

Produkt- und Gebrauchsinformation

Seraline[®] Zöliakie-3 IgG Seraline[®] Zöliakie-3 IgA

Line Immunoassay zum Nachweis von IgG oder IgA Antikörpern gegen Gliadin, Gewebstransglutaminase (tTG) und Mannan in humanem Serum oder Plasma

REF LIA-001-3 G REF LIA-001-3 A  20  *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Sprehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Vertrieb

Virotech Diagnostics GmbH · Löwenplatz 5 · 65428 Rüsselsheim · Germany · www.virotechdiagnostics.com
Telefon +49 (0) 6142 6909 0 · Fax +49 (0) 6142 6909 19 · info@virotechdiagnostics.com

Einführung

Zu den chronischen gastrointestinalen Enteropathien zählen der Morbus Crohn, die Colitis ulcerosa und die Zöliakie (Sprue). Sie sind durch chronisch rezidivierende Entzündungsprozesse verschiedener Abschnitte des Verdauungssystems mit zum Teil ähnlichen (überlappenden) Krankheitssymptomen charakterisiert.

Ätiologisch werden für den Morbus Crohn vorrangig Reaktionen auf exogene Allergene, insbesondere Nahrungsmittel, und Immunregulationsstörungen angenommen, die eine granulomatöse Entzündung aller Wandschichten des gesamten Gastrointestinaltraktes hervorrufen. Als mit dem Morbus Crohn assoziierte Marker werden Antikörper (ASCA) gegen Oligomannosid-Epitope von *Saccharomyces cerevisiae* (Mannan) beschrieben, deren serologischer Nachweis das Krankheitsbild gegen die Colitis ulcerosa abgrenzt. Das in diesem Test verwendete Mannan entspricht dem Target dieser Antikörper.

Als ursächlich für die Colitis ulcerosa wird neben einer exogenen Sensibilisierung und bisher nicht näher identifizierten infektiösen Faktoren vornehmlich eine Autosensibilisierung diskutiert. Bevorzugt befallen sind die Mucosa und Submucosa des Colon und Rectum. Perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Autoantikörper (pANCA) werden als pathognomonisch für eine Colitis ulcerosa gewertet, wobei die antigene Struktur auf molekularer Ebene noch nicht identifiziert ist.

Die Zöliakie (Gluten-induzierte Enteropathie) ist durch eine Unverträglichkeit von Gluten (Protein des Weizens) charakterisiert und resultiert in ausgedehnten Dünndarmläsionen mit Zottenatrophie und dem klinischen Bild der Malabsorption. Zelluläre und humorale Immunreaktionen gegen Gliadin (alkohollösliche Fraktion von Gluten) sind mit Ausnahme Gliadin-spezifischer IgA-Antikörper von geringer diagnostischer Bedeutung. Eine diagnostische Wertigkeit IgG spezifischer Antikörper gegen Gliadin ergibt sich nur in Krankheitsverläufen, die mit einer IgA Defizienz einhergehen.

Weitaus mehr Bedeutung als diagnostischer Marker zur Diagnose einer Zöliakie kommt den Antikörpern gegen die Gewebs-Transglutaminase (tTG) zu. Auch hier sind Antikörper vom Isotyp IgA von besonderer diagnostischer Relevanz. Ihr Nachweis gewährleistet eine höhere diagnostische Spezifität und Sensitivität sowie eine bessere Verlaufskontrolle nach Glutenkarenz bei der Diagnostik und Überwachung der Zöliakie.

Da bei Kindern unter 2 Jahren mit Verdacht auf Zöliakie häufig Antikörper gegen Gewebstransglutaminase noch nicht nachweisbar sind, wird die kombinierte Testung auf Anti-Gliadin und anti-tTG-Antikörper empfohlen.

Literatur:

1. Greenberger, N.J., K.J. Isselbacher, Absorptionsstörungen
Schmälzl, K.J.G. (Hrsg): Harrisons Innere Medizin. 13. Aufl., dt. Ausgabe. Berlin, Wien u.a.: Blackwell Wiss.-Verlag 1995, S. 1640-42
2. Auer, I.O., Immunologie des Gastrointestinaltraktes
Gemsa, D., J.R. Kalden, K. Resch (Hrsg.): Immunologie. 3. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1991, S. 380-397.
3. Dieterich, W., T. Ehnis, M. Bauer, P.Donner, U.Volta, E.O.Riecken und D.Schuppan
Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease
Nature Medicine 3, 1977, 797-801.
4. Conrad, K., H. Schmechta, A. Klafki, G. Lobeck, H. H. Uhlig, S. Gerdi and J. Henker
Serological differentiation of inflammatory bowel diseases
European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2, Vol 14, 2002, 129-135

Anwendungsbereich

Der *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgG / *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgA ist ein empfindlicher Line Immunoassay (LIA) zum Nachweis von IgG oder IgA Antikörpern gegen folgende Antigene: Gliadin, Gewebstransglutaminase (tTG) und Mannan in humanem Serum oder Plasma.

Testprinzip

Die Antigene werden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und fixiert. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran wird diese in gebrauchsfertige Streifen geschnitten.

Die Reaktion zum Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Die zu untersuchenden Proben werden in einer Verdünnung von 1:101 zusammen mit Teststreifen in den Vertiefungen der Inkubationswanne inkubiert. Dabei reagieren die spezifischen Antikörper mit den auf der Membran fixierten Antigenen. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden die nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit Wasch- und Inkubationspufferlösung (WIB) entfernt.

Schritt 2

Enzymmarkierte (Meerrettichperoxidase, POD) Konjugatantikörper (anti-human-IgG, oder -IgA oder -IgM) reagieren mit den an die Antigenbanden gebundenen Probenantikörpern.

Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden nicht gebundene Konjugatmoleküle durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit WIB entfernt.

Schritt 3

Während der Substratreaktion setzen die gebundenen POD-Moleküle des Konjugats das Substrat unter Ausbildung blauer Präzipitate um.

Die Reaktion wird nach 10 min durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gestoppt.

Die gefärbten Antigenbanden auf den getrockneten Teststreifen werden durch Anlegen der Auswerteschablone identifiziert und das Testergebnis entsprechend der Auswertekriterien bestimmt. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren. Alternativ können die Teststreifen mit der Evaluierungssoftware *Seraline*®scan automatisch ausgewertet werden.

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (15 µl Probe und 1500 µl WIB) mit der gebrauchsfertigen Wasch- und Inkubationslösung (hergestellt aus konzentriertem WIB (2)) in der Inkubationswanne verdünnt.

Die Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2..8°C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20°C zu lagern. Tiefgefrorene Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Die Verwendung von kontaminierten Proben kann die Hintergrundfärbung der Streifen erhöhen und darüber hinaus zu falschen Ergebnissen führen.

Testkomponenten

1	TESTSTR	Teststreifen inkl. Auswerteschablone	20 Streifen Farbcodierung: gelb
2	WIB CONC 5x	Wasch- und Inkubationspuffer, 5-fach	70 ml Konzentrat, transparente Flasche, schwarze Kappe
3	CONJ HRP IgG CONJ HRP IgA	Anti-human IgG-POD- Konjugat (Ziege) oder Anti-human IgA-POD-Konjugat (Schaf)	35 ml gebrauchsfertig, IgG , rot gefärbt, transparente Flasche, rote Kappe IgA , violett gefärbt, transparente Flasche, violett Kappe
4	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	35 ml gebrauchsfertig, schwarze Flasche, blaue Kappe
5	INCUTRAY	Inkubationswanne mit Deckel	2

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Messzylinder und Bechergläser
- Pipetten und Pipettenspitzen für 15 µl und 1500 µl
- Kunststoffpinzette
- Wipp-Schüttler
- Filterpapier
- Absaugsystem mit Auffanggefäß für infektiöse Lösungen
- destilliertes oder deionisiertes Wasser

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Mit einem Testbesteck können 20 Bestimmungen durchgeführt werden.

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Teststreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung nach Öffnung innerhalb von 3 Monaten zu verbrauchen.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien auf Raumtemperatur zu erwärmen. Stellen Sie die gebrauchsfertige Wasch- und Inkubationslösung her, indem Sie das Wasch- und Inkubationspufferkonzentrat (5-fach) vor Verwendung gründlich schütteln und 1 : 5 mit destilliertem Wasser verdünnen.
Beispiel: 20 ml WIB (5-fach) + 80 ml destilliertes Wasser

Testdurchführung

- Der Test ist bei Raumtemperatur (18...25°C) durchzuführen.
- Teststreifen mit einer Kunststoffpinzette so in die Inkubationswanne legen, dass die aufgedruckten Nummern nach oben zeigen.
- Alle Inkubationsschritte sollten auf einem Wipp-Schüttler mit einer empfohlenen Schüttelfrequenz von ca. 20 bis 30 Rotationen pro Minute erfolgen.
- Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Arbeitsschritte

1. Teststreifen mit **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) **5 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
2. **15 µl** Probe zugeben.
3. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
4. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
5. **1,5 ml** **CONJ HRP** zugeben.
6. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
7. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
8. Teststreifen mit **1,5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** auf Wipp- Schüttler inkubieren.
9. Substrat absaugen und Teststreifen zum Abstoppen der Farbreaktion **3 x** mit **1,5 ml** destilliertem Wasser spülen.
10. Die Teststreifen sind nach dem Abstoppen zwischen Filterpapier zu trocknen und anschließend auszuwerten.

Achtung:

Bei „Problemseren“ (Hypergammaglobulinämien, zirk. Immunkomplexe, Milchantikörper) kann sich der Hintergrund der Streifen sehr schnell blau färben. In solchen Fällen ist die Farbreaktion vorzeitig durch dreimaliges Spülen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser zu stoppen.

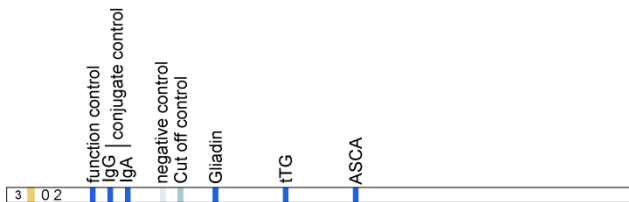
Auswertung

Gültigkeitskriterien für den Test

Auf jedem Teststreifen des *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgG / *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgA sind untereinander 5 Kontrollbanden aufgetragen:

- Die Funktionskontrolle (positive Bande mit jeder Probe).
 - Die Konjugatkontrollen IgG und IgA (positive Bande nur mit dem eingesetzten Konjugat IgG oder IgA).
- Achtung:** Die jeweils andere Konjugatkontrolle kann in Abhängigkeit von der Probe auch eine blassere, unspezifische Bande zeigen.
- Die Intensität der negativ-Kontrolle muss kleiner als die der Cut-off-Kontrolle sein.
 - Die Cut-off-Kontrolle (Bandenintensität dient der Bewertung der diagnostischen Banden als positiv oder negativ).

Der Test kann ausgewertet werden, wenn die Funktionskontrolle, die erwartete Konjugatkontrolle und die Cut-off-Kontrolle sichtbar sind.



Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung sollte nur an trockenen Streifen erfolgen. Die Teststreifen können mit Hilfe der Evaluierungssoftware *Seraline*[®]scan automatisch ausgewertet werden. Alternativ kann die Zuordnung der Banden mit Hilfe der beiliegenden Auswerteschablone durchgeführt werden. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren.

Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

Bewertung	IgG	IgA
negativ	Farbintensität der Banden < Cut-off-Kontrolle	Farbintensität der Banden < Cut-off-Kontrolle
positiv*	Farbintensität der Banden ≥ Cut-off-Kontrolle	Farbintensität der Banden ≥ Cut-off-Kontrolle

* Bei einem positiven Nachweis von anti-*Saccharomyces cerevisiae* Antikörpern (ASCA; besonders von Isotyp IgA) sollte differentialdiagnostisch der Morbus Crohn als Ursache für eine chronisch entzündliche Darmerkrankung abgeklärt werden.

Leistungsmerkmale

Sensitivität

Zur Einschätzung der Leistungsmerkmale des *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgG / *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgA wurden klinisch auffällige und unauffällige Seren untersucht und die Ergebnisse jeweils antigenspezifisch mit einem anderen kommerziellen Line Assay verglichen.

Gliadin:

		<i>Seraline</i> [®] Zöliakie-3 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichstest IgG	positiv	8	2
	negativ	4	22

Übereinstimmung: 83%

		<i>Seraline</i> [®] Zöliakie-3 IgA	
		positiv	negativ
Vergleichstest IgA	positiv	6	2
	negativ	2	26

Übereinstimmung: 89%

Gewebstransglutaminase (tTG):

		<i>Seraline</i> [®] Zöliakie-3 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichstest IgG	positiv	5	1
	negativ	6	24

Übereinstimmung: 81%

		<i>Seraline</i> [®] Zöliakie-3 IgA	
		positiv	negativ
Vergleichstest IgA	positiv	8	0
	negativ	2	26

Übereinstimmung: 94%

Mannan:

		<i>Seraline</i> [®] Zöliakie-3 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichstest IgG	positiv	4	1
	negativ	2	29

Übereinstimmung: 92%

		<i>Seraline</i> [®] Zöliakie-3 IgA	
		positiv	negativ
Vergleichstest IgA	positiv	3	0
	negativ	0	33

Übereinstimmung: 100 %

Spezifität

Es wurden n =100 Blutspenderseren im *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgG und im *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgA untersucht.

Spezifität IgG: 83,0% Spezifität IgA: 94,0%

Grenzen der Methode

Eine Interpretation des Ergebnisses soll nur in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Wie bei allen immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben bis zu einer Konzentration von 500 mg/dl (Hämoglobin), 1000 mg/dl (Lipide) und 20 mg/dl (Billirubin C und Billirubin F) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse. Rheumafaktoren bis zu einer Konzentration von 500 IU/ml beeinflussen ebenfalls nicht die Ergebnisse.

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Teststreifen und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Teststreifen dürfen nur mit einer Kunststoffpinzette gehandhabt werden. Vor Testbeginn sollten im Protokollvordruck Probenidentifikationsnummer, Teststreifennummer und Chargennummer notiert werden. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Wasch- und Inkubationspuffer und Substrat.** Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien (2, 3, 4) enthalten geringe Mengen Kathon (1,0% v/v) als Konservierungsmittel. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8°C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

- **Nicht essen, trinken oder rauchen!**
- **Nie mit dem Mund pipettieren!**
- **Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!**
- **Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!**



Hersteller

REF

Bestell-Nummer

LOT

Chargen-Nummer



Anzahl der Bestimmungen



Biologische Gefahr



Hinweise beachten



Verfallsdatum



Lagertemperatur








Arbeitsanleitung beachten

Instructions For Use

Seraline[®] Zöliakie-3 IgG Seraline[®] Zöliakie-3 IgA

Line Immunoassay for detection of IgG or IgA antibodies
to Gliadin, Tissue Transglutaminase (tTG) and Mannan in human serum or plasma

 LIA-001-3 G  LIA-001-3 A  20  *In-vitro*-Diagnostic device 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Distribution: Sekisui Virotech GmbH · Löwenplatz 5 · 65428 Rüsselsheim · Germany · www.sekisuivirotech.com
phone +49 (0) 6142 6909 0 · fax +49 (0) 6142 9666 13 · info@sekisuivirotech.com

Introduction

Coeliac disease (also called non-tropical sprue, coeliac sprue, gluten sensitive enteropathy and gluten intolerance) is a digestive disorder in genetically-predisposed individuals. The only susceptibility loci established are the HLA-DQ2 and DQ8. Coeliac disease is characterised by damage or flattening of all or part of the villi lining the small intestine, causing scar tissue that cannot absorb nutrients. This damage is caused by exposure to gluten (gliadin) and related proteins found in wheat, rye, malt, barley and oats. Damage to the villi reduces the ability of the intestines to absorb nutrients, and it is believed that the resulting nutritional deficiencies likely cause the wide spectrum of symptoms associated with the disorder. Coeliac disease may lead to digestive problems, such as indigestion, heartburn and irritable bowel syndrome, unexplained weight loss or other signs of nutritional deficiency due to malabsorption, and a wide range of other problems in different bodily functions. In young children, the most common symptoms are steatorrhoea, weight loss, abdominal distension, and slow growth/failure to thrive, but irritability, vomiting and tiredness are common. It has been suggested that some cases of autism may be caused by coeliac disease. The gold standard test for coeliac disease is still upper endoscopy with biopsy of the distal duodenum or jejunum. To avoid false negative results, the first endoscopy must be done while the patient is on a normal, gluten-containing diet or very shortly after going on a gluten-free diet. Serology has been proposed as a screening measure, because the presence of serum IgA antibodies reactive against Gliadin and Tissue Transglutaminase (tTG) is indicative of coeliac disease. Like endoscopy, these tests are not accurate in patients who have been on a gluten-free diet for some time; they must be performed while the person is on a normal diet or within a few months after eliminating gluten from the diet.

In children younger than 2 years suffering from coeliac disease antibodies to Tissue Transglutaminase are often not detectable. Therefore combined testing for anti-Gliadin and anti tTG-antibodies is recommendable. In adults, the symptoms of coeliac disease may be mistaken for irritable bowel syndrome (IBS) or an inflammatory bowel disease such as Crohn's disease. The latter can be diagnosed with a sensitivity up to 75 % by detection of anti- *Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA).

Literature:

1. Greenberger, N.J., K.J. Isselbacher, Absorptionsstörungen
Schmailzl, K.J.G. (Hrsg): Harrisons Innere Medizin. 13. Aufl., dt. Ausgabe. Berlin, Wien u.a.: Blackwell Wiss.-Verlag 1995, S. 1640-42
2. Auer, I.O., Immunologie des Gastrointestinaltraktes
Gemsa, D., J.R. Kalden, K. Resch (Hrsg.): Immunologie. 3. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1991, S. 380-397.
3. Dieterich, W., T. Ehnis, M. Bauer, P.Donner, U.Volta, E.O.Riecken und D.Schuppan
Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease
Nature Medicine 3, 1977, 797-801.
4. Conrad, K., H. Schmechta, A. Klafki, G. Lobeck, H. H. Uhlig, S. Gerdi and J. Henker
Serological differentiation of inflammatory bowel diseases
European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2, Vol 14, 2002, 129-135

Intended use

The *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgG / *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgA is a Line Immunoassay (LIA) for detection of specific IgG or IgA antibodies against the following antigens: Gliadin, Tissue Transglutaminase (tTG) and Mannan in human serum or plasma samples.

Principle of the test

The antigens are plotted on nitrocellulose membranes and blocked to avoid unspecific reactions. After this procedure the membrane is cut into strips. The reaction for detection of specific antibodies is performed in 3 steps:

Step 1

The test strips are incubated in the diluted (1 : 101) serum or plasma samples for 45 minutes. Specific antibodies present in the samples react with the membrane bound antigens during that time. After incubation unbound proteins are removed by 3 washing cycles.

Step 2

The second incubation starts with the addition of enzyme labelled, isotype specific conjugate antibodies to the nitrocellulose strips. After 45 minutes of incubation unbound conjugate is removed by 3 washing cycles.

Step 3

The addition of the colourless precipitating substrate stains the membrane bound immune complexes by formation of blue precipitates.

The reaction is stopped after 10 minutes by aspirating the substrate followed by rinsing the strips with sufficient quantity of distilled or deionized water.

After drying the strips, interpretation of the resulting pattern is done by comparison with the specific template. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*[®]scan software.

Preparation and storage of samples

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. Samples have to be diluted 1 : 101 (15 µl sample and 1500 µl WIB) with the ready to use wash and incubation solution (prepared from concentrated WIB (2)) in the incubation tray. Sample collection should be done in a sterile manner. Samples can be stored at 2...8°C for a maximum of 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20°C. Frozen samples have to be warmed to room temperature and mixed well before starting the test run. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Kit components

1	TESTSTR	test strips incl. evaluation template	20 strips colour coded: yellow
2	WIB CONC 5x	wash and incubation buffer 5-fold	70 ml concentrate, transparent bottle, black cap
3	CONJ HRP IgG CONJ HRP IgA	anti-human IgG-HRP-conjugate (goat) or anti-human IgA-HRP-conjugate (sheep)	35 ml , ready to use, IgG , coloured red, transparent bottle, red cap IgA , coloured purple, transparent bottle, purple cap
4	SUBSTR TMB	substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	35 ml , ready to use, black bottle, blue cap
5	INCUTRAY	incubation tray with cover	2

Materials required but not provided

- glassware
- pipettes and tips for 15 µl and 1500 µl
- plastic forceps
- rocking platform (vertical)
- filter paper
- collecting devices for infectious material
- distilled or deionized water

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 20 determinations. The complete test kit with closed reagent bottles is stable until the expiry date printed on the labels when stored at 2...8°C. After opening and proper storage as requested the reagents have to be used within 3 months.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. Ready to use wash and incubation solution has to be prepared from the 5-fold concentrated WIB (2) by dilution of 1 : 5 with distilled water. Mix the concentrate before dilution.

For example: 20 ml WIB (5-fold) + 80 ml distilled water

Assay procedure

- The test has to be performed at room temperature (18...25°C).
- The test strips have to be transferred into the incubation tray by use of plastic forceps in a way that the printed strip number on the top is visible.
- All incubation steps should be done on a rocking platform with a recommended frequency of rocking of about 20 - 30 rotations per minute.
- The following procedure has to adhere strictly to the time table.

Working steps

1. Incubate the test strips with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)) on a rocking platform for **5 min**.
2. Add **15 µl** sample.
3. Cover the incubation tray and incubate for **45 min** on a rocking platform.
4. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
5. Add **1.5 ml** **CONJ HRP**
6. Cover the incubation tray and incubate **45 min** on a rocking platform.
7. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
8. Incubate the test strips with **1.5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** on a rocking platform.
9. Aspirate substrate and rinse the test strips **3 x** with **1.5 ml** distilled water to stop the reaction.
10. The developed test strips have to be dried between filter paper before evaluation.

Please Note:

With so-called „problematic“ samples (e.g. from patients with hypergammaglobulinaemia, circulating immune complexes, antibodies to milk proteins) the background develops rapidly and the test strips discolour blue. In such cases the substrate reaction has to be terminated earlier.

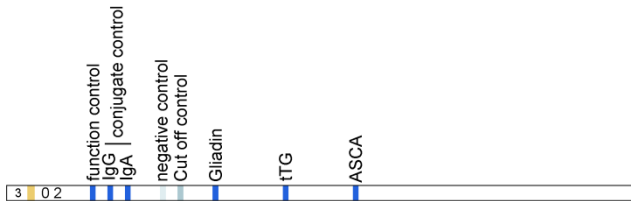
Test evaluation

Test validity

The *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgG / *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgA test strips contain 5 consecutive control lines under the strip number:

- Function control (positive reaction with every sample).
- Conjugate controls IgG and IgA (positive reaction with the corresponding conjugate).
Note: The other conjugate control band may develop a weak, non-specific colour.
- The intensity of the negative control must be less than the Cut off control.
- Cut off control (band intensity is used for result evaluation of the diagnostic bands).

The test run is valid if the function control, the corresponding conjugate control and the Cut off control are clearly visible.



Result interpretation

Generally the evaluation of the test has to be done with dried strips. To support identification of stained bands the evaluation template should be used. The identified bands have to be documented on the data sheet. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*[®] scan software.

Judgement of the bands is performed according to the following classification:

Result interpretation	IgG	IgA
negative	Colour intensity of bands < Cut off control	Colour intensity of bands < Cut off control
positive*	Colour intensity of bands ≥ Cut off control	Colour intensity of bands ≥ Cut off control

* A positive detection of anti- *Saccharomyces cerevisiae* antibodies (especially ASCA of isotyp IgA) is an indication for Crohn's disease.

Performance characteristics

Sensitivity

The performance of the *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgG / *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgA has been compared with another commercially available Line Immunoassay (Test A) by investigation of serum samples from patients with and without clinical suspect of coeliac disease.

Gliadin:

		<i>Seraline</i> [®] Zöliakie-3 IgG	
		positive	negative
Competitor IgG	positive	8	2
	negative	4	22

Agreement: 83%

		<i>Seraline</i> [®] Zöliakie-3 IgA	
		positive	negative
Competitor IgA	positive	6	2
	negative	2	26

Agreement: 89%

Tissue Transglutaminase (tTG):

		<i>Seraline</i> [®] Zöliakie-3 IgG	
		positive	negative
Competitor IgG	positive	5	1
	negative	6	24

Agreement: 81%

		<i>Seraline</i> [®] Zöliakie-3 IgA	
		positive	negative
Competitor IgA	positive	8	0
	negative	2	26

Agreement: 94%

Mannan:

		<i>Seraline</i> [®] Zöliakie-3 IgG	
		positive	negative
Competitor IgG	positive	4	1
	negative	2	29

Agreement: 92%

		<i>Seraline</i> [®] Zöliakie-3 IgA	
		positive	negative
Competitor IgA	positive	3	0
	negative	0	33

Agreement: 100%

Specificity

Results from the investigation of randomly collected blood donor samples (n = 100) using *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgG / *Seraline*[®] Zöliakie-3 IgA.
Specificity IgG: 83.0% Specificity IgA: 94.0%

Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. As in other Immunoassays, impurities and cross contamination of reagents and samples by fungi or bacteria can produce false positive as well as false negative results. Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the test strips or insufficient rinsing after substrate reaction and also incorrect timing can produce erroneous results.

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples did not interfere with the test up to a concentration of 500 mg/dl (hemoglobin), 1000 mg/dl (lipids) and 20 mg/dl (bilirubin C and bilirubin F). Rheumatoid factors did not interfere up to a concentration of 500 IU/ml.

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The test should be performed by trained technical laboratory staff only. The test instructions have to be followed strictly. Do not use reagents from damaged packages or bottles. Handle the test strips with plastic forceps only. Prior to testing the identification numbers of the samples, the numbers of the test strips and the lot number of the kit should be documented on the data sheet. The expiry dates stated on the respective labels are to be observed.

Do not use or mix reagents from different lots except for wash and incubation buffer and for substrate. Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. Some of the reagents (2, 3, 4) contain small amounts of Kathon (1.0% v/v) as preservative. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8°C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should be observed:

- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**



Manufacturer



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use

