

## ELISA Kit

# Anti Gewebetransglutaminase IgA

*Zur in vitro Bestimmung von anti-Gewebetransglutaminase IgA  
Antikörpern (anti-tTG) in Serum und Plasma*

# Anti tissue Transglutaminase IgA

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

Gültig ab/valid from 06.09.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 9399

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C



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)

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

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

## 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 qualitativen Bestimmung der anti-Gewebetransglutaminase Antikörper IgA (anti-tTG 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-Gewebetransglutaminase Antikörpers durch Zugabe eines Peroxidase-Konjugats (POD-AK). Die gebundene Enzymmenge ist dem anti-tTG Antikörpergehalt direkt proportional. Die Auswertung erfolgt über Positiv/Negativ Kontrolle.

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
K 9399MTP	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9399WP	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 9399KO1	Kontrolle negativ, lyophilisiert	4 vials
K 9399KO2	Kontrolle positiv, lyophilisiert	4 vials
K 9399K	POD Antikörper, (Kaninchen anti IgA, Peroxidase-markiert)	1 x 200 µl
K 9399TMB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9399AC	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 5 - 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 oder 405 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

#### 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 zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnen (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), 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. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der **Peroxidase-markierte Antikörper** wird **1:100** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 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** werden mit **500 µl Waschpuffer** rekonstituiert und zur vollständigen Lösung mindestens **10 min** bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen stehen gelassen. **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

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die 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** Kontrollen und vorverdünnte Patientenseren pro Vertiefung pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur (21 –26 °C) 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** verdünnten 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. **10 - 20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. **50 µl** Stopplösung pro Vertiefung zusetzen und kurz mischen.
10. Extinktion **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Meßbereich des Photometers übersteigen, sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) messen.

## 9. ERGEBNISSE

*Mittelwert OD der negativ Kontrolle \* Faktor(siehe Datenblatt)*  
*= cut off = 18 AU/ml*

### Beispiel cut off

0.104 \* 2.5 (Faktor Datenblatt) = 0.260 (cut off) = 18 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

Extinktion Patientenprobe = 0.685

0.260 = 18 AU/ml

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

## 10. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit anti-tTG Konzentrationen, größer als die der positiven Kontrolle, sollen mit Waschpuffer verdünnt und nochmals bestimmt.

## 11. QUALITÄTSKONTROLLE

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

## 12. 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 ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet 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.

18.01.2006 tTG IgA\_10012005.DOC

# Anti Tissue Transglutaminase IgA

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

Valid from 06.09.2005

Catalogue No.: K 9399

Package size: 96 Determinations

Storage: 2 - 8 °C



## 1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative 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 determination of anti-tissue transglutaminase antibodies (anti-tTG IgA) in serum samples. The wells of the microtiter plate are coated with the antigen. In a first incubation step, the anti-tTG antibodies are bound to the immobilized antigen. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. Then 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). An acidic stopping solution is then added. The color converts to yellow. The results are evaluated using a cut off value.

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Kit Components	Quantity
K 9399MTP	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 9399WP	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 9399K01	Control negative, lyophilized	4 vials
K 9399K02	Control positive, lyophilized	4 vials
K 9399K	POD antibodies (rabbit-anti-IgA antibody, peroxidase labeled)	1 x 200 µl
K 9399TMB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 9399AC	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 7 ml

#### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 5-1000  $\mu$ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

#### 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  $\mu$ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 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** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- The **POD antibody** must be diluted **1:100** in ELISA wash buffer (e.g. 100  $\mu$ l POD antibody + 10 ml ELISA wash buffer). The antibody is stable at 2-8 °C until expiry date stated on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- The **Controls** (positive and negative) must be reconstituted with **500  $\mu$ l washing buffer**. Allow the vial to stand for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted **controls are not stable and can not 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. PRECAUTIONS

- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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.
- Performe 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** control solutions and prediluted patient samples per well.
2. Incubate for **1 hour** at room temperature (21-26°C).
3. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer.
4. Add **100 µl** of 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 **10-20 minutes** at room temperature.
9. Add **50 µl** of stop solution into each well 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.

## 9. RESULTS

### Calculation

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

### Example for Cut off:

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

The calculated cut off OD is 0.260.

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

### Example for positive patient sample

Patient sample extinction = 0.685

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

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

## 10. LIMITATIONS

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

## 11. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercially control samples as internal quality control.

**Control samples** should be analyzed 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.

### *Expected values*

htTG IgA Serum cut off > 22 AU/ml positiv

htTG IgA Serum cut off < 16 AU/ml negativ

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

We recommend each laboratory to establish its own normal range.

## 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.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

1/18/2006 tTG IgA10012004.DOC