

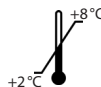
IDK[®] anti-hnTG IgA ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von Autoantikörpern (IgA)
gegen humane Transglutaminase 6
in Plasma und Serum*

*For the in vitro determination of autoantibodies (IgA)
against human transglutaminase 6
in plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2021-07-12

REF K 9400



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. EINFÜHRUNG UND HINTERGRUND	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Probenlagerung</i>	4
<i>Probenverdünnung</i>	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
<i>Genauigkeit - Präzision</i>	9
<i>Genauigkeit - Richtigkeit</i>	9
<i>Analytische Spezifität</i>	10
<i>Linearität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Autoantikörpern (IgA) gegen humane Transglutaminase 6 aus Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINFÜHRUNG UND HINTERGRUND

Glutenassoziierte Krankheiten umfassen Zöliakie, Weizenallergie und Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität (engl.: *Non-celiac gluten sensitivity* [NCGS]). Die weltweite Prävalenz liegt bei ca. 5 %.

Die Zöliakie (gluteninduzierte Enteropathie, einheimische Sprue; engl.: *celiac disease*) ist die häufigste chronische Erkrankung des Dünndarms. Gluteninduziert entzündet sich die Dünndarmschleimhaut, was bis zum vollständigen Abbau der Dünndarmzotten führen kann.

Darüber hinaus handelt es sich bei der Zöliakie um eine gluteninduzierte Autoimmunerkrankung, die durch Autoantikörper gegen die TG2 (Gewebe-Transglutaminase) charakterisiert ist. Die serologische Zöliakiediagnostik basiert auf dem Nachweis von TG2-Autoantikörpern und Antikörpern gegen DGP (deamidiertes Gliadin-Peptid).

Im menschlichen Körper liegen acht verschiedene Transglutaminasen vor, darunter die TG2. Die gluteninduzierte Hauterkrankung *Dermatitis herpetiformis* (Morbus Duhring-Brocq), die sich parallel zur Zöliakie entwickeln kann, ist durch Autoantikörper gegen die TG3 (epidermale Transglutaminase) charakterisiert.

Gegen die neuronale Transglutaminase (TG6) gerichtete Autoantikörper wurden in Seren von Patienten mit neurologischen Erkrankungen (z. B. Ataxie, Neuropathien, Cerebralparese oder Stiff-Person-Syndrom) nachgewiesen.

TG6-Autoantikörper können zusätzlich zu TG2-Autoantikörpern in Zöliakiepatienten vorkommen, wurden aber auch in TG2-Autoantikörper-negativen Seren und in Seren von Patienten ohne Enteropathie (d. h. ohne Zöliakie) gefunden. Entsprechend können sich TG6-Autoantikörper zöliakieunabhängig entwickeln.

Der vorliegende ELISA dient dem quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen die TG6 in menschlichem Serum.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9400	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 9400	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9400	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	4 x 5 vials
K 9400	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9400	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9400	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
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
- 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.
- **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 bei **2–8°C** gelagerte **WASHBUF** kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben vermeiden.

Probenverdünnung

Plasma- und Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:250** mit Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt, z. B..

- **20 µl** Probe + **180 µl** SAMPLEBUF, gut mischen = **1:10 (Verdünnung I)**
- **20 µl** Verdünnung I + **480 µl** SAMPLEBUF, gut mischen = **1:25 (Verdünnung II)**

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

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von neuronaler Transglutaminase (TG6).

Die Kavitäten der Festphase sind mit TG6 beschichtet. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

Erste Reaktion: TG6-Antikörper aus der Probe binden an das immobilisierte Antigen; es bildet sich der Antigen-Antikörper-Komplex. Nicht gebundene Probenbestandteile werden anschließend von der Festphase gewaschen.

Zweite Reaktion: Ein zweiter, gegen human-IgA gerichteter und mit Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper wird zugesetzt. Dieses Konjugat bindet seinerseits an den Antigen-Antikörper-Komplex. Überschüssiges Konjugat wird anschließend von der Festphase gewaschen.

Dritte Reaktion: Der enzymmarkierte Komplex setzt ein farbloses Substrat in ein farbiges (blaues) Produkt um. Das Ausmaß der Farbentwicklung spiegelt die Menge an TG6-Antikörpern (IgA) in der Probe wider. Proben ohne TG6-Antikörper bleiben farblos. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Standards/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 Standards/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 in jede Vertiefung pipettieren.
9.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung 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 gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards 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

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard/Kalibrator mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Plasma- und Serumproben

Da die Probenverdünnung in der Standardkurve bereits berücksichtigt wurde, ist der Verdünnungsfaktor gleich 1.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{Analytische Sensitivität} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

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.

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Plasma- und Serumproben von augenscheinlich Gesunden (n = 75) wurde folgender Cut-off von ermittelt.

Plasma/Serum:	> 8,3 U/ml	positiv
Plasma/Serum:	< 8,3 U/ml	negativ

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität

Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB)	0,155 U/ml
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	0,431 U/ml
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ)	0,851 U/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

Genauigkeit - Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 20

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

Probe	Mittelwert [U/ml]	VK [%]
1	19,16	4,2
2	6,25	6,9

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 48

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

Probe	Mittelwert [U/ml]	VK [%]
1	18,84	7,1
2	5,79	7,7

Genauigkeit - Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Eine Serum-Probe wurde dafür mit bekannten anti-hnTG IgA-Konzentrationen versetzt und gemessen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Probe [U/ml]	Spike [U/ml]	Erwartet [U/ml]	Gemessen [U/ml]	Wiederfindung [%]
1,154	53,33	54,36	42,83	78,78
	35,56	36,62	28,29	77,24
	23,70	24,80	21,08	85,01
	15,80	16,92	14,88	87,96
	10,53	11,66	11,42	97,93
	7,02	8,16	8,07	98,89
	4,68	5,82	5,62	96,47
	3,12	4,27	4,15	97,27

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität zu verwandten Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität gefunden zu anti-heTG IgA. Die Kreuzreaktivität zu anti-hnTG IgA lag bei kleiner 1 %.

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration [µg/ml]	Fazit
anti-heTG IgA	10	< LoB
anti-hnTG IgA	10	< 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 Serum-Proben nachgewiesen.

Für anti-hnTG IgA in Serum und EDTA-Plasma wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 8,53 bis 97,12 U/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als ±20 %.

Probe	Verdünnung	Erwartet [U/ml]	Gemessen [U/ml]	Wiederfindung [%]
A	Unverdünnt	91,02	91,02	100,00
	1:1,50	60,68	57,98	95,56
	1:2,25	40,45	42,83	105,86
	1:3,38	26,97	28,29	104,90
	1:5,06	17,98	21,08	117,26
	1:7,59	11,99	14,88	124,16
B	Unverdünnt	97,12	97,12	100,00
	1:1,50	64,75	66,05	102,02
	1:2,25	43,16	45,10	104,48
	1:3,38	28,78	33,33	115,84
	1:5,06	19,18	23,55	122,76
	1:7,59	12,79	15,42	120,53
	1:11,39	8,53	10,05	117,87

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- 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.
- *IDK®* ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- 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:

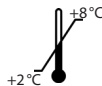
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten

IDK[®] anti-hnTG IgA ELISA

***For the in vitro determination of autoantibodies (IgA)
against human transglutaminase 6
in plasma and serum***

Valid from 2021-07-12

REF **K 9400**



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	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	15
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	16
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	17
<i>Sample storage</i>	17
<i>Sample dilution</i>	17
7. ASSAY PROCEDURE	17
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	18
8. RESULTS	19
9. LIMITATIONS	20
10. QUALITY CONTROL	20
<i>Reference range</i>	20
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
<i>Accuracy - Precision</i>	21
<i>Accuracy - Trueness</i>	21
<i>Linearity</i>	22
<i>Analytical specificity</i>	22
<i>Analytical sensitivity</i>	23
12. PRECAUTIONS	23
13. TECHNICAL HINTS	23
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24

1. INTENDED USE

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

2. INTRODUCTION

Gluten-associated diseases include celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. The worldwide prevalence is around 5 %.

Celiac disease is the most common chronic disease of the small intestine. Gluten induces inflammation of the small intestinal mucosa, which can lead to the complete degradation of the small intestine villi.

In addition, celiac disease is a gluten-induced autoimmune disease which is characterised by auto-antibodies to TG2 (tissue transglutaminase). The serological celiac disease diagnosis is based on the detection of TG2 auto-antibodies and antibodies against DPG (deaminated gliadin peptide).

Including TG2, eight different transglutaminases are present in the human body. The gluten-induced skin disease dermatitis herpetiformis (Dühring-Brocq's disease), which can develop in parallel with celiac disease, is characterised by autoantibodies to TG3 (epidermal transglutaminase).

Autoantibodies directed against neuronal transglutaminase (TG6) have been detected in sera from patients with neurological disorders (e.g. ataxia, neuropathies, cerebral palsy, or stiff-person syndrome).

TG6 autoantibodies may be present in celiac disease patients in addition to TG2 autoantibodies, but have also been found in TG2 autoantibody-negative sera and in sera from patients without enteropathy (i.e. without celiac disease). Accordingly, TG6 autoantibodies can develop independently of celiac disease.

This ELISA is for the quantitative detection of antibodies to TG6 in human serum.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9400	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 9400	CONJ	Conjugate, ready-to-use	1 x 15 ml
K 9400	STD	Standards, lyophilised (see specification for concentrations)	4 x 5 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9400	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 9400	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 9400	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
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

- Ultra pure 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
- 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 Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** can

be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.

- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **are not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Avoid repeated thawing and freezing of samples.

Sample dilution

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:250** in sample dilution buffer (SAMPLEBUF) before performing the assay, e.g.

- **20 µl** sample + **180 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:10 (dilution I)**
- **20 µl** dilution I + **480 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:25 (dilution II)**

100 µl of the **dilution II** are used in the test per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of neuronal transglutaminase (TG6).

The wells of the microtiter plate are coated with TG6. At the surface of the wells, the following immunological reactions take place:

First reaction: TG6 antibodies from the sample bind to the immobilised antigen forming the antigen-antibody complex. Afterwards, unbound sample components are washed from the microtiter plate.

Second reaction: A second antibody directed against human IgA and labelled with peroxidase (HRP) is added. This conjugate binds to the antigen-antibody complex. Excess conjugate is then washed from the microtiter plate.

Third reaction: The enzyme-labelled complex converts the colourless substrate in a coloured (blue) product. The extent of the colour development reflects the amount of TG6 antibody (IgA) present in the sample. Samples without TG6 antibodies remain colourless. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Anti-hnTG IgA, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

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

Mark the positions of standards/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.	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 standards/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 the highest standard 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

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the 4 parameter algorithm.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Plasma and serum samples

Since the sample dilution is already considered in the calibration curve, the dilution factor is 1.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

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

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

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

LoB × sample dilution factor to be used

Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

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 Immundiagnostik AG in-house studies of plasma and serum samples of apparently healthy persons (n = 75), the following cut off was estimated.

plasma/serum:	> 8,3 U/ml	positive
plasma/serum:	< 8,3 U/ml	negative

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy - Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 20

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

Sample	Mean value [U/ml]	CV [%]
1	19.16	4.2
2	6.25	6.9

Reproducibility (Inter-Assay); n = 48

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

Sample	Mean value [U/ml]	CV [%]
1	18.84	7.1
2	5.79	7.7

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-hnTG IgA-spikes with known concentrations were added to one serum-sample. The table below shows the results:

Sample [U/ml]	Spike [U/ml]	Expected [µg/ml]	Obtained [µg/ml]	Recovery [%]
1.154	53.33	54.36	42.83	78.78
	35.56	36.62	28.29	77.24
	23.70	24.80	21.08	85.01
	15.80	16.92	14.88	87.96
	10.53	11.66	11.42	97.93
	7.02	8.16	8.07	98.89
	4.68	5.82	5.62	96.47
	3.12	4.27	4.15	97.27

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 EP06-A by a serial dilution of 2 different serum-samples.

For anti-hnTG IgA in serum and EDTA-plasma, the method has been demonstrated to be linear from 8.53 to 97.12 U/ml, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [U/ml]	Obtained [U/ml]	Recovery [%]
A	Undiluted	91.02	91.02	100.00
	1:1.50	60.68	57.98	95.56
	1:2.25	40.45	42.83	105.86
	1:3.38	26.97	28.29	104.90
	1:5.06	17.98	21.08	117.26
	1:7.59	11.99	14.88	124.16
B	Undiluted	97.12	97.12	100.00
	1:1.50	64.75	66.05	102.02
	1:2.25	43.16	45.10	104.48
	1:3.38	28.78	33.33	115.84
	1:5.06	19.18	23.55	122.76
	1:7.59	12.79	15.42	120.53
	1:11.39	8.53	10.05	117.87

Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against compounds with structural similarity to anti-hnTG IgA. There was no cross-reactivity observed with anti-heTG IgA. The cross-reactivity with anti-htTG sIgA was found below 1%.

Substance tested	Concentration added [$\mu\text{g/ml}$]	Conclusion
anti-heTG IgA	10	< LoB
anti-htTG sIgA	10	< 1%

Analytical sensitivity

Limit of blank, LoB	0.155 U/ml
Limit of detection, LoD	0.431 U/ml
Limit of quantitation, LoQ	0.851 U/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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 should 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.
- *IDK®* is a trademark of Immundiagnostik AG.
- 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

www.immundiagnostik.com

