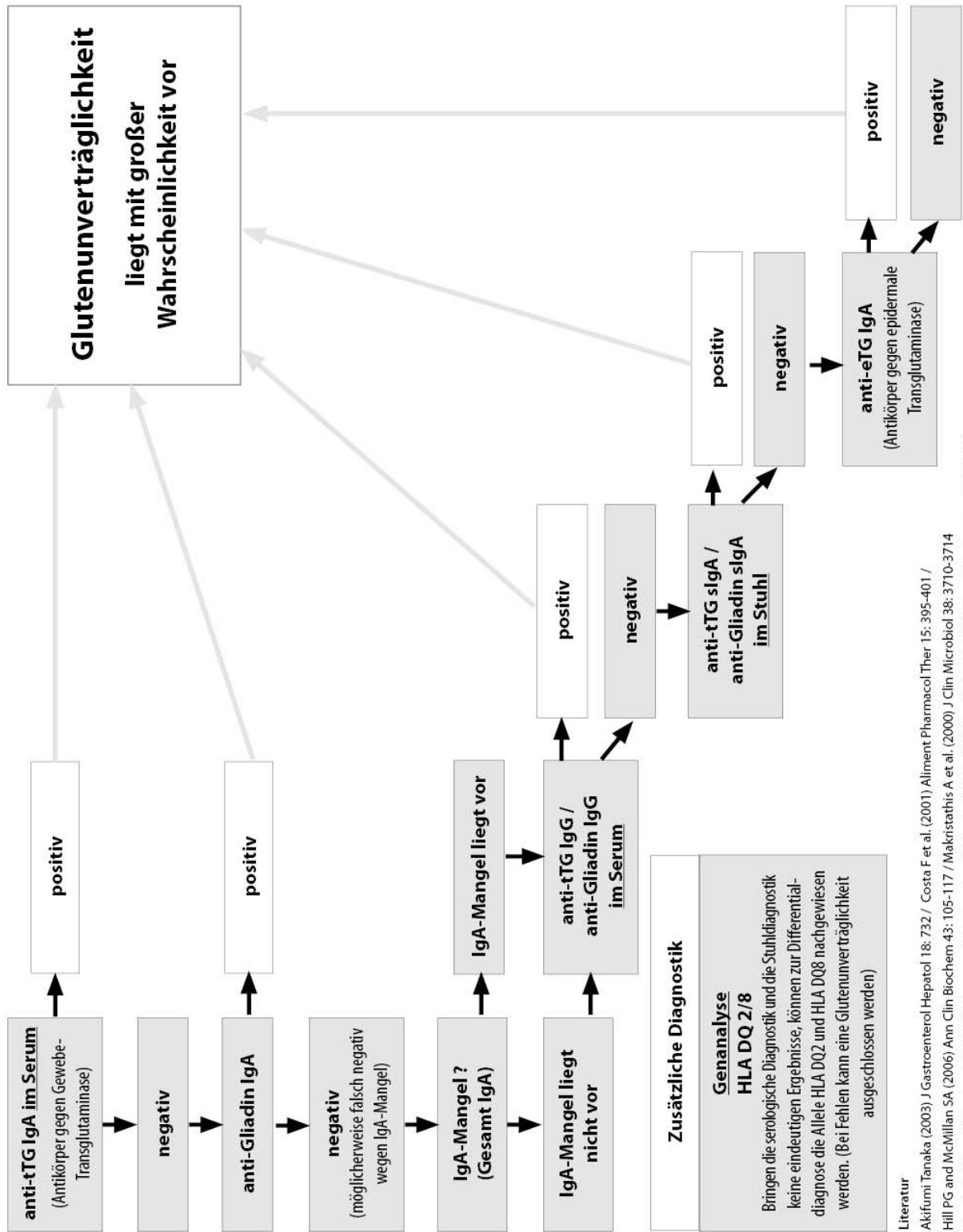
Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 9399MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9399WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 9399ST	STD	htTG-Standards, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9399KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9399KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9399K	CONJ	Konjugat (Kaninchen anti IgA, Peroxidase-markiert)	1 x 200 µl
K 9399TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9399AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

4. 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 0,055µS/cm bei 25°C (≤18,2MΩ cm).

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



5. 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 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) 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.
- Das **CONJ** (Konjugat, peroxidase-markiert) wird **1:101** in Waschpuffer verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das **unverdünnte CONJ** ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Konjugatlösung kann nicht aufbewahrt werden**.
- **Der lyophilisierte STD** (Standard) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der Standard und Kontrollen werden mit jeweils **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Kontrollen und Standard können nicht gelagert und weiter verwendet werden**.

Die Herstellung der **Standardkurve** (Volumina und Konzentrationen) ist der beiliegenden Produktspezifikation zu entnehmen.

- Alle Testreagenzien sind bei 2-8°C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw.

Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

- 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.

7. VORBEREITUNG DES PROBENMATERIALS

Serum/Plasma

Serum und Plasma werden **1:250** mit Waschpuffer in 2 Schritten verdünnt.

Beispiel:

Verdünnungsschritt 1: 10 µl Serum + 90 µl Waschpuffer

Verdünnungsschritt 2: 40 µl Verdünnung 1 + 960 µl Waschpuffer

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen während den Inkubationen mit Folie abdecken.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien vermeiden.
- Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.

Pipettierschema

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte **vor Gebrauch 5x mit 250 µl** Waschpuffer waschen. Bestimmungen in Doppelwerten durchführen.

1. **100 µl STD** (Standards), **CTRL** (Kontrollen) und **vorbereitete Proben** pro Vertiefung pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100 µl verdünntes CONJ** (Konjugat, Peroxidase-markiert) in jede Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln 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. **10 – 20 Minuten** 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.

9. ERGEBNISSE

Berechnung

Da die Probenverdünnung (1:250) in der Standardkurve bereits berücksichtigt wurde ist der Verdünnungsfaktor gleich 1.

Falls die Proben anders als angegeben verdünnt werden, muss der Verdünnungsfaktor bei der Auswertung gesondert berechnet werden, z. B. bei einer Verdünnung von 1:1000 müssen die ermittelten Messwerte mit 4 multipliziert werden.

10. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit anti-htTG IgA Konzentration höher als der höchste Standard, werden mit Waschpuffer weiter verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Erwartete Ergebnisse

Vorläufiger Normwert

Serum: > 22 AU/ml positiv

Serum: < 16 AU/ml negativ

Serumwerte zwischen 16 und 22 AU/ml liegen im Graubereich.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

Zur Vermeidung von unnötigen Biopsien sollten tTG-IgA-Titer im Graubereich nach 3-6 Monaten kontrolliert werden, und Biopsien nur bei Titeranstieg durchgeführt werden. Die Korrelation von Alter und Titerhöhe bei Kindern mit negativen tTG-IgA wurde bisher noch nicht beschrieben, altersnormierte Grenzwerte können daher sinnvoll sein.*

*21. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung, Bremen, 3.-6. Mai 2006, Symposia Abstracts, M. Melter & M. Claßen (Ed.), P. 30, A.8.
Einfluss von Alter und genetischem Risiko auf t-Transglutaminaseautoantikörper, Vecsei AKW, Koletzko S et al.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von einer Probe innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Die Probe wurden 64-mal von einer Person angesetzt und gemessen.

Intra-Assay VK n= 64

Probe	IgA anti-heTG Mittelwert [AU/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	83,81	4,1

Inter-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben wurde an unterschiedlichen Tagen von verschiedenen Personen geprüft. Die Proben wurden 15- bzw. 17-mal gemessen.

Inter-Assay VK n= 15/17

Probe	IgA anti-heTG Mittelwert [AU/ml]	Inter-Assay Vk [%]
1 (n=15)	15,74	13,7
2 (n=17)	68,04	15,4

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien soll vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen nur zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. 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

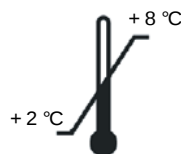
anti-htTG IgA ELISA

For the in vitro determination of anti-human-tissue-Transglutaminase IgA antibodies in serum and plasma

Valid from 20.05.2011



K 9399



Immundiagnostik AG

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the determination of human **anti-tissue-Transglutaminase-IgA antibodies** in serum and plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme Immuno Assay is a sandwich assay for the quantitative determination of anti-tissue transglutaminase antibodies (IgA anti-htTG). The wells of the microtiter plate are coated with the antigen. In a first incubation step, the anti-htTG IgA antibodies are bound to the coated antigen. To remove all unbound substances, a washing step is carried out.

In a further incubation step, a peroxidase-labeled antibody is added. After another washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the peroxidase substrate, tetramethylbenzidine (TMB). Finally, an acidic stop solution is added to terminate the enzymatic reaction, whereby the colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the IgA anti-tissue-transglutaminase antibody concentration. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. IgA anti-tissue-transglutaminase antibodies present in the samples are determined directly from this curve.

Indication

- See our proposal for stepwise diagnosis of gluten sensitivity on page 17.

3. MATERIAL SUPPLIED

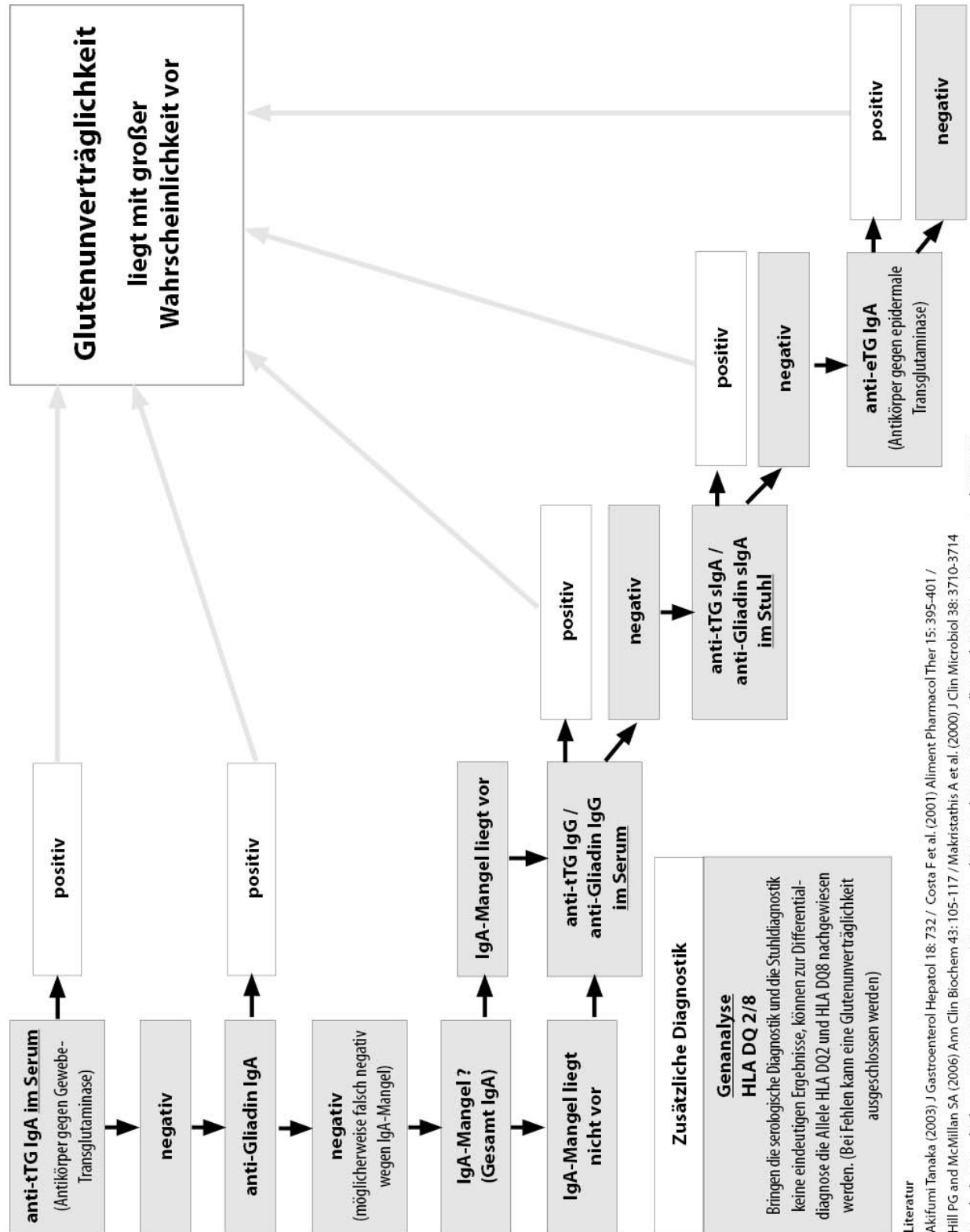
Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 9399MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 9399WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 9399ST	STD	htTG-standards lyophilized	4 x 1 vial
K 9399K01	CTRL	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K 9399K02	CTRL	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K 9399K	CONJ	Conjugate (rabbit-anti-IgA antibody, peroxidase labeled)	1 x 200 µl
K 9399TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 9399AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 10-1000 µl
- Covering foil for the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker with 37 °C incubator
- 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 0,055µS/cm at 25°C (≤18,2MΩ cm).

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



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 **WASHBUF** (wash buffer concentrate) 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 re-dissolved at 37°C in 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** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The undiluted conjugate is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and cannot be stored.**
- The lyophilized **STD** (standard) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes at room temperature, and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. The undiluted standard and controls are stable at **2-8 °C** until expiry date stated on the label. **Diluted standard and controls are not stable and cannot be stored.**

The preparation of the **standard curve** (volumes and concentrations) is described in the product specification.

- 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**.

6. 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, all kit components should be handled 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.
- 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.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum/Plasma

Dilute serum and plasma **1:250** in ELISA wash buffer in two dilution steps.

Example:

Dilution step 1: **10 µl serum + 90 µl wash buffer**

Dilution step 2: **40 µl dilution 1 + 960 µl wash buffer**

8. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Perform assay always according the enclosed manual.

Test procedure

Wash the precoated microtiter plate 5 x with 250 µl ELISA wash buffer. Carry out the tests in duplicate.

1. Add **100 µl** of **STD** (standards), **CTRL** (controls) and **diluted samples** per well.
2. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
3. Decant the plate content and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer.
4. Add **100 µl** of diluted **CONJ** (conjugate, peroxidase labeled anti-IgA antibody) into each well.
5. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
6. Decant the plate content and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer.
7. Add **100 µl SUB** (TMB substrate solution).
8. Incubate for **10 - 20 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.

9. RESULTS

Calculation

Since the sample dilution of 1:250 is already considered in the calibration curve, the dilution factor is 1.

If a sample dilution different from 1:250 has been used, a corresponding dilution factor must be considered, e.g., at a dilution of 1000 the results must be multiplied by 4.

10. LIMITATIONS

Samples with IgA anti-htTG levels higher than the highest standard should be further diluted with wash buffer and re-assayed.

11. QUALITY CONTROL

Controls should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of controls, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality controls are outside the acceptable limits.

Expected values

htTG IgA Serum cut off > 22 AU/ml positive

htTG IgA Serum cut off < 16 AU/ml negative

Results between 16 - 22 AU/ml are in the grey range.

We recommend each laboratory to establish its own normal range.

In order to avoid unnecessary biopsies, tTG-IgA titers within the grey zone should be controlled after 3 - 6 months. Biopsies should be performed only in case of increased tTG-IgA titers. Until now, there is no information on correlation between age and titer level in children with negative tTG-IgA values. Age-normalized threshold values could be useful.*

*21. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung, Bremen, 3.-6. Mai 2006, Symposia Abstracts, M. Melter & M. Claßen (Ed.), P. 30, A.8. Einfluss von Alter und genetischem Risiko auf t-Transglutaminaseautoantikörper, Vecsei AKW, Koletzko S et al.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay-Variation

The intra-assay variation of the assay was calculated from 64 determinations of one sample by one person.

Intra-Assay CV n = 64

Sample	IgA anti-htTG mean value [AU/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	34,12	5,2

Inter-Assay-Variation

The inter-assay variation of the assay was calculated from data on 2 samples obtained in 15 or 17 determinations by different persons on two different days.

Inter-Assay CV n = 15/17

Sample	IgA anti-htTG mean value [AU/ml]	Inter-Assay CV [%]
1 (n=15)	15,74	13,7
2 (n=17)	68,04	15,4

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

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.
- All reagents in the kit package are for *in-vitro* diagnostics only.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- 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.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number