

Anti Epidermale Transglutaminase IgA ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung von Anti-e-Transglutaminase IgA
Antikörpern (anti-TG_e) aus Serum und Plasma*

*For the in vitro determination of anti-e-Transglutaminase IgA
antibodies (anti-TG_e) in serum and plasma*

Gültig ab/valid from 27.07.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 9396

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C



Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
1. VERWENDUNGSZWECK	4
2. TESTPRINZIP	4
3. INHALT DER TESTPACKUNG	4
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
6. HINWEISE UND VORSICHTSMABNAHMEN	6
7. VORBEREITUNG DES PROBENMATERIALS	6
8. TESTDURCHFÜHRUNG	7
HINWEISE	7
PIPETTIERSCHEMA	7
9. ERGEBNISSE	8
10. EINSCHRÄNKUNGEN	8
11. QUALITÄTSKONTROLLE	8
ERWARTETE ERGEBNISSE	9
12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	9

Table of Content	Page
1. INTENDED USE	11
2. PRINCIPLE OF THE TEST	11
3. MATERIAL SUPPLIED	11
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	12
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	12
6. PRECAUTIONS	13
7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	13
8. ASSAY PROCEDURE	14
PROCEDURAL NOTES	14
TEST PROCEDURE	14
9. RESULTS	15
10. LIMITATIONS	15
11. QUALITY CONTROL	15
EXPECTED VALUES	16
12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	16

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **Anti-epidermaler Transglutaminase IgA** aus Serum und Plasma. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur qualitativen Bestimmung der anti-epidermalen Transglutaminase Antikörpern IgA (anti-TG_e IgA). In einem ersten Inkubationsschritt wird der Antikörper aus der Probe an das auf der Platte fixierte Antigen gebunden. Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion des gebundenen anti-epidermalen Transglutaminase Antikörpers durch Zugabe eines Konjugats (POD-AK). Die gebundene Enzymmenge ist dem anti-TG_e Antikörpergehalt direkt proportional. Die Auswertung erfolgt über Positiv/Negativ Kontrolle.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
K 9396MTP	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9396WP	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 9396KO1	Kontrolle negativ, lyophilisiert	4 vials
K 9396KO2	Kontrolle positiv, lyophilisiert	4 vials
K 9396K	POD Antikörper, (Kaninchen anti IgA, Peroxidase-markiert)	1 x 200 µl
K 9396TMB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9396AC	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 1,5 ml Reaktionsgefäße (z.B. Eppendorf)
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 50 - 1000 µl
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortexer
- ELISA-Reader
- Mikrotiterplattenschüttler

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Beim Mehrfachansatz der Platte ist bitte darauf zu achten, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert werden und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden.**
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** muss vor Gebrauch **1:10** in Aqua dest. verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Aqua dest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist 1 Monat bei 2 – 8 °C stabil.
- Der **Peroxidase-markierte Antikörper** wird **1:100** in Waschpuffer verdünnt (100 µl Antikörper in 10 ml Puffer pipettieren). Der **unverdünnte Peroxidase-markierte Antikörper** ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Antikörperlösung** kann nicht aufbewahrt werden.

- Die **lyophilisierten Kontrollen** müssen mit **500 µl Waschpuffer** rekonstituiert werden. Um eine vollständige Lösung der rekonstituierten Standards und Kontrollen zu gewährleisten müssen sie mindestens **10 min** bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen stehen bleiben. **Die rekonstituierten Kontrollen können nicht aufbewahrt werden.**
- Alle Testreagenzien sind bei 2-8°C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind 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 Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure 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 insgesamt **1:250** mit Waschpuffer verdünnt.

Beispiel:

Die Verdünnung wird in 2 Verdünnungsschritten durchgeführt.

Verdünnungsschritt 1: 10 µl Serum + 90 µl Waschpuffer

Verdünnungsschritt 2: 40 µl Verdünnung 1 + 960 µl Waschpuffer

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumen 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 abzarbeiten.

Pipettierschema

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte **vor Gebrauch 5x mit 250 µl** Waschpuffer waschen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl** Kontrollen und vorverdünnte Patientenseren 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** vorverdünnter Peroxidase-markierten Antikörper 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** TMB-Substratlösung pro Vertiefung pipettieren.
8. **5 - 15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. **50 µl** Stopplösung pro Vertiefung zusetzen und kurz mischen.
10. Die Extinktion wird **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) gemessen. Sollte die Extinktion der positiv Kontrolle den Messbereich des Photometers übersteigen, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

9. ERGEBNISSE

$$\begin{aligned} & \text{Mittelwert OD der negativ Kontrolle} * \text{Faktor (siehe Datenblatt)} \\ & = \text{cut off} = 18 \text{ AU/ml} \end{aligned}$$

Beispiel cut off

$$0.104 * 2.5 \text{ (Faktor Datenblatt)} = 0.260 \text{ (cut off)} = 18 \text{ AU/ml}$$

Der cut off wird im Rechenbeispiel bei 0.260 festgelegt.

Proben die eine höhere mittlere optische Dichte haben sind somit positiv.

Beispiel positive Patientenprobe

Patienten Extinktion = 0.685

$$0.260 = 18 \text{ AU/ml}$$

$$0.685 = X \quad X = \frac{0.685 * 18}{0.260} = 47.4 \text{ AU/ml}$$

10. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit anti-TG_E Konzentration größer der positiven Kontrolle sei, wird diese mit Puffer verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen die Kontrollen oder Pools, bei jedem Testansatz mit zumessen. 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

Vorläufiger Normwert

Serum: < 18 AU/ml

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humansenen verwendet wurde, 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. Natriumazid ist 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 ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, 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.

Anti Epidermale Transglutaminase IgA ELISA Kit

*For the in vitro determination of anti-e-Transglutaminase IgA
antibodies (anti-TG_e) in serum and plasma*

Valid from 27.07.2005

Catalogue No.: K 9396

Package size: 96 Tests/96 determinations

Storage: 2 - 8 °C



1. INTENDED USE

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

2. PRINCIPLE OF THE TEST

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

In a further incubation step, Peroxidase-labeled antibody is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, Tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stopping solution is then added. The color converts to yellow. The results are to determine by cut off.

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Kit Components	Quantity
K 9396MTP	One holder with precoated strips	8 x 12 wells
K 9396WP	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 9396K01	Control negative, lyophilized	4 vials
K 9396K02	Control positive, lyophilized	4 vials
K 9396K	POD antibodies (rabbit-anti-IgA antibody, peroxidase labeled)	1 x 200 µl
K 9396TMB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 9396AC	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 7 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1,5 ml test tubes (e.g. Eppendorf)
- Deionized water
- Precision pipettors calibrated to deliver 50-1000 µl
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- ELISA-Reader
- Microtiter plate reader

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- The **ELISA wash buffer concentrate** should be diluted with Aqua dest. **1:10** before use (add 900 ml aqua. dest. to 100 ml concentrate). Crystals could occur due to high salt concentration. The crystals have to be resuspended **before dilution of the buffer solutions** using a water bath (37°C). The buffer concentrates are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted solutions can be stored at 2-8°C for 1 month.
- The **POD antibody** has to be diluted **1:100** in ELISA wash buffer (100 µl POD antibody and 10 ml ELISA wash buffer). The antibody is stable at 2 –8 °C until expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- The **controls** (positive and negative) have to be reconstituted freshly with **500 µl wash buffer**. Allow the vial to stand for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstituion. Reconstituted **controls are not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready for use. The test reagents are stable up to the date of expiry (see label of test package) when stored at 2-8 °C.

6. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- The calibrators and controls contain human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2 or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- The stop solution consists of diluted sulfuric 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 removed immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated kit label.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum/Plasma

Serum and plasma have to be diluted 1:250 in ELISA wash buffer.

Example:

The dilution has to be carried out/taken in two dilution steps.

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.
- 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 with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage.
- Conduct the assay according to the manual delivered with the kit.

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** control solutions and prediluted patient samples per well.
2. Incubate for **1 hour** at room temperature, shaking on a horizontal mixer.
3. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer.
4. Add **100 µl** of prediluted, peroxidase-labeled anti-IgA antibody into each well.
5. Incubate for **1 hour** at room temperature, shaking on a horizontal mixer.
6. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer.
7. Add **100 µl** of TMB-substrate solution into each well.

8. Incubate for **5 -15 minutes** at room temperature.
9. Add **50 µl** of stop solution into each well and mix shortly.
10. Determine absorption with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the high control exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as reference.

9. RESULTS

Calculation

$$\begin{aligned} & \text{mean OD negative reference sera} * \text{Factor(See data sheet)} \\ & = \text{cut off} = 18 \text{ AU/ml} \end{aligned}$$

For example: cut off

$$0.104 \times 2.5 \text{ (factor data sheet)} = 0.260 \text{ (cut off)} = 18 \text{ AU/ml}$$

The cut off OD of the calculation example is 0.260.

Samples with a mean OD higher than the negative reference sera are positive:

For example: positive patient

Patient sample extinction = 0.685

$$0.520 = 18 \text{ AU/ml}$$

$$0.685 = X$$

$$X = \frac{0.685 * 18}{0.520} = 47.4 \text{ AU/ml}$$

10. LIMITATIONS

Samples with hTG_e IgA levels greater than the positive control should be diluted and re-assayed.

11. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercially control samples as internal quality control.

Control samples or 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

Preliminary hTG_e IgA serum cut off value <18 AU/ml

12. 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.
- The test components which are made of human serum are tested for Australia antigen and HIV and found to be negative. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent; these reagents should be handled as recommended as potentially infectious material. The normal precautions for laboratory working should be observed.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package should only be used for in vitro diagnostics.
- The reagents should not be used after the date of expiry (see label on the test package).
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- For quality control, the guidelines for medical laboratories should be observed.
- The characteristic test data, such as incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.

10/10/2005 eTG IgA27072005