

anti-htTG IgA ELISA

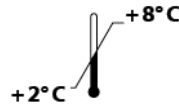
Zur in-vitro-Bestimmung von IgA-Antikörpern gegen humane Gewebetransglutaminase in Serum und Plasma

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

Gültig ab / Valid from 2015-08-20



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

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. TESTPRINZIP	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Pipettierschema</i>	<i>5</i>
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Vorläufige Referenzwerte</i>	<i>7</i>
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	<i>8</i>
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	8
13. TECHNISCHE MERKMALE	9
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	9

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. TESTPRINZIP

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung der anti-Gewebetransglutaminase-IgA-Antikörper (anti-htTG IgA). In einem ersten Inkubationsschritt werden die Antikörper aus der Probe an das auf der Platte fixierte Antigen gebunden. Nach einem Waschschritt erfolgt die Detektion der gebundenen anti-Gewebetransglutaminase-IgA-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

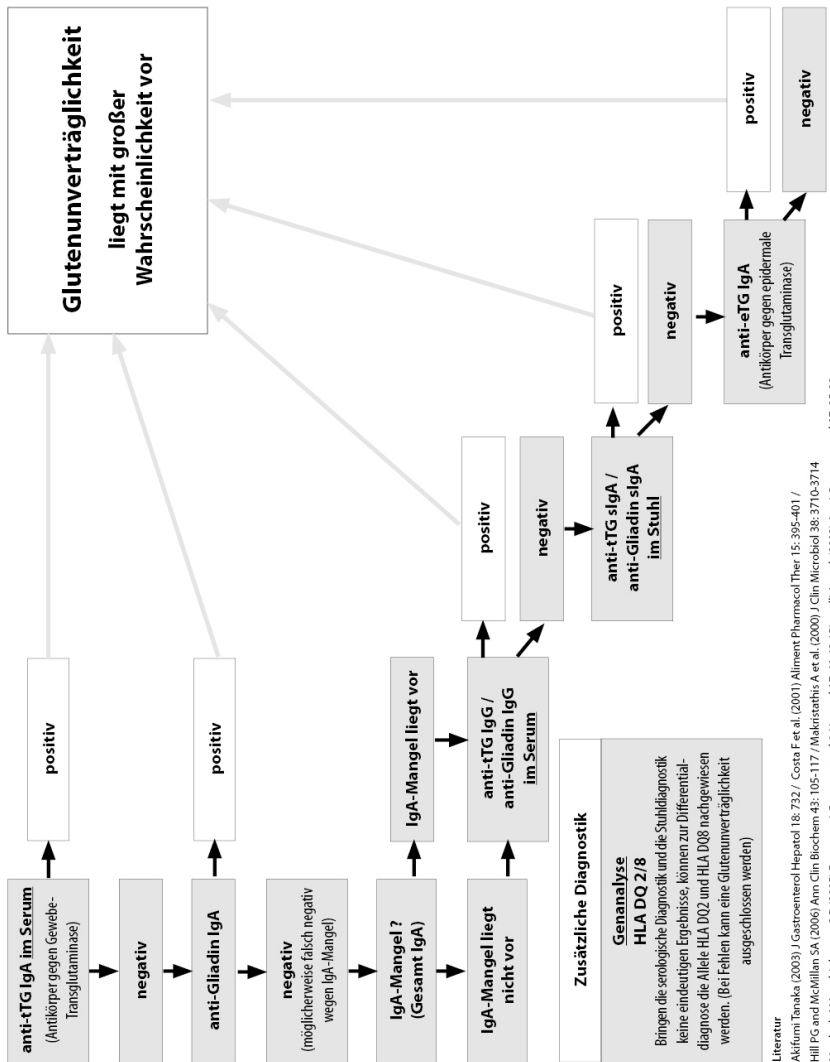
- Siehe unseren Vorschlag für Stufendiagnostik bei Verdacht auf Glutenunverträglichkeit auf Seite 3.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	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-Standard, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9399KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9399KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
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

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



4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer

* 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).

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 kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 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** (Waschpuffer) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Das **Konjugat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- Die **lyophilisierten STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutions-

vorgaben für die Standards und Kontrollen sind dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**

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

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

6. PROBENVORBEREITUNG

Serum und Plasma

Serum und Plasma werden in zwei Schritten **1:1000 mit Waschpuffer** verdünnt. Zum Beispiel:

1. **10 µl Serum + 90 µl Waschpuffer = Verdünnung I (1:10)**
2. **10 µl Verdünnung I + 990 µl Waschpuffer = Verdünnung II (1:100)**

Dies resultiert in einer **Endverdünnung von 1:1000**.

100 µl der Verdünnung II werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Pipettierschema

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

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1.	100 µl STD (Standards), CTRL (Kontrollen) und vorbereitete Proben pro Vertiefung pipettieren.
2.	1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln 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 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.	100 µl STOP (Stopplösung) pro Vertiefung zusetzen und kurz mischen.
10.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das

verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Serum-/Plasmaproben

Die Probenverdünnung (1:1000) ist in der Standardkurve bereits berücksichtigt. Falls die Proben anders als angegeben verdünnt werden, muss der **Verdünnungsfaktor** bei der Auswertung gesondert berechnet werden, z. B. müssen die ermittelten Messwerte bei einer Verdünnung von 1:4000 mit 4 multipliziert werden.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

Vorläufige Referenzwerte

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 Referenzbereich 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.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 64)

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

Probe	IgA anti-htTG Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	83,81	4,1

Inter-Assay (n = 15/17)

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

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

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin 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 benutzt 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 Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.
- 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.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- 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. 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



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Verwendbar bis

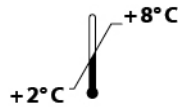
anti-htTG IgA ELISA

*For the in vitro determination of
anti human tissue transglutaminase IgA antibodies
in serum and plasma*

Valid from 2015-08-20



K 9399



Immundiagnostik AG

Table of Contents

1. INTENDED USE	13
2. PRINCIPLE OF THE TEST	13
3. MATERIAL SUPPLIED	13
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	15
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	16
7. ASSAY PROCEDURE	16
<i>Test procedure</i>	16
8. RESULTS	17
9. LIMITATIONS	18
10. QUALITY CONTROL	18
<i>Reference range</i>	18
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	18
<i>Precision and reproducibility</i>	18
12. PRECAUTIONS	19
13. TECHNICAL HINTS	19
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	20

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 immunoassay 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.

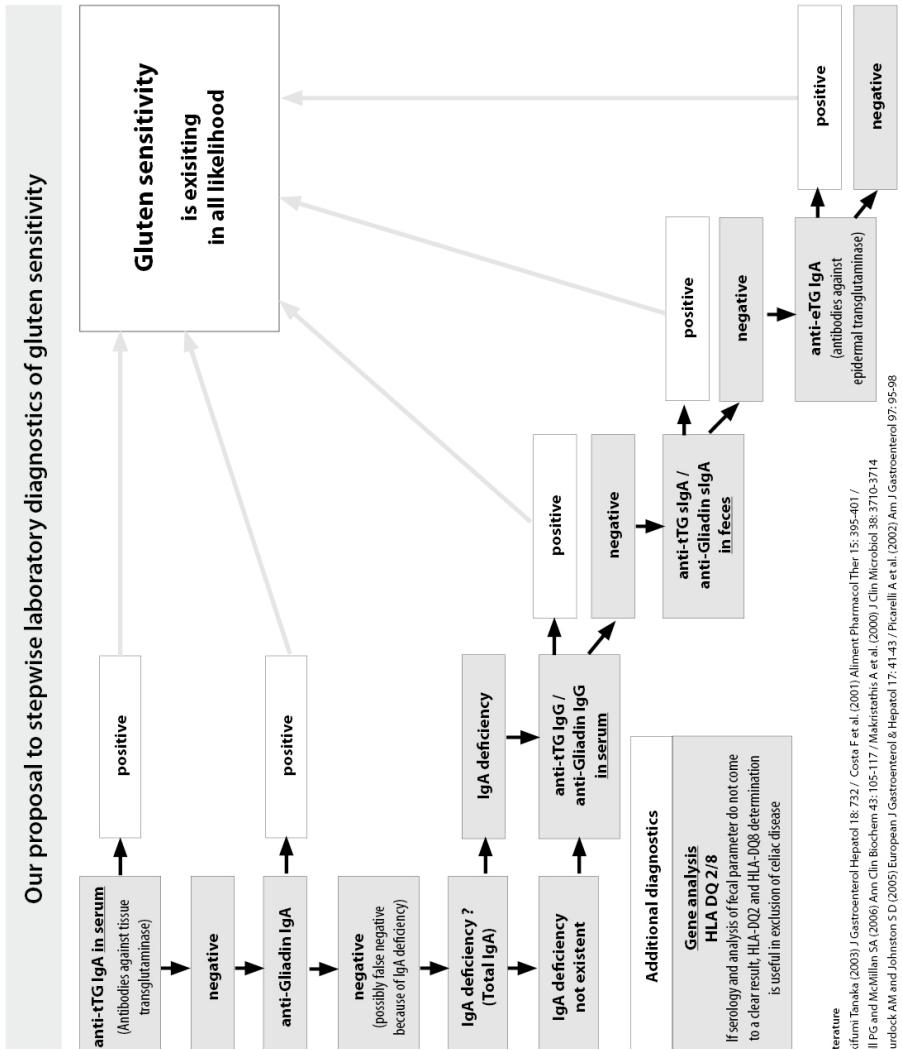
Indications

- See our proposal for stepwise diagnosis of gluten sensitivity on page 14

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9399MTP	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 9399WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 9399ST	STD	htTG-standard lyophilized (see specification for concentrations)	4 x 1 vial
K 9399K01	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 x 1 vial
K 9399K02	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 x 1 vial
K 9399K	CONJ	Conjugate (rabbit anti-IgA antibody, peroxidase-labeled)	1 x 200 µl

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
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



literature

ofumi Tanaka (2003) J Gastroenterol Hepatol 18: 732 / Costa F et al. (2001) Aliment Pharmacol Ther 15: 395-401 / Il'PG and McMillan SA (2006) Ann Clin Biochem 43: 105-117 / Makrisstabis A et al. (2000) J Clin Microbiol 38: 3710-3714 urdock 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. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker with 37°C incubator
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader

* 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 the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** 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 **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37 °C 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** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- The **conjugate** (CONJ) 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 standards** (STD) and **controls** (CTRL) are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Diluted standards and controls are not stable and cannot be stored.**

The preparation of the **standard curve** (volumes and concentrations) is de-

scribed in the product specification.

- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum and plasma

Dilute serum and plasma 1:1000 in ELISA wash buffer in two dilution steps.

For example:

- **10 µl** serum + **90 µl** wash buffer, mix well = **dilution I** (1:10)
 - **10 µl** dilution I + **990 µl** wash buffer, mix well = **dilution II** (1:100)
- This results in a final dilution of 1:1000.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution II** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Test procedure

Wash the pre-coated microtiter plate **5 x with 250 µl ELISA wash buffer before use**. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be tapped on absorbent paper.

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 at room temperature (15–30 °C) shaking on a horizontal mixer.
3.	Discard 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 at room temperature shaking on a horizontal mixer.
6.	Discard 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 (15–30 °C)*.
9.	Add 100 µl STOP (stop solution) and mix shortly.
10.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the “4 parameter algorithm”.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the paired values should be evaluated manually.

Serum / plasma samples

The sample dilution of 1:1000 is already considered in the calibration curve.

If a different sample dilution has been used, a corresponding dilution factor must be considered, e.g., at a dilution of 1:4000 the results must be multiplied by 4.

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard should be further diluted and re-assayed.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, 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 control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

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 area.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

In order to avoid unnecessary biopsies, tTG-IgA titers within the grey area 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.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 64)

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

Sample	IgA anti-htTG mean value [AU/ml]	CV [%]
1	34.12	5.2

Inter-Assay (n = 15/17)

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.

Sample	IgA anti-htTG mean value [AU/ml]	CV [%]
1 (n = 15)	15.74	13.7
2 (n = 17)	68.04	15.4

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Control samples should be analyzed with each run.
- 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 Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch as wells from

already opened microtiter plates are exposed to different conditions than sealed ones.

- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on 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 distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by