

## Instructions for Use

# anti-Tissue Transglutaminase sIgA (Stool) ELISA

IVD

CE

REF EIA-6169

Σ 96



**DRG** 

DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)



**DRG** 

DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
 Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
 Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.  
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.  
 Por favor, usar a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.**

### Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

|    |                                                   |    |
|----|---------------------------------------------------|----|
| 1  | INTENDED USE.....                                 | 2  |
| 2  | INTRODUCTION.....                                 | 2  |
| 3  | MATERIAL SUPPLIED.....                            | 2  |
| 4  | MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED.....           | 2  |
| 5  | PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS.....          | 4  |
| 6  | STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES.....           | 4  |
| 7  | ASSAY PROCEDURE.....                              | 5  |
| 8  | RESULTS.....                                      | 6  |
| 9  | LIMITATIONS.....                                  | 6  |
| 10 | QUALITY CONTROL.....                              | 6  |
| 11 | PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....                  | 7  |
| 12 | PRECAUTIONS.....                                  | 8  |
| 13 | TECHNICAL HINTS.....                              | 8  |
| 14 | GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE..... | 8  |
| 15 | REFERENCES / LITERATURE.....                      | 8  |
|    |                                                   |    |
| 1  | VERWENDUNGSZWECK.....                             | 9  |
| 2  | EINLEITUNG.....                                   | 9  |
| 3  | INHALT DER TESTPACKUNG.....                       | 9  |
| 4  | ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL.....    | 9  |
| 5  | VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN.....     | 11 |
| 6  | PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG.....             | 11 |
| 7  | TESTDURCHFÜHRUNG.....                             | 12 |
| 8  | ERGEBNISSE.....                                   | 13 |
| 9  | EINSCHRÄNKUNGEN.....                              | 13 |
| 10 | QUALITÄTSKONTROLLE.....                           | 13 |
| 11 | TESTCHARAKTERISTIKA.....                          | 14 |
| 12 | VORSICHTSMASSNAHMEN.....                          | 14 |
| 13 | TECHNISCHE MERKMALE.....                          | 15 |
| 14 | ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST.....                 | 15 |
| 15 | LITERATUR.....                                    | 15 |
|    |                                                   |    |
|    | SYMBOLS USED.....                                 | 16 |

## 1 INTENDED USE

This assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of anti-human tissue Transglutaminase slgA antibodies in stool.

For *in vitro* diagnostic use only.

## 2 INTRODUCTION

Dieterich et al. have shown, that tissue transglutaminase (tTG) is the predominant endomysial auto antigen characteristic for celiac disease.

In most celiac patients, usually several disorders are observed, e.g. malabsorption, infertility, osteoporosis and delayed growth of children. But it has also been widely reported that celiac disease is associated with a whole series of autoimmune diseases like Dermatitis herpetiformis Duhring, Diabetes mellitus, rheumatoid Arthritis, IgA-nephritis, neuro-psychiatric disorders, Hashimoto-Thyreoditis / M. Basedow and an increased risk of developing malignant T cell lymphoma.

Because the prevalence of associated autoimmune diseases in most cases is high, it is advisable to determine the auto antibodies against tissue transglutaminase (tTG) as a marker for celiac disease.

### Indications

- Autoimmune disease
- Food intolerance

See also our proposal for stepwise diagnosis of gluten sensitivity below.

## 3 MATERIAL SUPPLIED

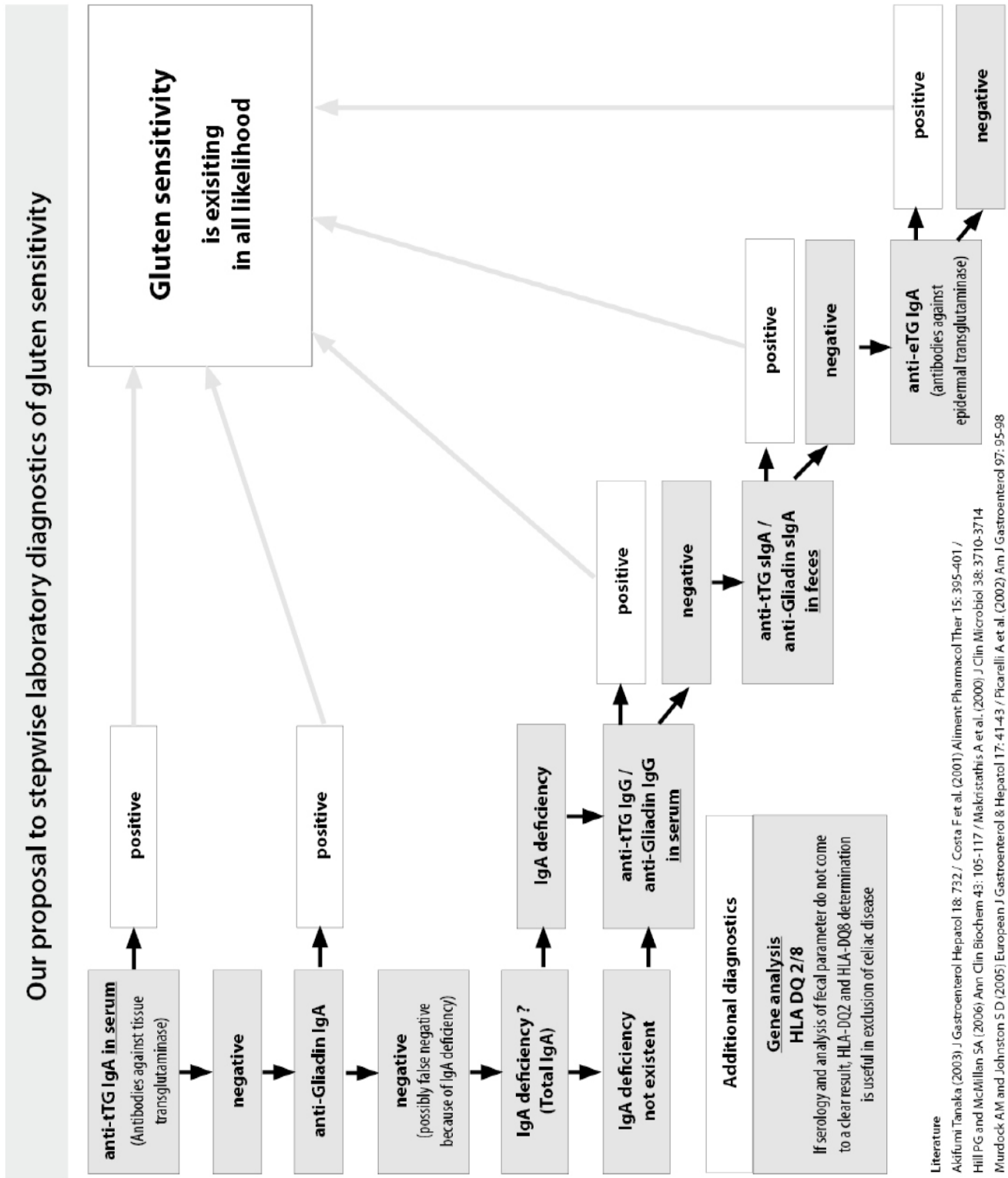
| Label               | Kit components                                                     | Quantity     |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>PLATE</b>        | Microtiter plate, pre-coated                                       | 12 x 8 wells |
| <b>WASHBUF</b>      | Wash buffer concentrate, 10x                                       | 2 x 100 mL   |
| <b>CONJ</b>         | Conjugate, peroxidase-labelled, ready-to-use                       | 1 x 15 mL    |
| <b>CTRL NEG</b>     | Control negative, lyophilised (see specification for range)        | 4 x 1 vial   |
| <b>CTRL POS</b>     | Control positive, lyophilised (see specification for range)        | 4 x 1 vial   |
| <b>CTRL CUT OFF</b> | Cut off control, lyophilized (see specification for concentration) | 4 x 1 vial   |
| <b>SUB</b>          | Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use                     | 1 x 15 mL    |
| <b>STOP</b>         | Stop solution, ready-to-use                                        | 1 x 15 mL    |
| <b>IDK Extract</b>  | Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract</i> , 2.5 x           | 1 x 100 mL   |

## 4 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water\*
- Stool sample application system such as Cat. No.: EIA-5674
- Horizontal microtiter plate shaker
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µL single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- 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)

\* DRG 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).

Our proposal to stepwise laboratory diagnostics of gluten sensitivity



## 5 PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:**  
The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 mL WASHBUF + 900 mL ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2 °C - 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 °C - 8 °C for 1 month.**
- **Preparation of the extraction buffer:**  
The **extraction buffer concentrate *IDK Extract*** has to be diluted with ultrapure water **1:2.5** before use (100 mL *IDK Extract* + 150 mL ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at 37°C in a water bath.  
The ***IDK Extract*** is stable at **2 °C - 8 °C** until the expiry date stated on the label.  
Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract*) can be stored in a closed flask at **2 °C - 8 °C for 4 months.**
- The **lyophilised controls (CTRL NEG, CTRL POS and CTRL CUT OFF)** are stable at **2 °C - 8 °C** until the expiry date stated on the label.  
**Reconstitution** details are given in the **specification data sheet.**  
**Controls** (reconstituted CTRL NEG, CTRL POS and CTRL CUT OFF) **are not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready-to-use.  
Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2 °C - 8 °C.**

## 6 STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### 6.1 Sample storage

#### Raw stool

Raw stool samples can be stored for 4 weeks at -20 °C. Avoid more than 3 freezethaw-cycles.

#### Stool suspensions

Stool extract can be stored for 3 days at 2 °C - 8 °C or -20 °C or for one day at room temperature (15 °C - 30 °C). Avoid more than three freeze-thaw cycles.

### 6.2 Extraction of the stool samples

**Extraction buffer** (1:2.5 diluted *IDK Extract*) is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

#### Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: EIA-5674)

##### **Stool sample tube – Instructions for use**

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample used and the volume of the buffer.

##### **SAS with 1.5 mL extraction buffer:**

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Applied amount of stool: | 15 mg  |
| Buffer Volume:           | 1.5 mL |
| Dilution Factor:         | 1:100  |

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

1. The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
2. Fill the **empty stool sample tube** with **1.5 mL extraction buffer** (1:2.5 diluted *IDK Extract*) before using it with the sample.  
**Important:** Allow the extraction buffer to reach room temperature.

3. Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
4. Vortex the tube well until no stool sample remains in the notches. **Important:** Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ~ 10 minutes improves the result.
5. Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
6. Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

**Dilution I: 1:100**

### 6.3 Dilution of samples

The suspension from the sample extraction (dilution I) is further diluted **1:50 with wash buffer**.

For example:

**20 µL** dilution I + **980 µL** wash buffer, mix well = **1:50 (dilution II)**

This results in a final dilution of **1:5000**.

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

## 7 ASSAY PROCEDURE

### 7.1 Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of anti-htTG sIgA antibodies in faeces.

In a first incubation step, the anti-htTG sIgA antibodies in the sample are bound to their antigen (human recombinant transglutaminase), which is immobilised to the surface of the microtiter plates. To remove all unbound foreign substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a peroxidase-labelled sIgA antibody is added. After another washing step, to remove all unbound antibodies, the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine. An acidic stop solution is then added to stop the reaction. The colour converts from blue to yellow.

The intensity of the yellow colour is directly proportional to the amount of bound antibodies and can be determined photometrically at 450 nm. The results are evaluated by comparison with a Cut off value.

### 7.2 Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15 °C - 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 °C - 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 DRG.

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 **100 µL controls/diluted samples** into the respective well
3. Cover the strips and incubate for **1 hour** at room temperature (15 °C - 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 °C - 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 °C - 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

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

Cut off =  $OD_{\text{Cut off control}} = 100 \text{ U/L}$

### Example

$OD_{\text{patient sample}} = 0.685$

$OD_{\text{Cut off control}} = 0.234 = 100 \text{ U/L}$

Concentration patient sample =  $0.685 \times 100 \text{ U/L} / 0.234 = 292.7 \text{ U/L}$

**Attention:** Calculation is only valid for a sample dilution factor of **1:5000**.

## 9 LIMITATIONS

The lower limit of the measurement range is the LoB. LoB see chapter "Performance Characteristics".

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

## 10 QUALITY CONTROL

DRG 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.

### 10.1 Reference range

Based on an internal study with apparently healthy adults (n = 45) resulted in a reference value of **< 100 U/L**.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1 Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed by diluting a positive stool sample with a negative stool sample.

For anti-htTG sIgA in stool, the method has been demonstrated to be linear from 75.92 to 229.95 U/L, showing a non-linear behaviour of less than  $\pm 20\%$  in this interval.

| Dilution                     | Expected [U/L] | Obtained [U/L] | Recovery [%] |
|------------------------------|----------------|----------------|--------------|
| Positive sample,<br>1:5000.0 | –              | 229.95         | –            |
| 1:5769.2                     | 209.41         | 207.65         | 99.16        |
| 1:6250.0                     | 199.14         | 185.35         | 93.08        |
| 1:6818.2                     | 188.87         | 189.96         | 100.58       |
| 1:7500.0                     | 178.61         | 167.99         | 94.06        |
| 1:8333.3                     | 168.34         | 163.25         | 96.98        |
| 1:9375.0                     | 158.07         | 150.67         | 95.32        |
| 1:10714.3                    | 147.80         | 139.91         | 94.66        |
| 1:12500.0                    | 137.53         | 129.93         | 94.47        |
| 1:15000.0                    | 127.26         | 119.25         | 93.70        |
| 1:18750.0                    | 117.00         | 111.92         | 95.66        |
| 1:25000.0                    | 106.73         | 105.98         | 99.30        |
| 1:37500.0                    | 96.46          | 92.55          | 95.95        |
| 1:75000.0                    | 86.19          | 81.54          | 94.60        |
| Negative sample,<br>1:5000.0 | –              | 75.92          | –            |

### 11.2 Analytical Sensitivity

Limit of blank, LoB 33.01 U/L

### 11.3 Accuracy – Precision

#### Repeatability (Intra-Assay); n = 40

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

| Sample | Mean value [U/L] | CV [%] |
|--------|------------------|--------|
| 1      | 159.63           | 5.8    |
| 2      | 83.64            | 8.9    |

#### Reproducibility (Inter-Assay); n = 18

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

| Sample | Mean value [U/L] | CV [%] |
|--------|------------------|--------|
| 1      | 125.73           | 12.1   |
| 2      | 150.88           | 10.5   |



## 12 PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.



**Warning:** Causes serious eye irritation.

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

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

## 13 TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

## 14 GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- 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. DRG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.

## 15 REFERENCES / LITERATURE

1. Dieterich, W. et al., 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature medicine*, 3(7), pp.797–801.

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung der anti-humanen Gewebetransglutaminase sIgA-Antikörpern aus Stuhl geeignet.

Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2 EINLEITUNG

Dieterich und Mitarbeiter identifizierten 1997 die Gewebetransglutaminase (tTG = *tissue transglutaminase*) als das Hauptantigen der Endomysium-Antikörper, die charakteristisch für die Zöliakie sind.

Bei den meisten Zöliakie-Patienten liegen häufig mehrere Funktionsstörungen vor, wie z. B. Malabsorption, Unfruchtbarkeit, Osteoporose und verzögertes Wachstum bei Kindern.

Es gibt zahlreiche Berichte über eine Reihe anderer Autoimmunerkrankungen, die mit einer Zöliakie assoziiert sind. Dazu gehören Dermatitis herpetiformis Duhring, Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis, IgA-Nephritis, neuro-psychiatrische Störungen, Hashimoto-Thyreoditis / Morbus Basedow und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von bösartigem T-Zell-Lymphom.

Da die Prävalenz Zöliakie-assoziiierter Autoimmunerkrankungen meistens hoch ist, wird empfohlen, die Autoantikörper gegen Gewebetransglutaminase als Marker für Zöliakie zu bestimmen.

### Indikationen

- Autoimmunerkrankungen
- Nahrungsmittelunverträglichkeiten

Siehe auch unseren Vorschlag für Stufendiagnostik bei Verdacht auf Glutenunverträglichkeit auf der folgenden Seite.

## 3 INHALT DER TESTPACKUNG

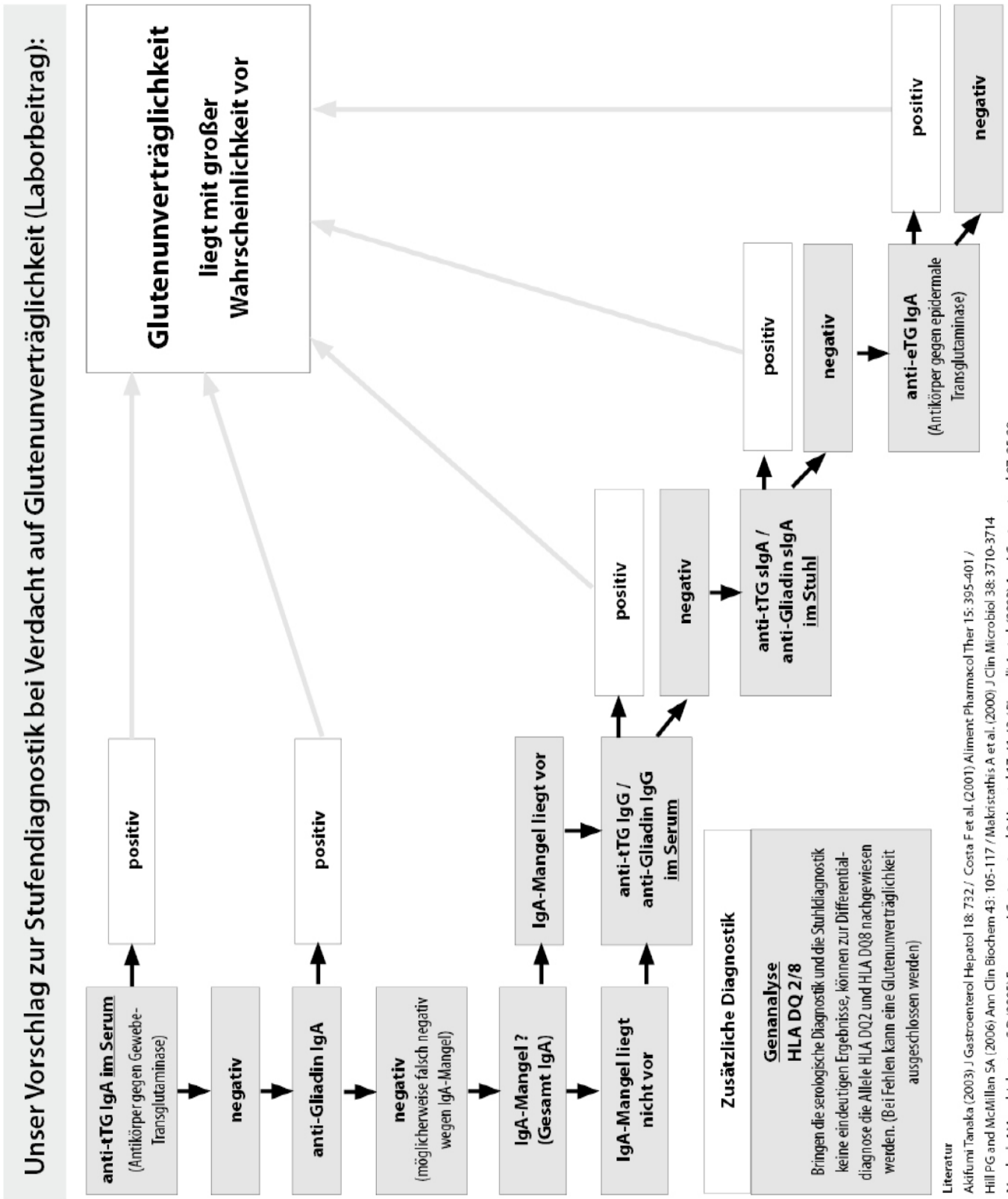
| Bezeichnung  | Kit Komponenten                                                              | Menge               |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| PLATE        | Mikrotiterplatte, vorbeschichtet                                             | 12 x 8 Vertiefungen |
| WASHBUF      | Waschpufferkonzentrat, 10x                                                   | 2 x 100 mL          |
| CONJ         | Konjugat (peroxidase markiert), gebrauchsfertig                              | 1 x 15 mL           |
| CTRL NEG     | Kontrolle negativ, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)       | 4 x 1 Fläschchen    |
| CTRL POS     | Kontrolle positiv, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)       | 4 x 1 Fläschchen    |
| CTRL CUT OFF | Cut off-Kontrolle, lyophilisiert (Konzentration der Spezifikation entnehmen) | 4 x 1 Fläschchen    |
| SUB          | Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig                              | 1 x 15 mL           |
| STOP         | Stopplösung, gebrauchsfertig                                                 | 1 x 15 mL           |
| IDK Extract  | Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract, 2,5 x                               | 1 x 100 mL          |

## 4 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Stuhlprobenaufbereitungssystem wie z.B. Artikel-Nr. EIA-5674
- Mikrotiterplattenschüttler
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µL
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

\* DRG 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).

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



## 5 VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:**  
Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 mL 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. **WASHBUF** kann bei **2 °C - 8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden.  
Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2 °C - 8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:**  
Das **Extraktionspufferkonzentrat *IDK Extract*** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 mL *IDK Extract* + 150 mL Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das ***IDK Extract*** kann bei **2 °C - 8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden.  
Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*) ist **4 Monate bei 2 °C - 8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Kontrollen (CTRL CUT OFF, CTRL NEG und CTRL POS)** sind bei **2 °C - 8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.  
Die **Rekonstitutionsvorgaben** für CTRL CUT OFF, CTRL NEG und CTRL POS sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen.  
**Kontrollen** (rekonstituierte CTRL CUT OFF, CTRL NEG und CTRL POS) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2 °C - 8 °C** gelagert, angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6 PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

### 6.1 Lagerung

#### Rohstuhl

Rohstuhlproben können bei -20 °C 4 Wochen gelagert werden. Mehr als 3 Einfrier- Auftau-Zyklen sind zu vermeiden.

#### Stuhlsuspensionen

Stuhlextrakt kann bei 2 °C - 8 °C oder -20 °C für 3 Tage gelagert werden, bei Raumtemperatur (15 °C - 30 °C) für einen Tag. Der Extrakt sollte maximal drei Einfrier- / Auftauzyklen unterzogen werden.

### 6.2 Stuhlprobenextraktion

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

#### Stuhlprobenaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. EIA-5674)

##### Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

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

##### SAS mit 1,5 mL Extraktionspuffer:

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Aufgenommene Stuhlmenge: | 15 mg  |
| Puffervolumen:           | 1,5 mL |
| Verdünnungsfaktor:       | 1:100  |

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

1. Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
2. Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 mL Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*) **befüllen**.  
**Wichtig:** Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
3. Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.

- Das Röhrchen solange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind.  
**Wichtig:** Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres Einweichen (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

**Verdünnung I**            **1:100**

### 6.3 Probenverdünnung

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:50 mit Waschpuffer** weiterverdünnt.

#### Zum Beispiel:

**20 µL** Überstand (Verdünnung I) + **980 µL** Waschpuffer, mischen = **1:50 (Verdünnung II)**.

Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von **1:5000**.

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

## 7 TESTDURCHFÜHRUNG

### 7.1 Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von anti-humanen Gewebetransglutaminase-slgA-Antikörpern.

Das Antigen Transglutaminase ist auf einer Mikrotiterplatte fixiert. Die in der Probe vorhandenen anti-htTG-slgA-Antikörper binden in einem Inkubationsschritt an das Antigen. Nach einem Waschschrift wird mit einem peroxidase-markierten anti-slgA- Antikörper detektiert. Als Substrat wird TMB eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur Analytmenge (Probe bzw. Kontrolle) proportional. Die entstandene chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich des ermittelten Wertes mit dem Cut off-Wert.

### 7.2 Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15 °C - 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 °C - 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 DRG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

- 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
- 100 µL Kontrollen/verdünnte Proben** in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
- Streifen abdecken und **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15 °C - 30 °C) **unter Schütteln\*** inkubieren.
- 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.
- 100 µL Konjugat (CONJ)** in jede Vertiefung pipettieren.
- Streifen abdecken und **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15 °C - 30 °C) **unter Schütteln\*** inkubieren.
- 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.
- 100 µL Substrat (SUB)** in jede Vertiefung pipettieren.
- 10–20 min\*\*** bei Raumtemperatur (15 °C - 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

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

Cut off =  $OD_{\text{Cut off-Kontrolle}} = 100 \text{ U/L}$

### Beispiel

$OD_{\text{Patientenprobe}} = 0.685$

$OD_{\text{Cut off-Kontrolle}} = 0.234 = 100 \text{ U/L}$

Konzentration Patientenprobe =  $0,685 \times 100 \text{ U/L} / 0,234 = 292,7 \text{ U/L}$

**Achtung:** Berechnung gilt nur für eine Stuhlprobenverdünnung von **1:5000**.

## 9 EINSCHRÄNKUNGEN

Die Untergrenze des Messbereichs ist der LoB. LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

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

## 10 QUALITÄTSKONTROLLE

DRG 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 DRG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### 10.1 Referenzwerte

Eine laborinterne Studie mit Stuhlproben von augenscheinlich gesunden Erwachsenen (n = 45) ergab einen Referenzwert von **< 100 U/L**.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11 TESTCHARAKTERISTIKA

### 11.1 Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels einer seriellen Verdünnung einer positiven mit einer negativen Stuhlprobe nachgewiesen.

Für anti-htTG slgA in Stuhl wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 75,92 bis 229,95 U/L nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als  $\pm 20\%$ .

| Verdünnung                  | Erwartet [U/L] | Gemessen [U/L] | Wiederfindung [%] |
|-----------------------------|----------------|----------------|-------------------|
| Positive Probe,<br>1:5000,0 | –              | 229,95         | –                 |
| 1:5769,2                    | 209,41         | 207,65         | 99,16             |
| 1:6250,0                    | 199,14         | 185,35         | 93,08             |
| 1:6818,2                    | 188,87         | 189,96         | 100,58            |
| 1:7500,0                    | 178,61         | 167,99         | 94,06             |
| 1:8333,3                    | 168,34         | 163,25         | 96,98             |
| 1:9375,0                    | 158,07         | 150,67         | 95,32             |
| 1:10714,3                   | 147,80         | 139,91         | 94,66             |
| 1:12500,0                   | 137,53         | 129,93         | 94,47             |
| 1:15000,0                   | 127,26         | 119,25         | 93,70             |
| 1:18750,0                   | 117,00         | 111,92         | 95,66             |
| 1:25000,0                   | 106,73         | 105,98         | 99,30             |
| 1:37500,0                   | 96,46          | 92,55          | 95,95             |
| 1:75000,0                   | 86,19          | 81,54          | 94,60             |
| Negative Probe,<br>1:5000,0 | –              | 75,92          | –                 |

### 11.2 Analytische Sensitivität

Leerwert (*limit of blank, LoB*) 33,01 U/L

### 11.3 Genauigkeit – Präzision

#### Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 40

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

| Probe | Mittelwert [U/L] | VK [%] |
|-------|------------------|--------|
| 1     | 159,63           | 5,8    |
| 2     | 83,64            | 8,9    |

#### Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 18

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

| Probe | Mean value [U/L] | VK [%] |
|-------|------------------|--------|
| 1     | 125,73           | 12,1   |
| 2     | 150,88           | 10,5   |

## 12 VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.



**Achtung:** Verursacht schwere Augenreizung.

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

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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. 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 Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma DRG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

### 15 LITERATUR

1. Dieterich, W. et al., 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature medicine*, 3(7), pp.797–801.



## SYMBOLS USED

| Symbol                                                                              | English                                     | Deutsch                             | Italiano                              | Español                                    | Français                                 | Português                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------|
|    | European Conformity                         | CE-Konformitätskennzeichnung        | Conformità europea                    | Conformidad europea                        | Conformité normes européennes            | Conformidade Europeia                        |
|    | Consult instructions for use *              | Gebrauchsanweisung beachten *       | Consultare le istruzioni per l'uso    | Consulte las instrucciones de uso          | Consulter les instructions d'utilisation | Consultar as instruções de uso               |
|    | <i>In vitro</i> diagnostic medical device * | <i>In-vitro</i> -Diagnostikum *     | Diagnostica in vitro                  | Diagnóstico in vitro                       | Diagnostic in vitro                      | Dispositivo médico para diagnóstico in vitro |
|    | Catalogue number *                          | Katalognummer *                     | No. di Cat.                           | No de catálogo                             | Référence                                | Número de catálogo                           |
|    | Batch code *                                | Chargen-bezeichnung *               | Lotto no                              | Número de lote                             | No. de lot                               | Código do lote                               |
|    | Contains sufficient for <n> tests *         | Ausreichend für <n> Prüfungen *     | Contenuto sufficiente per "n" saggi   | Contenido suficiente para <n> ensayos      | Contenu suffisant pour "n" tests         | Suficiente para <n> determinações            |
|    | Temperature limit *                         | Temperaturgrenzwerte *              | Temperatura di conservazione          | Temperatura de conservación                | Temperature de conservation              | Limites de temperatura                       |
|    | Use-by date *                               | Verwendbar bis *                    | Data di scadenza                      | Fecha de caducidad                         | Date limite d'utilisation                | Prazo de validade                            |
|    | Manufacturer *                              | Hersteller *                        | Fabbricante                           | Fabricante                                 | Fabricant                                | Fabricante                                   |
|    | Distributor *                               | Vertriebspartner *                  | Distributore                          | Distribuidor                               | Distributeur                             | Distribuidor                                 |
|    | Date of manufacture *                       | Herstellungsdatum *                 | Data di produzione                    | Fecha de fabricación                       | Date de production                       | Data de fabricação                           |
|   | Biological risks *                          | Biologische Risiken *               | Rischi biologici                      | Riesgos biológicos                         | Risques biologiques                      | Riscos biológicos                            |
|  | Caution *                                   | Achtung *                           | Attenzione                            | Precaución                                 | Attention                                | Cuidado                                      |
|  | Unique device Identifier *                  | eindeutige Produktidentifizierung * | Identificativo unico del dispositivo* | Identificación exclusiva del dispositivo * | Identifiant de dispositif unique*        | Identificador único do dispositivo *         |
|                                                                                     |                                             |                                     |                                       |                                            |                                          |                                              |
|  | For research use only                       | Nur für Forschungszwecke            | Solo a scopo di ricerca               | Sólo para uso en investigación             | Seulement dans le cadre de recherches    |                                              |
| <i>Content</i>                                                                      | Content                                     | Inhalt                              | Contenuto                             | Contenido                                  | Conditionnement                          | Conteúdo                                     |
| <i>Volume/No.</i>                                                                   | Volume / No.                                | Volumen/Anzahl                      | Volume/Quantità                       | Volumen/Número                             | Volume/Quantité                          | Volume / Quantidade                          |