

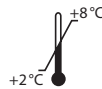
# anti-htTG sIgA ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von sIgA-Antikörpern gegen  
humane Gewebetransglutaminase in Stuhl*

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

Gültig ab / Valid from 2015-03-25

**REF** K 9393



**IVD** **CE**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
<b>6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG</b>	<b>6</b>
<i>Lagerung</i>	6
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	6
<i>Probenverdünnung</i>	7
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>7</b>
<i>Testprinzip</i>	7
<i>Pipettierschema</i>	8
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>9</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>9</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>9</b>
<i>Referenzwerte</i>	10
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>10</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>11</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>12</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>12</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung der anti-humanen Gewebstransglutaminase sIgA-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 / Morbus Basedow und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von bösartigem T-Zell-Lymphom.

Da die Prävalenz zöliakieassoziiertes 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 4

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9393	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet (einzeln abbrechbare Kavitäten)	12 x 8 Vertiefungen
K 9393	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 9393	CONJ	Konjugat (peroxidase markiert), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9393	CTRLNEG	Kontrollen negativ, lyophilisiert	4 vials

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9393	CTRLPOS	Kontrollen positiv, lyophilisiert	4 vials
K 9393	CTRLCUTOFF	Cut-off Kontrolle, lyophilisiert	4 vials
K 9393	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9393	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9393	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5x	1 x 100 ml

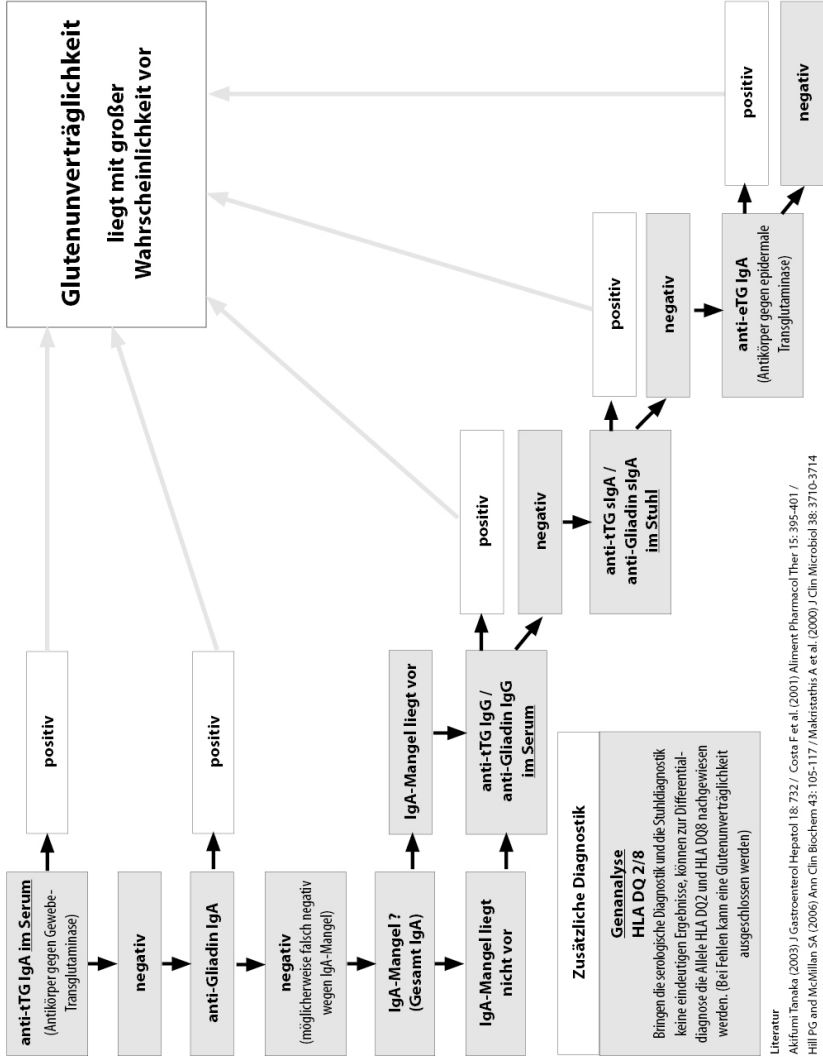
Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Mikrotiterplattenschüttler
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

\* 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).

**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 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an-zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** 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 bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Der **WASH-BUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml *IDK Extract®* + 150 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 **IDK Extract®** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract®*) ist bei **2–8 °C drei Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **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.

## 6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

### Lagerung

#### Rohstuhl

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

#### Stuhlsuspensionen

Stuhlextrakt kann bei 2–8°C oder -20°C für 3 Tage gelagert werden, bei Raumtemperatur (15–30°C) für einen Tag. Der Extrakt sollte maximal drei Einfrier-/ Auftauzyklen unterzogen werden.

### Stuhlprobenextraktion

Der verdünnte Extraktionspuffer *IDK Extract*® wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

#### 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 1,5 ml Puffer:**

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	1,5 ml
Verdünnungsfaktor:	1:100

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

- Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer *IDK Extract*® **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- Röhrchen aufschrauben (orangefarbenes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstecken 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 (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

## **Verdünnung I                      1:100**

### *Probenverdünnung*

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:50 mit Waschpuffer** weiterverdünnt. Zum Beispiel:

- **20 µl** Überstand (Verdünnung I) + **980 µl** Waschpuffer, mischen = **1:50 (Verdünnung II)**. Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von **1:5 000**.

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

## **7. TESTDURCHFÜHRUNG**

### *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 peroxidase markierten anti-slgA-Antikörper detektiert. Die gebundene Peroxidase menge ist direkt proportional zur Konzentration der anti-htTG-slgA-Antikörper. Als Substrat wird TMB eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden.



### Pipettierschema

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die **Raumtemperatur** (15–30 °C) aufweisen. Reagenzien und Proben vor Gebrauch 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.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte <b>vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen</b> . Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
2.	<b>100 µl CTRLNEG, CTRLPOS</b> und <b>CTRLCUTOFF</b> (Kontrollen, negativ, positiv bzw. cut-off) und vorbereitete <b>SAMPLE</b> (Proben) pro Vertiefung pipettieren.
3.	<b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
4.	Den Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen</b> . Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
5.	<b>100 µl Konjugat</b> in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	<b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
7.	Den Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen</b> . Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8.	<b>100 µl SUB</b> (TMB-Substratlösung) pro Vertiefung pipettieren.
9.	<b>10–20 Minuten</b> (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubieren.*
10.	<b>100 µl STOP</b> (Stopplösung) pro Vertiefung zusetzen und kurz mischen.

- |     |   |
|-----|---|
| 11. | <p><b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion eines Messwerts den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.</p> |
|-----|---|

\* 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

Proben, deren mittlere optische Dichte höher liegt als die der Cut-Off-Kontrolle, sind positiv.

$$\text{Cut-Off} = \text{OD}_{\text{Cut-Off-Kontrolle}} = 100 \text{ U/l}$$

### Beispiel

$$\text{OD}_{\text{Patientenprobe}} = 0,685$$

$$\text{OD}_{\text{Cut-Off-Kontrolle}} = 0,234 = 100 \text{ U/l}$$

$$\text{Konzentration Patientenprobe} = \frac{0,685 * 100 \text{ U/l}}{0,234} = 292,7 \text{ U/l}$$

**Achtung:** Berechnung gilt nur für eine Stuhlprobenverdünnung von **1:5000**.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{LoB} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert 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.

## Referenzwerte

Eine laborinterne Studie mit Stuhlproben von augenscheinlich gesunden Erwachsenen (n = 45) ergab einen Referenzwert von **< 100 U/l**.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Präzision und Reproduzierbarkeit

#### Intra-Assay (n = 20)

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

Probe	Anti-htTG-slgA-AK Mittelwert [U/l]	VK [%]
1	160,9	5,7
2	83,4	9,8

#### Inter-Assay (n = 12)

Die Reproduzierbarkeit der Messungen 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.

Probe	Anti-htTG-slgA-AK Mittelwert [U/l]	VK [%]
1	134,8	12,2
2	41,6	16,4

### Analytische Sensitivität

Die Leerwert-Obergrenze (*limit of blank*, LoB) wurde gemäß der Richtlinie CLSI EP17-A2 bestimmt und ist 32,9 U/l.

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet 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.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen 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.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- 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.

## 15. LITERATUR

1. Dieterich, W. et al., 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature medicine*, **3**(7), pp.797–801.

### Verwendete Symbole:

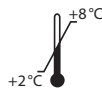
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis

# anti-htTG sIgA ELISA

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

Valid from 2015-03-25

**REF** K 9393



**IVD** **CE**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>15</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>17</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>18</b>
<i>Sample storage</i>	18
<i>Extraction of the stool samples</i>	18
<i>Dilution of samples</i>	19
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>19</b>
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Test procedure</i>	20
<b>8. RESULTS</b>	<b>21</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>21</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>21</b>
<i>Reference range</i>	22
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>22</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	22
<i>Analytical Sensitivity</i>	22
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>22</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>23</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>23</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>24</b>

## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of anti-human tissue Transglutaminase sIgA 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 trans-glutaminase (tTG) as a marker for celiac disease.

### Indications

- Autoimmune disease
- Food intolerance

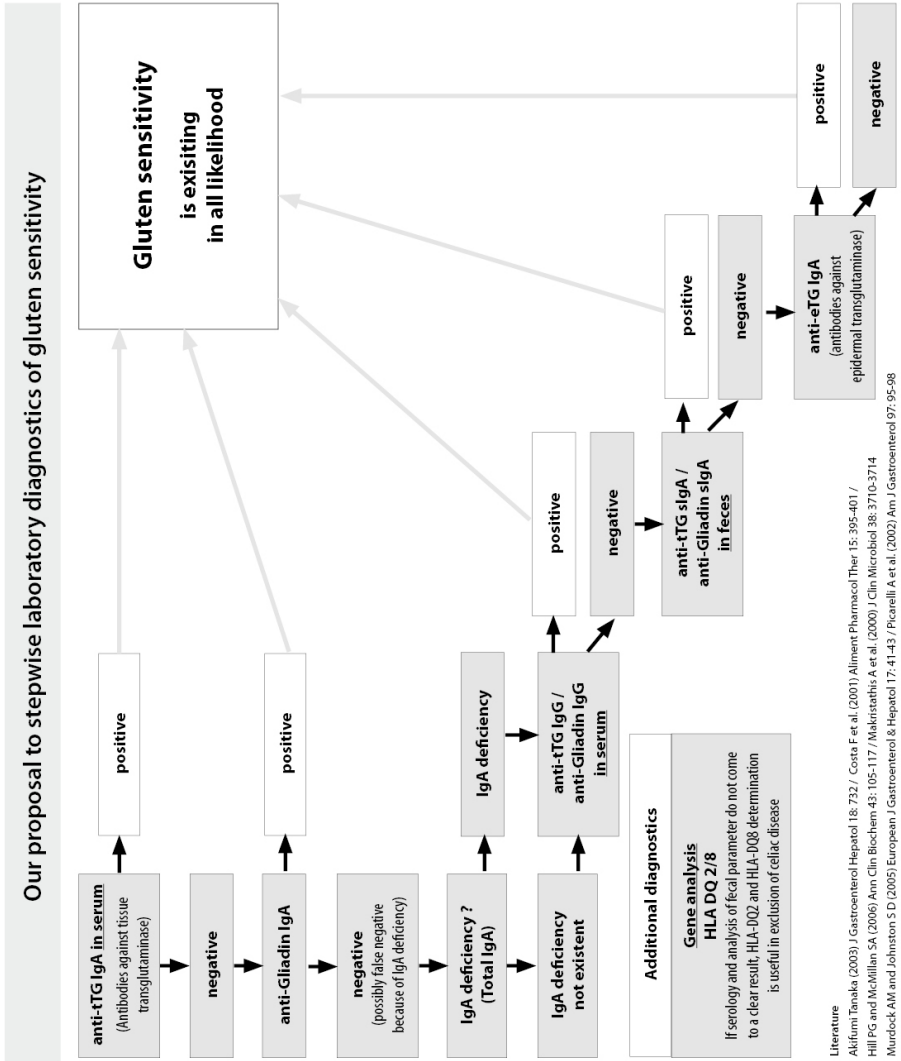
See also our proposal for stepwise diagnosis of gluten sensitivity on page 16.

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9393	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 9393	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 9393	CONJ	Conjugate (peroxidase-labeled), ready to use	1 x 15 ml
K 9393	CTRLNEG	Control negative, lyophilized	4 vials
K 9393	CTRLPOS	Control positive, lyophilized	4 vials
K 9393	CTRLCUTOFF	Cut-off Control, lyophilized	4 vials
K 9393	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine)	1 x 15 ml
K 9393	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml
K 9393	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x	1 x 100 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.





#### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water\*
- Horizontal microtiter plate shaker
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

\* 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 MΩcm).

#### 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **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 redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate IDK Extract®** must be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals must be redissolved at 37 °C in a water bath. The **IDK Extract®** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract®*) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for three months**.

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

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *Sample storage*

#### **Raw stool**

Raw stool samples can be stored for 4 weeks at -20 °C. Avoid repeated freezing and thawing.

#### **Stool suspensions**

Stool extract can be stored for 3 days at 2–8 °C or -20 °C or for one day at room temperature (15–30 °C). Avoid more than three freeze-thaw cycles.

### *Extraction of the stool samples*

**Diluted IDK Extract® extraction buffer** is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

#### **Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)**

##### ***Stool sample tube – Instructions for use***

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

##### ***SAS with 1.5 ml extraction buffer:***

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	1.5 ml
Dilution Factor:	1:100

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 particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.

- b) Fill the **empty sample tube** with **1.5 ml** of ready to use *IDK Extract*<sup>®</sup> extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (orange part of cap) to open. Insert yellow dipstick into sample. The lower part of the dipstick has 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, leaving 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 ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

**Dilution I:                      1:100**

### *Dilution of samples*

The suspension from the sample extraction (dilution I) is further diluted **1:50 with wash buffer**. For example:

- **20 µl** dilution I + **980 µl** wash buffer, mix well = **1:50 (dilution II)**  
This results in a final dilution of **1:5 000**.

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

## **7. ASSAY PROCEDURE**

### *Principle of the test*

This ELISA is used for semi-quantitative determination of anti-htTG sIgA antibodies in faeces. In a first incubation step, the anti-htTG sIgA 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 peroxidase-labeled sIgA antibody mix is added. After another washing step, to remove all unbound antibodies, the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine. 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.

### *Test procedure*

Prior to use in the assay, allow all reagents and samples to come to **room temperature** (15–30 °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.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash the pre-coated microtiter plate <b>5 x with 250 µl ELISA wash buffer before use</b> . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be tapped on absorbent paper.
2.	Add <b>100 µl</b> of <b>CTRLNEG</b> , <b>CTRLPOS</b> and <b>CTRLCUTOFF</b> (controls, negative, positive and cut-off) and diluted <b>SAMPLE</b> (patient samples).
3.	Incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker.
4.	Decant the content of the plate and wash the wells <b>5 x with 250 µl</b> wash buffer.
5.	Add <b>100 µl conjugate</b> in each well.
6.	Incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker.
7.	Decant the content of the plate and wash the wells <b>5 x with 250 µl wash buffer</b> .
8.	Add <b>100 µl SUB</b> (TMB substrate solution).
9.	Incubate for <b>10–20 minutes</b> at room temperature*.
10.	Add <b>100 µl STOP</b> (stop solution) and mix shortly.

- |     |   |
|-----|---|
| 11. | Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of one sample exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> 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

Samples with an optical density higher than the average optical density of the cut off control are positive.

$$\text{Cut off} = \text{OD}_{\text{cut off control}} = 100 \text{ U/l}$$

### Example

$$\text{OD}_{\text{patient sample}} = 0.685$$

$$\text{OD}_{\text{cut off control}} = 0.234 = 100 \text{ U/l}$$

$$\text{Concentration patient sample} = \frac{0.685 * 100 \text{ U/l}}{0.234} = 292.7 \text{ U/l}$$

**Attention:** Calculation is only valid for a sample dilution factor of **1:5000**.

## 9. LIMITATIONS

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

$$\text{LoB} \times \text{sample dilution factor to be used}$$

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

## 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

Based on an internal study with apparently healthy adults (n = 45) resulted in a reference value of < 100 U/l.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Precision and reproducibility

#### Intra-Assay (n = 20)

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

Sample	anti-htTG-sIgA mean value [U/l]	CV [%]
1	160.9	5.7
2	83.4	9.8

#### Inter-Assay (n = 12)

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 sIgA antibody ELISA.

Sample	anti-htTG-sIgA mean value [U/l]	CV [%]
1	134.8	12.2
2	41.6	16.4

### Analytical Sensitivity

The LoB (limit of blank) was evaluated according to the guideline CLSI EP17-A2 and resulted in 32.9 U/l.

## 12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are 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.
- 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.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Quality control guidelines should be observed.
- 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.
- Do not mix plugs and caps from different 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.

## 15. REFERENCES

1. Dieterich, W. et al., 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature medicine*, **3**(7), pp.797–801.

### 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