

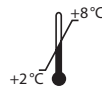
anti-Gliadin sIgA ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung der
anti-Gliadin-sIgA-Antikörper in Stuhl*

*For the in vitro determination of
anti-Gliadin sIgA antibodies in stool*

Gültig ab / Valid from 2022-03-01

REF K 9311



IVD CE



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von anti-Gliadin-slgA-Antikörpern aus Stuhl geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Zöliakie (oder auch einheimische Sprue) wird durch das Antigen Gluten des Getreides von Weizen, Roggen und Gerste hervorgerufen. Es handelt sich dabei um eine meist im Kindesalter manifestierte chronische Verdauungsinsuffizienz. Außerdem kann die Zöliakie mit bösartig verlaufenden T-Zell-Lymphomen in Verbindung gebracht werden, da sie bei 6 von 10 Spruepatienten auftritt.

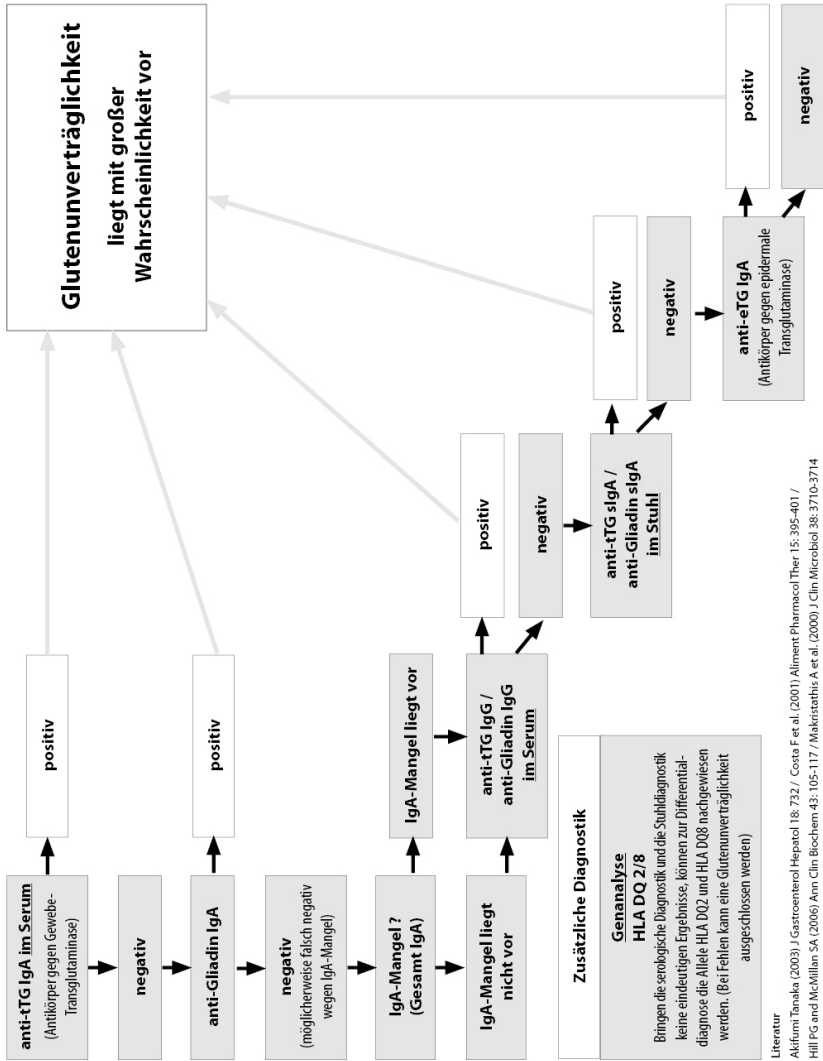
Das frühzeitige Erkennen der Zöliakie ist sehr wichtig, da Folgeerscheinungen durch Einhaltung einer glutenfreien Diät verhindert werden können.

Durch die Bestimmung der anti-Gliadin-slgA-Antikörper wird der Patient nicht weiter belastet, da eine anschließende Biopsie „Gold Standard“ des Dünndarms bei der Verlaufskontrolle und dem Screening nicht zwingend notwendig ist.

Indikationen

- Autoimmunerkrankungen
- Nahrungsmittelunverträglichkeit
- siehe auch unseren Vorschlag für Stufendiagnostik bei Verdacht auf Glutenunverträglichkeit auf Seite 3

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



Zusätzliche Diagnostik

Genanalyse HLA DQ 2/8

Bringen die serologische Diagnostik und die Stuhlidiagnostik keine eindeutigen Ergebnisse, können zur Differentialdiagnose die Allele HLA DQ2 und HLA DQ8 nachgewiesen werden. (Bei Fehlen kann eine Glutenunverträglichkeit ausgeschlossen werden)

Literatur

Akifumi Tanaka (2003) J Gastroenterol Hepatol 18: 732 / Costa F. et al. (2001) Aliment Pharmacol Ther 15: 395-401 / Hill PG and McMillan SA (2006) Ann Clin Biochem 43: 105-117 / Makris Athis A et al. (2009) J Clin Microbiol 38: 3710-3714 / Murdoch AM and Johnston S D (2005) European J Gastroenterol & Hepatol 17: 41-43 / Picarelli A et al. (2002) Am J Gastroenterol 97: 95-98

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9311	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 9311	CONJ	Konjugat (peroxidase markiert), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9311	CTRL NEG	Kontrolle negativ, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9311	CTRL POS	Kontrolle positiv, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9311	CTRL CUT OFF	Cut-off-Kontrolle, lyophilisiert (Konzentration der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5x	1 x 100 ml
K 9311	DIL	Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 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
- 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).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben 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.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** 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 des hohen Salzgehalts im Konzentrat 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 **4 Monate bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Kontrollen (CTRL CUT OFF, CTRL NEG und CTRL POS)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben** für CTRL CUT-OFF, CTRL NEG und CTRL POS sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Kontrollen** (rekonstituierte CTRL CUT-OFF, CTRL NEG und CTRL POS) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Lagerung

Rohstuhl

Rohstuhlproben können bei -20°C 8 Monate gelagert werden. Mehr als 3 Einfrier-Auftau-Zyklen sind zu vermeiden.

Stuhlsuspensionen

Stuhlextrakt kann bei 2–8°C oder -20°C für 7 Tage gelagert werden, bei Raumtemperatur (15–30°C) einen Tag. Der Extrakt sollte maximal drei Einfrier-/ Auftauzyklen unterzogen werden.

Stuhlprobenextraktion

Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) wird als **Probenextraktionspuffer** verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 1,5 ml Probenextraktionspuffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Extraktionspuffervolumen:	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 Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml Probenextraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) **befüllen**. **Wichtig:** Probenextraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen 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 so lange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. **Wichtig:** 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 im Probenextraktionspuffer 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 Stuhlprobenröhrchens (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** 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 Gliadin ist auf einer Mikrotiterplatte fixiert. Die in der Probe vorhandenen anti-Gliadin-slgA-Antikörper binden in einem ersten Inkubationsschritt an das Antigen. Nach einem Waschschrift wird die Anwesenheit von anti-Gliadin-slgA-Antikörpern in der Probe mit einem peroxidase markierten anti-slgA-Antikörper nachgewiesen. Als Substrat wird Tetramethylbenzidin 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. Die Anwesenheit von gebundenen anti-Gliadin-slgA-An-

tikörpern wird durch die gemessene Absorption angezeigt. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich des ermittelten Wertes mit dem Cut-off-Wert.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung 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 Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.

10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
11.	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 eines Messwerts den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** 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

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

$$\text{OD}_{\text{Cut-Off-Kontrolle}} = 0,321 = 100 \text{ U/l}$$

$$\text{Konzentration Patientenprobe} = \frac{0,685 * 100 \text{ U/l}}{0,321} = 213,4 \text{ U/l}$$

Achtung: Berechnung gilt nur für eine Stuhlprobenverdünnung von 1:5 000.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Die Untergrenze des Messbereichs ist der LoB.

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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 Kon-

trollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG 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

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 40

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [U/l]	VK [%]
1	503,37	3,0
2	332,94	4,0

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 24

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [U/l]	VK [%]
1	441,04	11,6
2	241,78	9,1

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung von 2 Stuhlproben nachgewiesen.

Für anti-Gliadin-slgA in Stuhl wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 57,16 bis 342,93 U/l nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [U/l]	Gemessen [U/l]	Wiederfindung [%]
A	1:15 000	342,94	342,94	100,00
	1:30 000	171,47	170,93	99,68
	1:45 000	114,31	115,91	101,39
	1:60 000	85,73	87,71	102,31
	1:90 000	57,16	65,73	115,00
B	1:20 000	233,74	233,74	100,00
	1:22 000	212,49	208,28	98,02
	1:24 000	194,78	183,58	94,25
	1:26 000	179,80	172,96	96,20
	1:28 000	166,96	165,10	98,89
	1:30 000	155,83	160,07	102,73

Analytische Sensitivität

Leerwert (*limit of blank*, LoB)

37,53 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 gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.

- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

Achtung: Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- 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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

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 auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der 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 dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.













14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- 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 et al.: 1997; *Nat. Med.* **7** (3), 797
2. Rieken et al.: 1998; *Dtsch. med. Wschr.* **123**, 1454
3. Green et al.: 1998; *Clin. Persp. Gastroenterol.* November, **133**
4. Mothes, Th.: 1997; *Münsch. Med. Wschr.* **139**, 111

Verwendete Symbole:

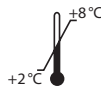
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

anti-Gliadin sIgA ELISA

*For the in vitro determination of
anti-Gliadin sIgA antibodies in stool*

Valid from 2022-03-01

REF K 9311



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	19
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	20
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	20
<i>Sample storage</i>	20
<i>Extraction of the stool samples</i>	21
<i>Dilution of samples</i>	22
7. ASSAY PROCEDURE	22
<i>Principle of the test</i>	22
<i>Test procedure</i>	22
8. RESULTS	24
9. LIMITATIONS	24
10. QUALITY CONTROL	24
<i>Reference range</i>	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
<i>Accuracy – Precision</i>	25
<i>Linearity</i>	25
<i>Analytical sensitivity</i>	26
12. PRECAUTIONS	26
13. TECHNICAL HINTS	27
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27
15. REFERENCES	28

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the determination of anti-gliadin-sIgA antibodies in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

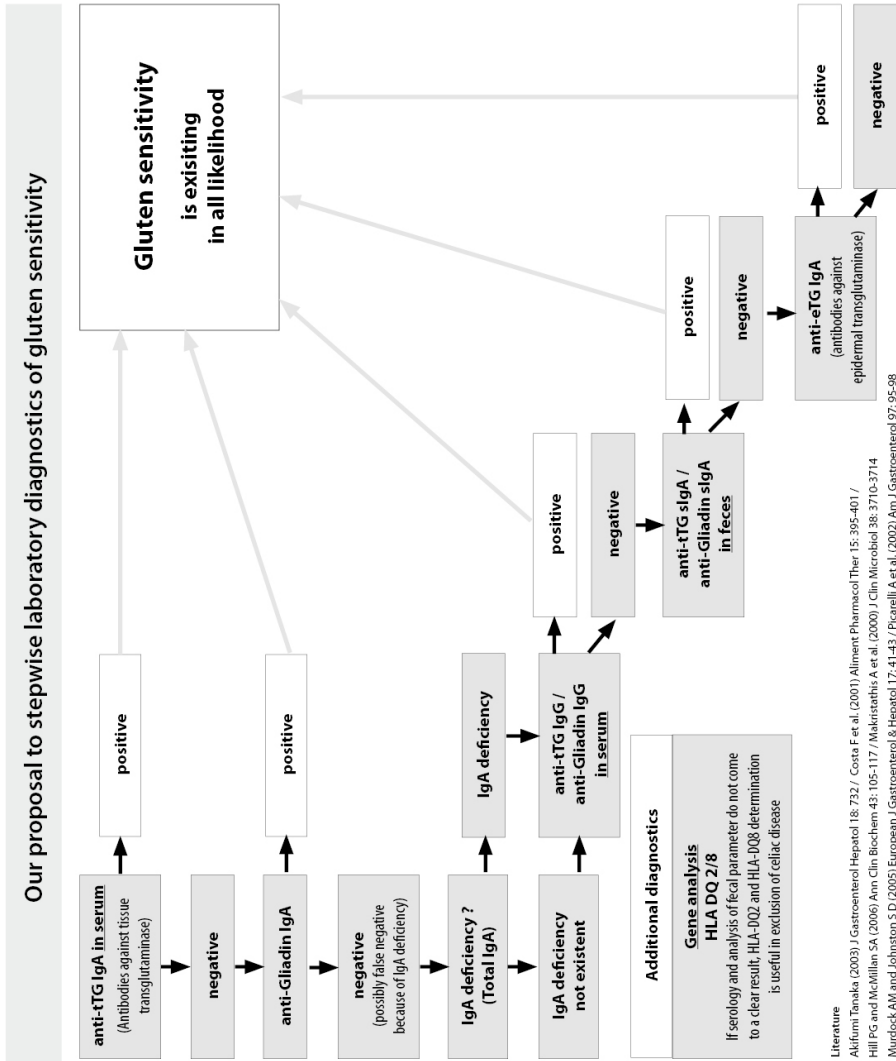
2. INTRODUCTION

The celiac/coeliac disease is caused by the gliadin fraction of wheat gluten and similar proteins of rye and barley. The disease is mainly manifested as chronic digestion insufficiency in children or young adults. In addition, patients with celiac disease have a greatly increased risk of developing malignant T-cell lymphoma of the small bowel, as T-cell lymphoma was found in 6 of 10 patients with coeliac sprue. Early diagnosis of celiac disease is important, because there is evidence that a gluten-free diet might help to prevent complications and malignancies (including intestinal lymphoma).

The measurement of anti-gliadin-sIgA-antibodies may be useful as a screening criterion before jejunal biopsy, the „Gold Standard“, and for the monitoring of the gluten-free diet treatment.

Indication

- Celiac disease
- Food intolerance
- See also our proposal for stepwise diagnosis of gluten sensitivity on page 18.



3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9311	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 9311	CONJ	Conjugate (peroxidase-labelled), ready-to-use	1 x 15 ml
K 9311	CTRL NEG	Control negative, lyophilised (see specification for range)	4x 1 vial
K 9311	CTRL POS	Control positive, lyophilised (see specification for range)	4x 1 vial
K 9311	CTRL CUT OFF	Cut-off control, lyophilised (see specification for concentration)	4x 1 vial
K 0002.15	SUB	Substrate, ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract® 2.5x</i>	1 x 100 ml
K 9311	DIL	Dilution buffer, ready-to-use	1 x 15 ml

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Horizontal microtiter plate shaker
- Calibrated precision pipettors and 5–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. 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 1 month**.
- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate IDK Extract®** has to be diluted with ultrapure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to 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 4 months**.
- The **lyophilised controls (CTRL NEG, CTRL POS and CTRL CUT OFF)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Controls** (reconstituted CTRL NEG, CTRL POS and CTRL CUT OFF) **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) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Raw stool

Raw stool samples can be stored for 8 months at -20 °C. Avoid more than 3 freeze-thaw-cycles.

Stool suspensions

Stool extract can be stored for 7 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

Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract*®) 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 sample 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 stool sample tube** with 1.5 ml **sample extraction buffer** (1:2.5 diluted *IDK Extract*®) before using it with the sample. **Important:** Allow the sample extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the 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) Vortex 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 sample extraction 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

The antigen gliadin is immobilised on the microtiter plate. During the first incubation step, the human anti-gliadin-sIgA antibodies in the samples are bound by the immobilised antigen. After a washing step, anti-gliadin-sIgA antibody presence is determined by the addition of a peroxidase-labelled anti-sIgA antibody. Tetramethylbenzidine is used as a peroxidase substrate. The enzymatic reaction is stopped by an acidic stop solution. The absorbance of the colour compound is determined photometrically at 450 nm. The measured absorbance indicates the presence of bound anti-gliadin-sIgA antibodies. The results are evaluated by comparison with a cut-off value.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until 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.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl controls/diluted samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
11.	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 one sample exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour 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

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

$$\text{OD}_{\text{cut-off control}} = 0.321 = 100 \text{ U/l}$$

$$\text{Concentration patient sample} = \frac{0.685 * 100 \text{ U/l}}{0.321} = 213.4 \text{ U/l}$$

Attention: Calculation is only valid for a sample dilution factor of 1:5 000.

9. LIMITATIONS

The lower limit of the measurement range is the LoB.

LoB see chapter "Performance Characteristics".

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

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG 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

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 40

The repeatability was assessed with 2 stool samples under **constant** parameters (same operator, instrument, day and kit lot).

Sample	Mean value [U/l]	CV [%]
1	503.37	3.0
2	332.94	4.0

Reproducibility (Inter-Assay); n = 24

The reproducibility was assessed with 2 stool samples under **varying** parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [U/l]	CV [%]
1	441.04	11.6
2	241.78	9.1

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP6-A with a serial dilution of 2 different stool samples.

For anti-gliadin sIgA in stool, the method has been demonstrated to be linear from 57.16 to 342.93 U/l, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [U/l]	Obtained [U/l]	Recovery [%]
A	1:15 000	342.94	342.94	100.00
	1:30 000	171.47	170.93	99.68
	1:45 000	114.31	115.91	101.39
	1:60 000	85.73	87.71	102.31
	1:90 000	57.16	65.73	115.00

Sample	Dilution	Expected [U/l]	Obtained [U/l]	Recovery [%]
B	1:20 000	233.74	233.74	100.00
	1:22 000	212.49	208.28	98.02
	1:24 000	194.78	183.58	94.25
	1:26 000	179.80	172.96	96.20
	1:28 000	166.96	165.10	98.89
	1:30 000	155.83	160.07	102.73

Analytical sensitivity

Limit of blank, LoB

37.53 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 or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- 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 analysed with each run.
- 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 to 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.
- Control samples should be analysed with each run.
- 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 et al.: 1997; *Nat. Med.* **7** (3), 797
2. Rieken et al.: 1998; *Dtsch. med. Wschr.* **123**, 1454
3. Green et al.: 1998; *Clin. Persp. Gastroenterol.* November, **133**
4. Mothes, Th.: 1997; *Münsch. Med. Wschr.* **139**, 111

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
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant