

anti-heTG IgA ELISA

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

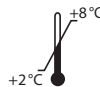
anti-heTG IgA ELISA

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

Gültig ab / Valid from 2018-05-02



K9396



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Vorläufige Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	9
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10

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

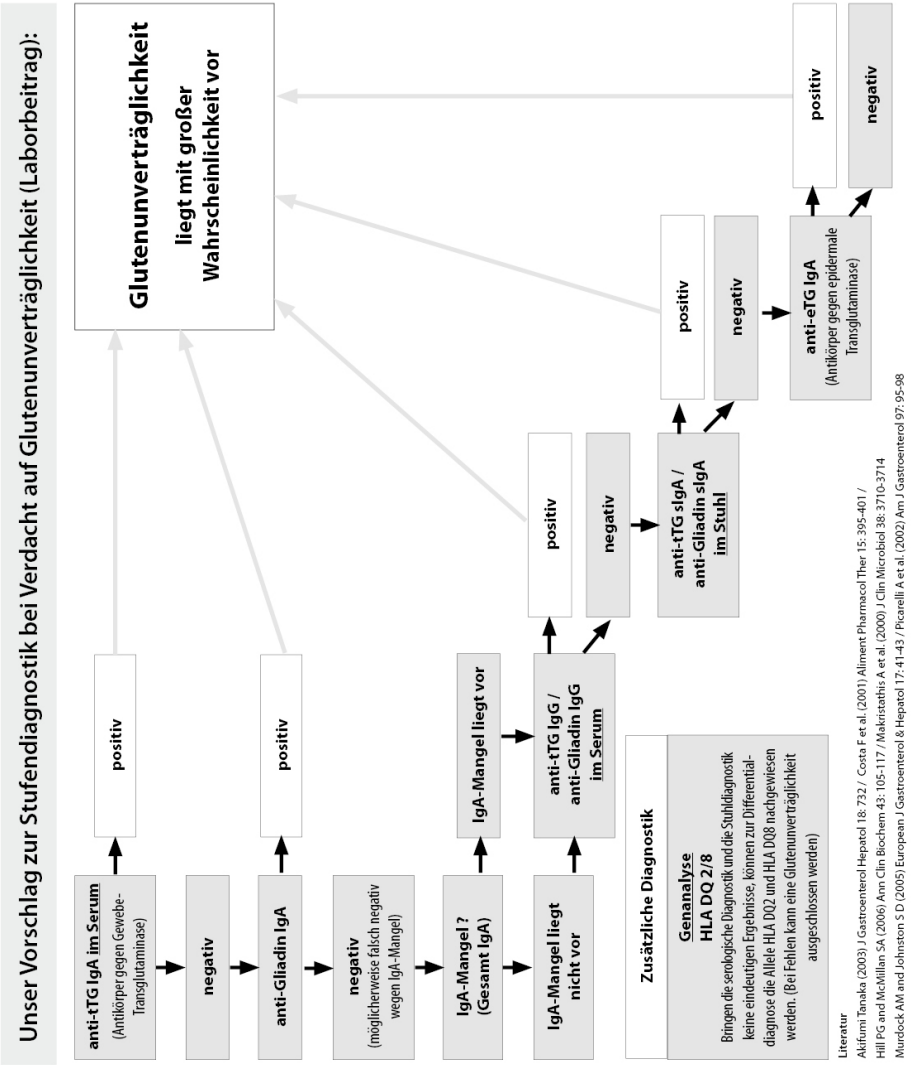
Indikationen

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

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9396	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9396	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 9396	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9396	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 ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

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 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.
- **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 (100 µl 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

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben 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 können in der 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 (verdünntes 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 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

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

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

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

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

Achtung: Berechnung gilt nur für eine Stuhlprobenverdünnung 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

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 64)

Die Reproduzierbarkeit von einem Ergebnis innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Eine Probe wurde 64-mal im anti-heTG IgA ELISA von einer Person angesetzt.

Probe	IgA anti-heTG Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	34,12	5,2

Inter-Assay (n = 15/16)

Die Reproduzierbarkeit von zwei Ergebnissen an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft. Zwei Proben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im anti-heTG IgA ELISA gemessen.

Probe	IgA anti-heTG Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1 (n = 15)	26,18	11,4
2 (n = 16)	12,38	15,9

Analytische Sensitivität

Die Leerwert-Obergrenze (*limit of blank*, LoB) wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 bestimmt und liegt bei 0,51 AU/ml.

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.
- 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



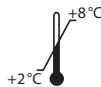
Gebrauchsanweisung beachten

anti-heTG IgA ELISA

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

Valid from 2018-05-02

REF **K9396**



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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

Table of Contents

1.	INTENDED USE	13
2.	INTRODUCTION	13
3.	MATERIAL SUPPLIED	13
4.	MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
5.	STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	15
6.	STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	16
7.	ASSAY PROCEDURE	16
	<i>Principle of the test</i>	16
	<i>Test procedure</i>	16
8.	RESULTS	18
9.	LIMITATIONS	18
10.	QUALITY CONTROL	18
	<i>Reference range</i>	18
11.	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	19
	<i>Precision and reproducibility</i>	19
	<i>Analytical Sensitivity</i>	19
12.	PRECAUTIONS	19
13.	TECHNICAL HINTS	20
14.	GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	20

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

Indications

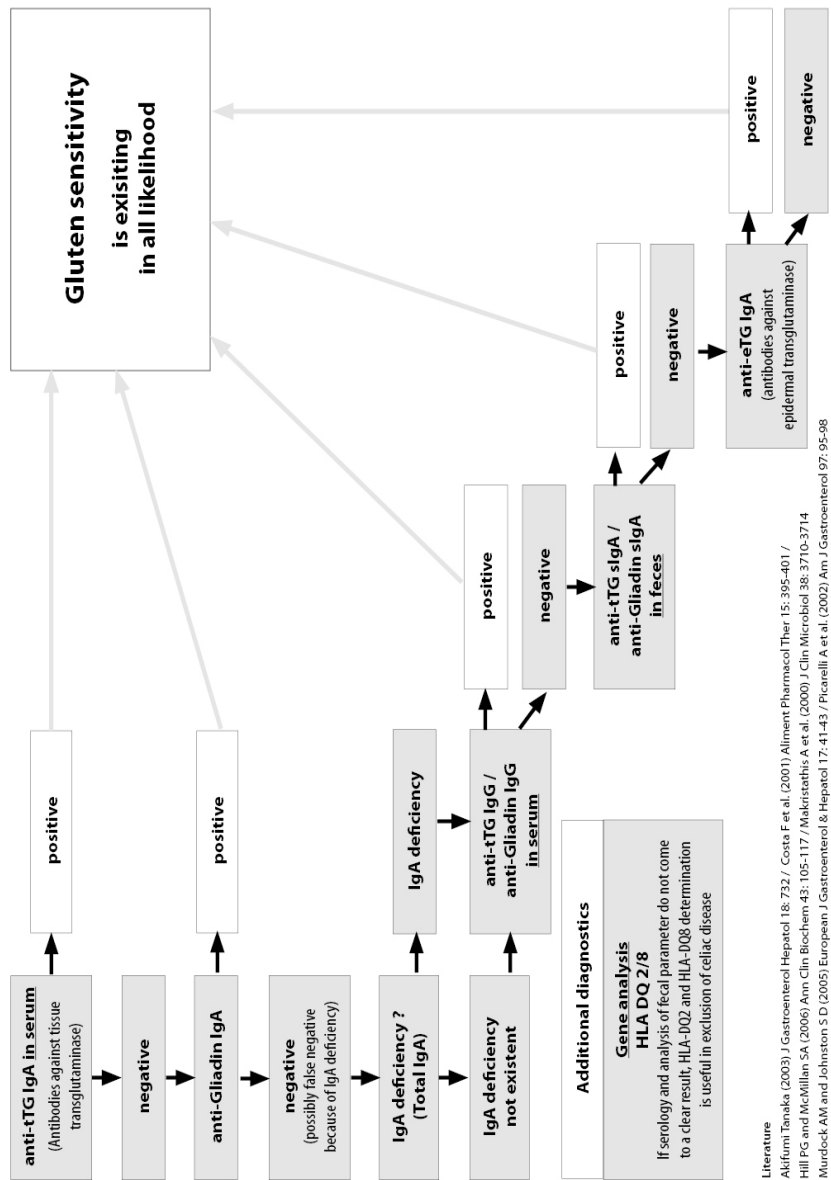
- See our proposal for stepwise diagnosis of gluten sensitivity on page 14.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9396	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 9396	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 9396	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 9396	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.

Our proposal to stepwise laboratory diagnostics of gluten sensitivity



4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard 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.
- 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 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 stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. 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 one month**.
- The **lyophilised negative, positive and cut-off controls** (CTRL NEG, CTR 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 + 10 ml 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** SAMPLEBUF washbuffer), mix well. = dilution I (1:10)

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

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

Sample storage

Avoid repeated thawing and freezing of samples.

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 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 (diluted 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 contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped 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

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:

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

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

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 64)

The reproducibility of one result in one measurement serie was evaluated. One sample was analysed 64 times by one person using the anti-heTG IgA ELISA.

Sample	IgA anti-heTG mean value [AU/ml]	CV [%]
1	34,12	5,2

Inter-Assay (n = 15/16)

The reproducibility of two results at different days was evaluated. Two samples were analysed at different days by different persons using the anti-heTG IgA ELISA.

Sample	IgA anti-heTG mean value [AU/ml]	CV [%]
1 (n = 15)	26,18	11,4
2 (n = 64)	12,38	15,9

Analytical Sensitivity

The LoB (limit of blank) was evaluated according to the CLSI guideline EP-17-A2 and resulted in 0.51 AU/ml.

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 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



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00

Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com