

Zusammensetzung der Testkits

Menge	Artikel
gebrauchsfertig 1 Stk	Mikrotiterplatte (Mit Transglutaminase beschichtet)
gebrauchsfertig 10 x 0,5 ml	Standards (in wäßriger Lösung mit Thimerosal.)
gebrauchsfertig 4 x 0,5 ml	Kontrollen (in wäßriger Lösung mit Thimerosal.)
gebrauchsfertig 1 x 150 µl	Konjugatkonzentrat (HRP markierter Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Thimerosal)
gebrauchsfertig 15 ml	Konjugatpuffer (Phosphatpuffer mit Thimerosal und Proteinzusatz pH 7,4)
gebrauchsfertig 12 ml	Substrat (TMB)
gebrauchsfertig 12 ml	Stopplösung (0,5 M Schwefelsäure)
in 500 ml entionisiertem Wasser lösen.	Konzentrat für den Waschpuffer (Phosphatpuffer mit Thimerosal und Detergenz pH 7,4)
in 500 ml entionisiertem Wasser lösen.	Konzentrat für den Probenverdünnungspuffer (Phosphatpuffer mit Natriumazid und Proteinzusatz pH 7,4)

Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- 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 Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. 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 (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H₂SO₄ 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.

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.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien sollte vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Stelle Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.

Allgemeine Hinweise

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- 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 Maier analytik GmbH 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 Firma Maier Analytik GmbH, zurück zu senden.

Bestimmung von Anti-Transglutaminase im Stuhl mittels eines ELISA

Nur zur "in vitro Diagnostik"



Einführung

Gluten sensitive Enteropathie (GSE) wird durch das Klebereiweiß von Weizen, Roggen, Hafer und Gerste hervorgerufen. Ein frühes Erkennen der GSE ist sehr wichtig, da Folgeerscheinungen durch Einhaltung einer Gluten-freien Diät verhindert werden können. Transglutaminase-Antikörper sind vor allem charakteristisch für Gluten-sensitive Enteropathien. Nicht-invasive Diagnostiktests wie Anti-Gliadin- und Anti-Endomysium-Antikörperbestimmung (Anti Transglutaminase) haben eine hohe Sensitivität (>90 %) und hohe Spezifität (>95 %). Es ist jedoch eine Biopsie des Dünndarms erforderlich, um die Diagnose der GSE zu bestätigen (Gold-Standard).

Vorteile

- Durch die Bestimmung von Anti-Transglutaminase wird der Patient nicht weiter belastet, wie es bei einer Biopsie der Fall wäre. Dies ist besonders wichtig bei der Untersuchung von Kleinkindern.
- Ein Screening ist durch diese Methode möglich.

Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode

Transglutaminase ist an die Polystyrenwand gebunden. Die zu bestimmenden Stuhlverdünnungen werden in die Vertiefungen pipettiert. Während der Inkubationszeit binden die spezifischen Antikörper aus der Probe an das fixierte Antigen. Ungebundenes Material wird weg gewaschen und ein HRP gekoppelter Antikörper zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation mit nachfolgendem Waschschritt wird die Färbereaktion durch Zugabe von TMB gestartet. Nach einer weiteren Inkubation wird die Färbereaktion durch Schwefelsäure gestoppt und in einem Photometer bei 450 nm gemessen.

Assay Parameter

Antigen an der Platte:	Transglutaminase
Konjugat	Anti-Human-IgA, IgG, IgM, IgE mit HRP markiert
Probenmaterial:	Stuhl 1/50 in PPGNE
Probenvolumen	100 µl
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	0,66 U/l
Recovery :	96,5 ± 7
Linearität (r= Korrelationskoeffizient):	r ₂ = 0,995
Intraassayvarianz:	< 7 %
Interassayvarianz:	< 12,5 %
Meßbereich:	50 - 400 U/l
Normbereich	< 100 U/l

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

Verwendete Geräte und Materialien

Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
 Meßzylinder (500 ml)
 Multipette mit Aufsatz
 Zentrifuge 3000 x g
 Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm).

Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen
 10µl und 100 µl Präzisionspipette
 Vortex-Mixer
 Folie zum Abkleben der Platte

Methodendurchführung

Vorbereitungen für die Methodendurchführung						
1	Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.					
2	Verdünnungsmedium: Das Röhrchen mit dem Probenverdünnungspufferkonzentrat wird in einem Wasserbad so lange erhitzt bis die Lösung klar ist. Danach wird der gesamte Inhalt in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt.					
3	Waschpuffer: Der gesamte Inhalt des Waschpufferkonzentrat wird in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt.					
4	Vorbereitung der Stuhlproben. Stuhlproben werden eingewogen und 1/50 (Gewicht zu Volumen) mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt (Zu 0,1 g Stuhl werden 5 ml Puffer zugegeben). Die Proben werden so lange gemischt bis die Lösung homogen ist. Die Röhrchen werden 15 min bei 3000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wird im Assay eingesetzt.					
5	Verdünnen des Konjugats (1/100):					
	Anzahl der Streifen	Konjugat	Konjugat-puffer	Anzahl der Streifen	Konjugat	Konjugat-puffer
	1	10 µl	1 ml	7	60 µl	6 ml
	2	20 µl	2 ml	8	70 µl	7 ml
	3	30 µl	3 ml	9	80 µl	8 ml
	4	40 µl	4 ml	10	90 µl	9 ml
	5-6	50 µl	5 ml	11-12	100 µl	10 ml

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. Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.
- Reagenzien mit einem Volumen kleiner als 200 µl sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** und **Probenpufferkonzentrat** müssen vor Gebrauch in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (35 ml bzw. 30 ml Konzentrat + 500 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentrate kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Die Pufferkonzentrate können bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnten Pufferlösungen sind bei 2-8 °C einen Monat in geschlossenen Gefäßen haltbar.
- Die **Standards und Kontrollen** sind bei <-15 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil und können bis zu 2-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.
- Die **Mikrotiterplatte** ist in verschlossenem Plastikbeutel 30 Tage bei Raumtemperatur und bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- **Alle anderen Testreagenzien** sind bei 2-8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- **Nach Öffnen des Kits beträgt die Haltbarkeit 30 Tage**

Probenmaterial und Probenhaltbarkeit

Die Stuhlproben werden vor der Bestimmung extrahiert und verdünnt. Die Haltbarkeit der verdünnten Proben (1/50) beträgt 2 Tage bei 2-8 °C oder 12 Monate in tiefgefrorenem Zustand. Die höher verdünnte Stuhlsuspensionen sind nicht haltbar. Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen bzw. zu verdünnen.

Testansatz; alle Reaktionen sollten im Dunkeln stattfinden

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen.
100 µl Standards, Kontrollen und Proben laut Pipettierschema in die Vertiefungen pipetieren.
 den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren
 Waschen mit 5 * 250 µl Waschpuffer
100 µl verdünntes Konjugat (rote Deckel) in alle Vertiefungen
 den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren
 Waschen mit 5 * 250 µl Waschpuffer
100 µl Substrat (blauer Deckel) in alle Vertiefungen
 den Testansatz **30 min** bei Raumtemperatur inkubieren
100 µl Stopplösung (gelber Deckel) in alle Vertiefungen
 Die Färbung bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge 620nm messen.

Standards

Bei der Auswertung ist darauf zu achten, daß die folgenden Konzentrationen Verwendung finden:

Standard	1	2	3	4	5
Konzentration [mU/g]:	0	50	100	200	400

Die Konzentrationsangaben der Standards sind Nominalwerte und beziehen sich auf die Verdünnung der Proben (1/50). Damit kann die Konzentration pro Gramm Stuhl ermittelt werden. Bei der Verwendung anderer Verdünnungen muß die reale Standardkonzentration angenommen werden.

Reale Konzentration der Standards [mU/ml]:	0	1,0	2,0	4,0	8,0
---	---	-----	-----	-----	-----

Auswertung:

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die Punkt zu Punkt Auswertung :

Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.
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 mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

Gewichtete Spline-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 mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

Validierung 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.

Kontrolle 1:	→	50 – 150 mU/g
Kontrolle 2:	→	105 – 295 mU/g