

**Zusammensetzung der Testkits**

Menge	Artikel
gebrauchsfertig 1 Stk	<b>Mikrotiterplatte</b> (Mit Transglutaminase beschichtet)
gebrauchsfertig 1 x 1 ml	<b>Kalibrator</b> (in wäßriger Lösung mit Thimerosal.)
gebrauchsfertig 2 x 1 ml	<b>Kontrollen</b> (in wäßriger Lösung mit Thimerosal.)
gebrauchsfertig 1 x 150 µl	<b>Konjugatkonzentrat</b> (HRP markierter Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Thimerosal)
gebrauchsfertig 15 ml	<b>Konjugatpuffer</b> (Phosphatpuffer mit Thimerosal und Proteinzusatz pH 7,4)
gebrauchsfertig 12 ml	<b>Substrat (TMB)</b>
gebrauchsfertig 15 ml	<b>Stopplösung</b> (0,5 M Schwefelsäure)
in 500 ml entionisiertem Wasser lösen.	<b>Konzentrat für den Waschpuffer</b> (Phosphatpuffer mit Thimerosal und Detergenz pH 7,4)
in 500 ml entionisiertem Wasser lösen.	<b>Konzentrat für den Probenverdünnungspuffer</b> (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 befunden. 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 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 Pipettiervolumina 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**

Glutensensitive 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 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):	r2 = 0,995
Intraassayvarianz:	< 7 %
Interassayvarianz:	<12,5 %
Messbereich:	50 - 400 U/l
<b>Normbereich</b>	<b>&lt; 100 U/l</b>

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

**Verwendete Geräte und Materialien**

- |   |   |
|---|---|
| Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)   | Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen |
| Messzylinder (500 ml)   | 10µl und 100 µl Präzisionspipette       |
| Multipette mit Aufsatz  | Vortex-Mixer                            |
| Zentrifuge 3000 x g   | Folie zum Abkleben der Platte           |
| Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm). |   |

**Methodendurchführung**

Vorbereitungen für die Methodendurchführung						
1	<b>Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.</b>					
2	<b>Verdünnungsmedium:</b> Das Röhrchen mit dem Probenverdünnpufferkonzentrat 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	<b>Waschpuffer:</b> Der gesamte Inhalt des Waschpufferkonzentrat wird in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt.					
4	<b>Vorbereitung der Stuhlproben:</b> Stuhlproben werden eingewogen und 1/50 (Gewicht zu Volumen) mit dem Probenverdünnpuffer 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	<b>Verdünnen des Konjugats (1/100):</b>					
	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 **Kalibrator 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** Kalibrator, Kontrollen und Proben laut Pipettierschema in die Vertiefungen pipettieren.

den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur unter schütteln (optional) inkubieren,

Waschen mit 5 \* 250 µl Waschpuffer

**100 µl** verdünntes Konjugat (rote Deckel) in alle Vertiefungen

den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur unter schütteln (optional) inkubieren

Waschen mit 5 \* 250 µl Waschpuffer

**100 µl** Substrat (blauer Deckel) in alle Vertiefungen

den Testansatz **30 min** bei Raumtemperatur unter schütteln (optional) inkubieren

**100 µl** Stopplösung (gelber Deckel) in alle Vertiefungen

Die Färbung bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge 620 nm messen.

**Standards**

Für die Auswertung der Messwerte verwendet man ein 4-parametrisches Logit-Log-Model. Es müssen die Angaben zum Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators angegeben werden.

Diese sind auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden.

Je nach verwendeter Software finden die Parameter A,B,C und D oder die Optische Dichte bezogen auf die Konzentration Verwendung.

**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.

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