

Arbeitsanleitung

anti-htTG IgG ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung von anti-human-Gewebetransglutaminase IgG Antikörpern in Serum

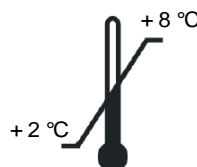
Gültig ab 20.06.2008



K 9398



96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Immundiagnostik@t-online.de
www.immundiagnostik.com

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|-----------|
| 1. VERWENDUNGSZWECK | 3 |
| 2. EINLEITUNG | 3 |
| 3. TESTPRINZIP | 3 |
| 4. INHALT DER TESTPACKUNG | 4 |
| 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL | 5 |
| 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN | 6 |
| 7. HINWEISE UND VORSICHTSMABNAHMEN | 7 |
| 8. VORBEREITUNG DES PROBENMATERIALS | 7 |
| PIPETTIERSHEMA | 8 |
| 10. ERGEBNISSE | 9 |
| 11. QUALITÄTSKONTROLLE | 9 |
| 12. TECHNISCHE MERKMALE | 9 |
| 13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 10 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von anti-human Gewebettransglutaminase IgG Antikörpern in Serum geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

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

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

Durch die Bestimmung der **anti-htTG IgG** Antikörper wird der Patient nicht weiter belastet, da eine Biopsie - „Gold Standard“ - des Dünndarms bei der Verlaufkontrolle und dem Screening der Krankheit nicht zwingend notwendig ist.

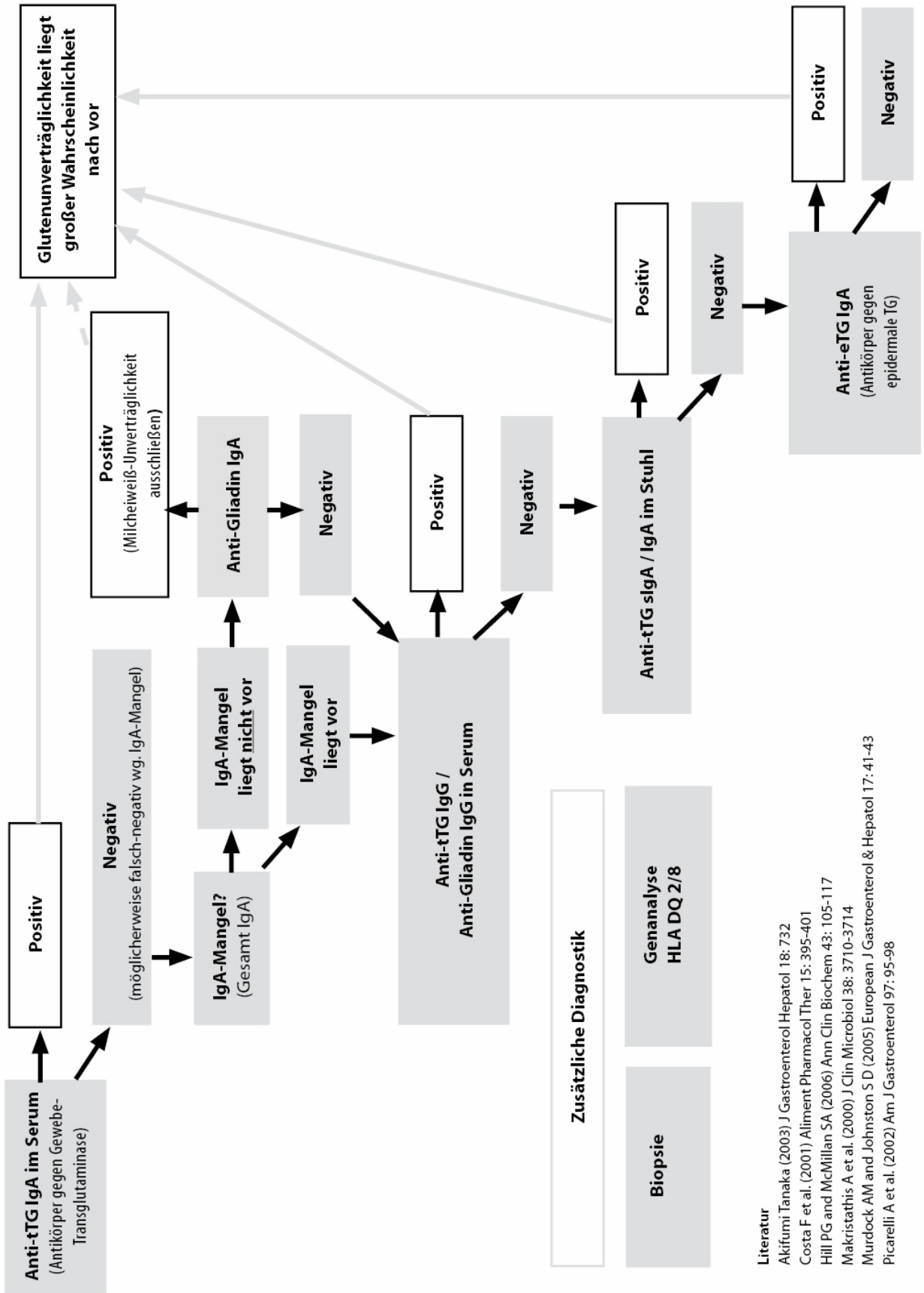
Indikation

- Autoimmunerkrankungen
- Nahrungsmittelunverträglichkeit
- Siehe auch unseren Vorschlag für Stufendiagnostik bei Verdacht auf Glutenunverträglichkeit auf Seite 4.

3. TESTPRINZIP

Das Antigen tTG ist auf einer Mikrotiterplatte fixiert. In der Probe vorhandene anti-tTG-Antikörper binden im ersten Inkubationsschritt an das Antigen. Nach einem Waschschrift wird der gebundene Antikörper durch einen Kaninchen anti-IgG Peroxidase-markierten Antikörper quantitativ nachgewiesen. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem anti-tTG IgG Antikörper-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Unser Vorschlag zur Stufendiagnostik bei Verdacht auf Glutenunverträglichkeit:



4. INHALT DER TESTPACKUNG

| Artikel Nr. | Inhalt | Kit Komponenten | Menge |
|-------------|----------|---|------------------------|
| K 9398MTP | PLATE | Mikrotitermodul, vorbeschichtet | 12 x 8 Vertiefungen |
| K 9398WP | WASHBUF | ELISA Waschpufferkonzentrat 10x | 2 x 100 ml |
| K 9398K | CONJ | POD Antikörper, (Kaninchen anti-IgG, Peroxidase-markiert) | 1 x 200 µl |
| K 9398KO1 | CTRL NEG | Kontrolle negativ, lyophilisiert | 4 vials |
| K 9398KO2 | CTRL POS | Kontrolle positiv, lyophilisiert | 4 vials |
| K 9398TMB | SUB | TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |
| K 9398AC | STOP | ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, 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 zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (50 ml Konzentrat + 450 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der **Peroxidase-markierte Antikörper** (CONJ) wird **1:100** in Waschpuffer verdünnt (100 µl Antikörper + 10 ml Waschpuffer). Der **unverdünnte Peroxidase-markierte Antikörper** ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Antikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden**.
- Die **lyophilisierten Kontrollen** (CTRL NEG, CTRL POS) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Kontrollen werden mit 500 µl Waschpuffer rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Kontrollen können nicht gelagert werden**.
- Alle Testreagenzien sind bei **2-8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. 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 verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

8. VORBEREITUNG DES PROBENMATERIALS

Serum

Serum wird **1:2000** mit Waschpuffer verdünnt, z.B.:

50 µl Serum + 450 µl Waschpuffer - ergibt eine **1:10** Vorverdünnung;
danach noch

10 µl Vorverdünnung + 1990 µl Waschpuffer - ergibt eine
Endverdünnung von **1:2000**.

9. Testdurchführung

Pipettierschema

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte **vor Gebrauch 5x mit 250 µl** Waschpuffer waschen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl CTRL NEG** bzw. **CTRL POS** (negative Kontrolle bzw. positive Kontrolle) und vorbereitete **Patientenseren** pro Vertiefung pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100 µl** vorverdünntes **CONJ** (Peroxidase-markierten Antikörper) in jede Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **100 µl SUB** (TMB-Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
8. **10 – 15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. **50 µl STOP** (Stopplösung) pro Vertiefung zusetzen und kurz mischen.
10. Extinktion **sofort** im ELISA-Reader bei **450 nm** messen.

10. ERGEBNISSE

Berechnung

$$\begin{aligned} & \text{Mittelwert OD der negativ Kontrolle} \times \text{Faktor (siehe Datenblatt)} \\ & = \text{cut off} = 18 \text{ AU/ml} \end{aligned}$$

z.B. $0.214 \times 2 = 0.428 = 18 \text{ AU/ml}$

Der cut off wird im Rechenbeispiel bei 0.428 festgelegt. Proben die ein höhere mittlere optische Dichte haben sind somit positiv. (z.B. $0.428 = 18 \text{ AU/ml}$ eine Probe gemessen mit $0.685 = 28.8 \text{ AU/ml}$)

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Für die Qualitätskontrolle empfehlen wir die Verwendung unabhängiger externer Kontrollen und das Messen der mitgeführten positiven Kontrolle.

12. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien soll vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen nur zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung