

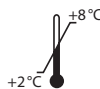
# anti-heTG IgA ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von IgA-Antikörpern  
gegen die epidermale Transglutaminase  
in Serum und Plasma*

*For the in vitro determination of anti-epidermal  
transglutaminase IgA antibodies  
in serum and plasma*

Gültig ab / Valid from 2021-07-15

**REF** K 9396



**IVD**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

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>4</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>4</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>6</b>
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>8</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>8</b>
<i>Vorläufige Referenzwerte</i>	8
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>9</b>
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	9
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	9
<i>Linearität</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>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

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

## 2. EINLEITUNG

Transglutaminasen sind Enzyme, die Quervernetzungen zwischen Proteinen katalysieren. Es sind acht humane, kalziumabhängige Transglutaminasen bekannt. Transglutaminase 3 (TGM3), auch bekannt als Transglutaminase E, TG(E) oder epidermale Transglutaminase, wird in der Epidermis exprimiert. Dort ist sie an der finalen Differenzierung von Haarfollikeln und Keratinozyten beteiligt.

Mutationen im TGM3-Gen führen unter anderem zum Syndrom der unkämmbaren Haare (uncombable hair syndrome) oder Dermatitis herpetiformis Dühring (DH). Bei letzterem Syndrom handelt es sich um eine Hautkrankheit aus der Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen. Neben den auffälligen juckenden Bläschen und Knoten ist Zöliakie eines der Symptome dieser Krankheit.

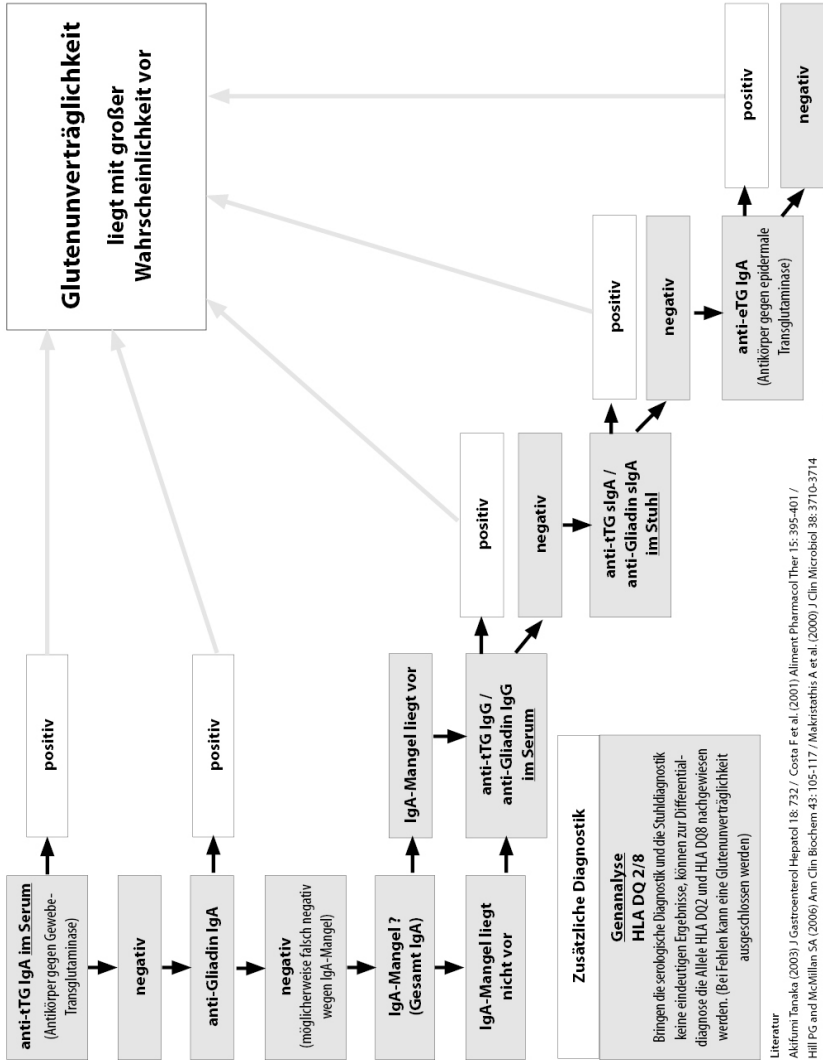
Zöliakie ist eine Erkrankung des Magen-Darm-Trakts, welche durch den Verzehr von glutenhaltigen Lebensmitteln ausgelöst wird. Bei betroffenen Patienten führt die Aufnahme von Gliadin, einer Komponente des Glutens, zur Entzündung und Zerstörung der Dünndarmschleimhaut. Außerdem kommt es zur Bildung von Autoantikörpern gegen Transglutaminasen.

Schon seit geraumer Zeit wird der Nachweis der Gewebstransglutaminase (tTG) verwendet, um eine Glutenunverträglichkeit bei Patienten zu diagnostizieren. Für die Diagnostik der DH wurde nun aber gezeigt, dass die TGM3 ein noch empfindlicherer Marker ist und die Diagnostik weiter verbessern kann. In dieser Anleitung finden sie einen Vorschlag zur Stufendiagnostik bei Verdacht auf Glutenunverträglichkeit, der auch den Nachweis verschiedener Transglutaminasen beinhaltet.

### Indikationen

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

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



### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9396	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 9396	CTRL NEG	Kontrolle negativ, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9396	CTRL POS	Kontrolle positiv, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9396	CTRL CUT-OFF	Cut-off-Kontrolle, lyophilisiert (Konzentration der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9396	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert (Kaninchen anti-IgA)	1 x 200 µl
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, 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\*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (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. LAGERUNG UND VORBEREITUNG 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 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 (100ml WASH-BUF + 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.
- **Die lyophilisierten Negativ-, Positiv- und Cut-Off-Kontrollen** (CTRL NEG, CTRL POS und CTRL CUT-OFF) sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für CTRL POS, CTRL NEG und CTRL CUT-OFF sind dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen. **Rekonstituierte Kontrollen sind nicht stabil können nicht gelagert werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### Serum / Plasma

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:250 in Waschpuffer** verdünnt,

z. B. **10 µl** Probe + **90 µl** Waschpuffer, gut mischen = Verdünnung I (1:10)

**40 µl** Verdünnung I + **960 µl** Waschpuffer, gut mischen = Verdünnung II (1:25).

Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von 1:250.

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

### Lagerung

Serum- und Plasma-Proben sind bei -20°C für 6 Monate stabil. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### Testprinzip

Dieser ELISA dient zur Bestimmung der IgA anti-epidermalen Transglutaminase Antikörper (IgA anti-heTG). In einem ersten Inkubationsschritt werden die Antikörper aus der Probe an das auf der Platte fixierte Antigen gebunden. Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion der gebundenen IgA anti-epidermalen Transglutaminase Antikörper durch Zugabe eines Konjugates, eines peroxidase-markierten Antikörpers (POD-AK). Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung beendet. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem IgA anti-epidermalen Transglutaminase Antikörper-Gehalt direkt proportional. Die Auswertung erfolgt über die Cut-off-Kontrolle.

### 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 <b>vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	<b>100 µl Kontrollen/verdünnte Proben</b> in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur</b> (15–30 °C) unter <b>Schütteln*</b> inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	<b>100 µl Konjugat</b> (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur</b> (15–30 °C) unter <b>Schütteln*</b> inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	<b>100 µl Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	<b>10–20 min**</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
10.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
11.	<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 gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> 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

### Berechnung

Da die Probenverdünnung (1:250) bei der Cut-Off-Kontrolle bereits berücksichtigt wurde, ist der Verdünnungsfaktor gleich 1.

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

$$\text{Cut-Off} = \text{OD}_{\text{Cut-Off-Kontrolle}} = 22 \text{ AU/ml}$$

### Beispiel

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

$$\text{OD}_{\text{Cut-Off-Kontrolle}} = 0,234 = 22 \text{ AU/ml}$$

$$\text{Konzentration Patientenprobe} = \frac{0,685 * 22 \text{ AU/ml}}{0,234} = 64,4 \text{ AU/ml}$$

**Achtung:** Berechnung gilt nur für eine Probenverdünnung von **1:250**.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

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

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 Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### Vorläufige Referenzwerte

Serum: > 22 AU/ml positiv

Serum: < 16 AU/ml negativ

Serumwerte zwischen 16 und 22 AU/ml liegen im Graubereich.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Genauigkeit – Präzision

#### Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n=64

Die Wiederholbarkeit wurde mit einer Serumprobe unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	37,15	5,2

#### Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=24

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	25,48	8,8
2	9,18	14,3

### Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 2 Plasmaproben wurden dafür mit bekannten anti-heTG-IgA-Konzentrationen versetzt und gemessen. Die Proben wurden durch das Spike-Volumen verdünnt. Dies wurde bei der Berechnung der erwarteten Werte berücksichtigt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

Probe [AU/ml]	Spike [AU/ml]	Erwartet [AU/ml]	Gemessen [AU/ml]	Wiederfindung [%]
13,00	31,40	44,41	37,40	84,23
	10,47	19,14	21,52	112,47
	23,55	36,56	30,55	83,56
	7,85	16,52	18,70	113,20
	47,10	60,11	49,80	82,86
	15,70	24,37	26,46	108,59
12,75	47,10	59,85	56,71	94,74
	15,70	24,20	30,24	124,96

### 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 zweier serieller Verdünnungen einer Serumprobe nachgewiesen.

Für anti-heTG-IgA in Serum und Plasma ein lineares Verhalten im Bereich von 8,91 bis 159,92 AU/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als  $\pm 20\%$ .

Verdünnung	Verdünnung	Erwartet [AU/ml]	Gemessen [AU/ml]	Wiederfindung [%]
1	Unverdünnt	159,92	159,92	100,00
	1:2	79,96	85,11	106,44
	1:4	39,98	40,15	100,43
	1:8	19,99	21,47	107,40
	1:16	9,99	10,23	102,40
2	Unverdünnt	142,52	142,52	100,00
	1:2	71,26	70,71	99,22
	1:4	35,63	33,87	95,06
	1:8	17,82	18,68	104,88
	1:16	8,91	8,80	98,79

### Analytische Sensitivität

Leerwert (limit of blank, LoB)

2,874 AU/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt.

## 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.

- 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.
- 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 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, zurückzusenden.

### Verwendete Symbole:

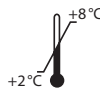
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

# anti-heTG IgA ELISA

*For the in vitro determination of  
anti-epidermal transglutaminase IgA antibodies  
in serum and plasma*

Valid from 2021-07-15

**REF** K 9396



**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](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>17</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>18</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>18</b>
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>19</b>
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Test procedure</i>	19
<b>8. RESULTS</b>	<b>20</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>21</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>21</b>
<i>Reference range</i>	21
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>21</b>
<i>Accuracy – Precision</i>	21
<i>Accuracy – Trueness</i>	22
<i>Linearity</i>	22
<i>Analytical sensitivity</i>	22
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>23</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>23</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>24</b>



## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of IgA anti-epidermal-transglutaminase antibodies in serum and plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Transglutaminases are enzymes that catalyse cross-links between proteins. Eight human, calcium-dependent transglutaminases are known. Transglutaminase 3 (TGM3), also known as transglutaminase E, TG (E) or epidermal transglutaminase, is expressed in the epidermis and involved in the final differentiation of hair follicles and keratinocytes.

Mutations in the TGM3 gene lead among others to the uncombable hair syndrome or dermatitis herpetiformis duhring (DH). The latter syndrome is a skin disease from the group of blistering autoimmune dermatitis. Despite the conspicuous itchy blisters and nodules, celiac disease is one of the symptoms of DH.

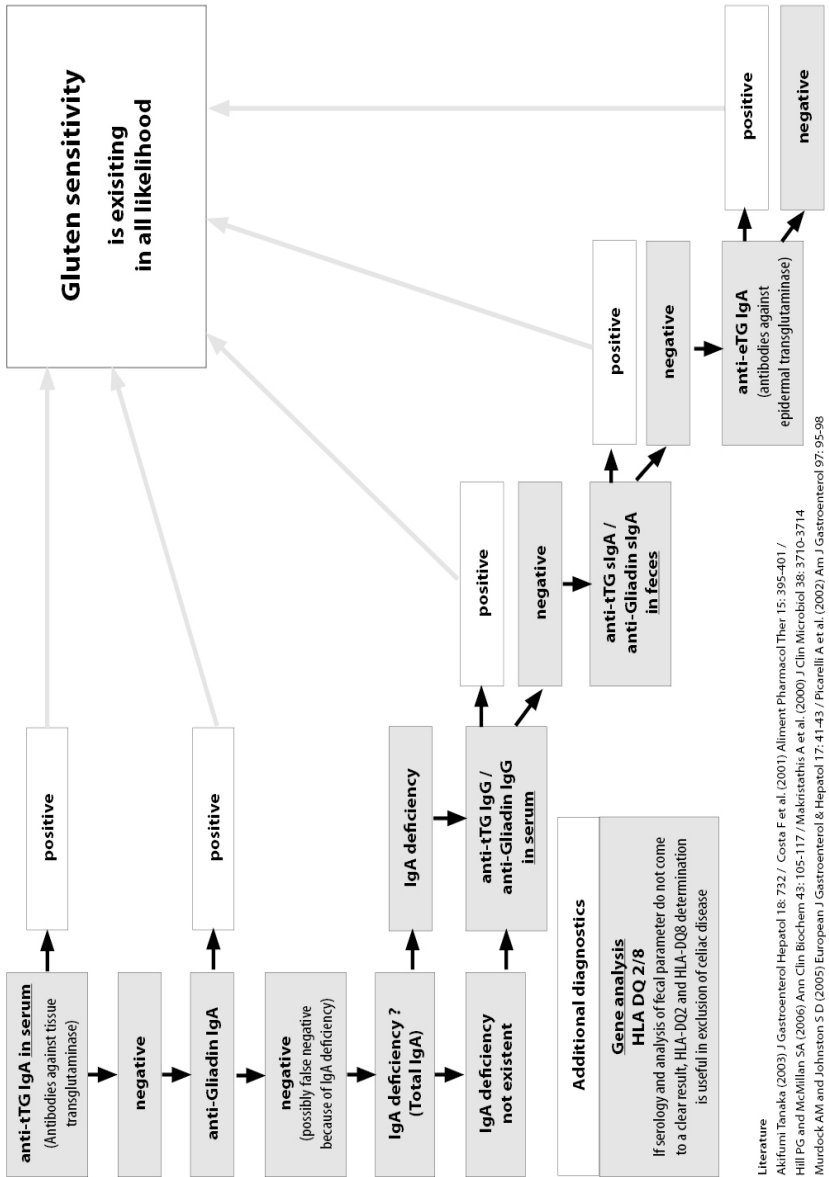
Celiac disease is a disease of the gastrointestinal tract, which is triggered by the consumption of gluten-containing foods. In patients suffering of celiac disease, the uptake of gliadin, a component of gluten, causes inflammation and destruction of the small intestinal mucosa. In addition, autoantibodies against transglutaminases are formed.

Since several years the detection of tissue transglutaminase (tTG) is used as standard procedure to diagnose gluten intolerance in patients. For the diagnosis of DH, however, it has now been shown that TGM3 is an even more sensitive marker and can further improve diagnostics. In this instruction for use you find a proposal for the step-by-step diagnosis of suspected gluten intolerance, which also includes the detection of various transglutaminases.

### Indications

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

**Our proposal to stepwise laboratory diagnostics of gluten sensitivity**



**Literature**  
 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 / Makrisstathis A et al. (2000) 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. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9396	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 9396	CTRL NEG	Control negative, lyophilised (see specification for concentration)	4 x 1 vial
K 9396	CTRL POS	Control positive, lyophilised (see specification for concentration)	4 x 1 vial
K 9396	CTRL CUT-OFF	Cut-off control, lyophilised (see specification for concentration)	4 x 1 vial
K 9396	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled (rabbit-anti-IgA antibody)	1 x 200 µl
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, 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\*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- 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. STORAGE AND PREPARATION 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 (100ml WASHBUF + 900ml 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**.
- The **lyophilised negative, positive and cut-off 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 data sheet. **Diluted controls are not stable and cannot be stored.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate (1:101 diluted CONJ) is 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

### Serum / Plasma

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:250 in washbuffer** before performing the assay, e.g.

**10 µl** sample + **90 µl** wash buffer, mix well. = dilution I (1:10)

**40 µl** sample + **960 µl** washbuffer, mix well. = dilution II (1:25)

This results in a final dilution of 1:250.

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

Serum and plasma samples are stable at -20°C for up to 6 months. Repeated freezing and thawing should be avoided.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This ELISA is designed for the quantitative determination of anti-epidermal transglutaminase antibodies (IgA anti-heTG). The wells of the microtiter plate are coated with the antigen. In a first incubation step, the anti-heTG antibodies are bound to the coated antigen. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a further incubation step, a peroxidase-labelled antibody is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the peroxidase substrate, tetramethylbenzidine (TMB). Finally, an acidic stop solution is added to terminate the enzymatic reaction, whereby the colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the IgA anti-epidermal-transglutaminase antibody concentration. The results are evaluated by a cut-off control.

### *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 the 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.	<b>Before use</b> , wash the wells <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each <b>100 µl controls/diluted samples</b> into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
4.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add <b>100 µl conjugate</b> (diluted CONJ) into each well.

6.	Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
7.	Discard the contents of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.
9.	Incubate for <b>10–20 min**</b> at room temperature (15–30 °C) in the <b>dark</b> .
10.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.
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 the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> 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

Since the sample dilution of 1:250 is already considered in the cut-off control, the dilution factor is 1.

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

$$\text{Cut-off} = \text{OD}_{\text{cut-off control}} = 22 \text{ AU/ml}$$

### Example

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

$$\text{OD}_{\text{cut-off control}} = 0.234 = 22 \text{ AU/ml}$$

$$\text{Concentration patient sample} = \frac{0,685 * 22 \text{ AU/ml}}{0,234} = 64,4 \text{ AU/ml}$$

**Attention:** Calculation is only valid for a sample dilution factor of **1:250**.

## 9. LIMITATIONS

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

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

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

heTG IgA Serum > 22 AU/ml positive

heTG IgA Serum < 16 AU/ml negative

Results between 16–22 AU/ml are in the grey area.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Accuracy – Precision

#### Repeatability (Intra-Assay); n=64

The repeatability was assessed with one serum sample under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [AU/ml]	CV [%]
1	37.15	5.2

**Reproducibility (Inter-Assay); n=24**

The reproducibility was assessed with 2 serum samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [AU/ml]	CV [%]
1	25.48	8.8
2	9.18	14.3

**Accuracy – Trueness**

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, anti-heTG-IgA-spikes with known concentrations were added to 2 different plasma samples. The samples were diluted by the volume of the spike. This was considered when calculating the expected values. The results are shown in the following table:

Sample [AU/ml]	Spike [AU/ml]	Expected [AU/ml]	Obtained [AU/ml]	Recovery [%]
13.00	31.40	44.41	37.40	84.23
	10.47	19.14	21.52	112.47
	23.55	36.56	30.55	83.56
	7.85	16.52	18.70	113.20
	47.10	60.11	49.80	82.86
	15.70	24.37	26.46	108.59
12.75	47.10	59.85	56.71	94.74
	15.70	24.20	30.24	124.96

**Analytical sensitivity**

Limit of blank, LoB

2.874 AU/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-A2.

**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 two serial dilutions of one serum sample.



For anti-heTG-IgA in serum and plasma, the method has been demonstrated to be linear from 8.91 to 159.92 AU/ml, showing a non-linear behaviour of less than  $\pm 20\%$  in this interval.

Sample	Dilution	Expected [AU/ml]	Obtained [AU/ml]	Recovery [%]
1	Undiluted	159.92	159.92	100.00
	1:2	79.96	85.11	106.44
	1:4	39.98	40.15	100.43
	1:8	19.99	21.47	107.40
	1:16	9.99	10.23	102.40
2	Undiluted	142.52	142.52	100.00
	1:2	71.26	70.71	99.22
	1:4	35.63	33.87	95.06
	1:8	17.82	18.68	104.88
	1:16	8.91	8.80	98.79

## 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 colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the 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.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

**Used symbols:**

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		

## **Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

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

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

