



## TG6-ab ELISA (IgA)

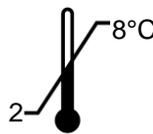
---

ELISA zur Bestimmung von Autoantikörpern (IgA) gegen  
humane Transglutaminase 6

---

### Gebrauchsinformation

**REF** E103  12 x 8 Bestimmungen



Nur zu Forschungs- und Entwicklungszwecken,  
nicht für den diagnostischen Einsatz



Zedira GmbH  
Tel.: + 49 6151 66628-0

Roesslerstrasse 83  
www.zedira.com

D-64293 Darmstadt  
contact@zedira.com

## Inhalt

1. Einführung und Hintergrund
2. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen
3. Testprinzip
4. Inhalt des Testkits
5. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien
6. Aufbewahrung des Testkits
7. Reagenzien- und Probenvorbereitung / Anforderungen an die Proben
8. Durchführung des Tests
9. Auswertung und Qualitätskontrolle
10. Interpretation der Ergebnisse / Grenzen der Methode
11. Testcharakteristika
12. Garantie und Haftung
13. Kurzanleitung

## Wichtiger Hinweis

Bei dem vorliegenden TG6-ab ELISA (IgA) Kit mit der Zedira Produkt Nummer E103 handelt es sich um die überarbeitete Version des Kits TG6-ab ELISA (IgA) mit der Produktnummer E003.

Verbesserungen der neuen Kit-Version:

1. Die Bestimmung des individuellen Proben-Hintergrunds entfällt.
2. Der Kalibrator wurde angepasst, so dass die relevanteren geringeren Titer abgedeckt werden. Die grobe Umrechnung der mit der Kit-Version E003 gemessenen Titer-Werte (U/mL) ist gemäß folgender Gleichung möglich:

$$\text{Titer}_{\text{E003}} * 0,20 = \text{Titer}_{\text{E103}}$$

3. Basierend auf einem Serenkollektiv von 38 Blutspendern (gleichverteilt bzgl. Alter und Geschlecht) sowie einem Serenkollektiv von 86 Patienten mit verschiedenen neurologischen Krankheiten wurde der *Cut-off* neu bestimmt.

Die Kit-Version E003 ist nicht mehr verfügbar.

Document id./ver.-no.: E103 Manual deutsch V2.1/2022-07-25

## 1. Einführung und Hintergrund

Gluten-assoziierte Krankheiten umfassen Zöliakie, Weizen-Allergie und Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität (engl.: *Non-celiac gluten Sensitivity* [NCGS]). Die weltweite Prävalenz liegt bei ca. 5%.

Die Zöliakie (Gluten-induzierte Enteropathie, einheimische Sprue; engl.: *celiac disease*) ist die häufigste chronische Erkrankung des Dünndarms. Gluten-induziert entzündet sich die Dünndarmschleimhaut, was bis zum vollständigen Abbau der Dünndarmzotten führen kann.

Darüber hinaus handelt es sich bei der Zöliakie um eine gluten-induzierte Autoimmunerkrankung, die durch Autoantikörper gegen die TG2 (Gewebe-Transglutaminase) charakterisiert ist. Die serologische Zöliakie-Diagnostik basiert auf dem Nachweis von TG2-Autoantikörpern und Antikörpern gegen DGP (deamidiertes Gliadin Peptid).

Im menschlichen Körper liegen 8 verschiedene Transglutaminasen vor, darunter die TG2. Die Gluten-induzierte Hauterkrankung Dermatitis herpetiformis (Morbus Duhring-Brocq), die sich parallel zur Zöliakie entwickeln kann, ist durch Autoantikörper gegen die TG3 (epidermal transglutaminase) charakterisiert.

Gegen die neuronale Transglutaminase (TG6) gerichtete Autoantikörper wurden in Seren von Patienten mit neurologischen Erkrankungen (z. B. Ataxie, Neuropathien, Cerebralparese oder Stiff-Person Syndrom) nachgewiesen.

TG6-Autoantikörper können zusätzlich zu TG2-Autoantikörpern in Zöliakie-Patienten vorkommen, wurden aber auch in TG2-Autoantikörper-negativen Seren und in Seren von Patienten ohne Enteropathie (d.h. ohne Zöliakie) gefunden. Entsprechend können sich TG6-Autoantikörper Zöliakie-unabhängig entwickeln.

Der vorliegende ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) dient dem quantitativen oder qualitativen Nachweis von IgA-Antikörpern gegen die TG6 in menschlichem Serum. Das immobilisierte Antigen ist ein hochgereinigtes Präparat humaner rekombinanter TG6, exprimiert im Baculovirus-System. Der Test ist schnell (Inkubationszeit 30 / 30 / 30 Minuten) und flexibel (teilbare Festphase, gebrauchsfertige Reagenzien). 6 Standards erlauben quantitative Messungen; eine negative und eine positive Kontrolle dienen der Funktionalitätsprüfung des Tests.

## 2. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der Test ist ausschließlich für die *in vitro*-Diagnostik bestimmt; nicht für die interne oder externe Anwendung an Menschen oder Tieren.

Die Reagenzien nicht über ihr Verfallsdatum hinaus verwenden. Es wird nachdrücklich empfohlen, das Protokoll genau einzuhalten.

Probenpuffer, Standards und Kontrollen enthalten Na-Azid als Konservierungsmittel. Der Waschpuffer enthält Bromonitrodioxan als Konservierungsmittel, das Konjugat Methylisothiazolon / Bromonitrodioxan. Das Substrat enthält 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die Stopplösung, 0,2 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ist sauer und ätzend.

Diese Reagenzien sind giftig, wenn sie aufgenommen werden. Daher müssen die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung gefährlicher Chemikalien getroffen werden. Jeden Körperkontakt vermeiden, Handschuhe und Schutzbrille tragen. Sollte dennoch Haut (oder Schleimhaut) von einem Reagenz benetzt werden, die betroffene Stelle sofort mit viel Wasser abspülen. Nicht mit dem Mund pipettieren. Die Reagenzien gemäß lokalen / nationalen Vorschriften entsorgen.

Na-Azid kann mit Kupfer- und Bleirohren reagieren und explosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit Wasser nachspülen, um eine Akkumulation zu verhindern.

Die Standards und Kontrollen enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Sie wurden daraufhin geprüft, ob Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Ag, Hepatitis B-Oberflächen (HBs)-Ag und Antikörper gegen HIV 1/2 und Hepatitis C-Virus (HCV) vorliegen und zeigten negative Resultate; entweder in einem FDA-zugelassenen oder einem CE-konformen Test, entsprechend der Europäischen Richtlinie 98/79/EC. Allerdings kann kein Test garantieren, dass Material humanen Ursprungs tatsächlich nicht infektiös ist. Die Präparate sollten daher als potenziell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, gemäß CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA) oder anderen lokalen / nationalen Richtlinien zu Laborsicherheit und Dekontaminierung.

### 3. Testprinzip

Die Kavitäten der Festphase sind mit TG6 beschichtet. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion: TG6-Antikörper aus der Probe binden an das immobilisierte Antigen; es bildet sich der Antigen-Antikörper-Komplex. Nicht-gebundene Probenbestandteile werden anschließend von der Festphase gewaschen.
2. Reaktion: Ein zweiter, gegen human-IgA gerichteter und mit Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper wird zugesetzt. Dieses Konjugat bindet seinerseits an den Antigen-Antikörper-Komplex. Überschüssiges Konjugat wird anschließend von der Festphase gewaschen.
3. Reaktion: Der Enzym-markierte Komplex setzt ein farbloses Substrat in ein farbiges (blaues) Produkt um. Das Ausmaß der Farbentwicklung spiegelt die Menge an TG6-Antikörpern (IgA) in der Probe wider. Proben ohne TG6-Antikörper bleiben farblos.

### 4. Inhalt des Testkits

- a. 1 Mikrowell-Platte, beschichtet mit TG6 und hermetisch in einem Beutel aus laminiertes Metallfolie verpackt, zusammen mit Trockenmittel. Die Platte besteht aus 12 Streifen, die sich jeweils in 8 Einzelkavitäten teilen lassen.
- b. Probenpuffer, 100 mL, gebrauchsfertig, orange gefärbt. Enthält Tris-gepufferte Saline (TBS), bovines Serumalbumin (BSA), Tween und Na-Azid.
- c. Waschpuffer, 100 mL, 10x-Konzentrat, blau gefärbt. Enthält TBS, Tween und Bromonitrodioxan.
- d. 6 Standards à 2,0 mL, 0 - 1,0 - 3,0 – 8,0 - 45 und 100 U TG6 Antikörper (IgA) / mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau gefärbt. Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.
- e. Negative und positive Kontrolle, je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot gefärbt. Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.
- f. Anti-human IgA HRP-Konjugat, 14 mL, gebrauchsfertig, gelb gefärbt. Gepufferte Lösung mit stabilisierendem Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan.

- g. Substrat, 14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Enthält eine gepufferte Lösung von TMB und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, abgefüllt in einem Licht-undurchlässigen Gefäß.
- h. Stopplösung (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 14 mL, farblos, gebrauchsfertig. Vorsicht: Schwefelsäure ist ätzend.
- i. Gebrauchsinformation
- j. Chargen-spezifisches Analysen-Zertifikat

## **5. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialienn**

- a. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- b. Messzylinder, 1000 mL
- c. Reagenzröhrchen für die Probenverdünnung (Transfer-Röhrchen im Mikrowell-Plattenformat empfohlen)
- d. Pipetten für 10, 100 µL (1- und 8-Kanalpipetten empfohlen)
- e. Mikrowell-Plattenwascher (optional)
- f. Mikrowell-Plattenphotometer mit 450 nm-Filter (optional wird ein 620 nm-Filter zum Hintergrundabzug empfohlen)
- g. ELISA Auswertungsprogramm (empfohlen)

## 6. Aufbewahrung des Testkits

Der Testkit muss bei 2 - 8°C gelagert werden. Er ist bis zum Verfallsdatum einsetzbar, das auf dem Etikett der Verpackung angegeben ist; danach ist der Testkit nicht mehr zu verwenden.

## 7. Reagenzien- und Probenvorbereitung / Anforderungen an die Proben

Wegen möglicherweise unterschiedlichen Lagerungs- und Transport-Bedingungen dürfen korrespondierende Komponenten aus verschiedenen Kits nicht vermischt oder gegeneinander ausgetauscht werden.

- a. Den Beutel mit der Festphase akklimatisieren lassen, erst dann öffnen. Die für den aktuellen Test evtl. nicht benötigten Kavitäten sofort aus dem Gitterrahmen nehmen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Folienbeutel zurücklegen. Diesen dicht verschließen und bis zur künftigen Verwendung weiter gekühlt lagern.
- b. Das Waschpuffer-10x-Konzentrat (100 mL, blau) wird mit 900 mL deionisiertem Wasser verdünnt und gut durchmischt. Gekühlt bei 2 - 8°C ist diese Lösung für 4 Wochen stabil.
- c. Präparation der Proben: Patientenseren als potenziell infektiös betrachten und entsprechend vorsichtig handhaben. Sie werden mit dem Probenpuffer 1:100 in Reagenzröhrchen verdünnt; bspw. 10 µL Serum + 990 µL Probenpuffer. Kontamination des Puffers mit Serum ist zu vermeiden. Die Verdünnungen gut durchmischen.

Zum schnellen Dispensieren während des Testablaufs empfiehlt es sich, Standards, Kontrollen und Proben in Transferröhrchen (Microwell-Format) vorzulegen. Dann kann mit einer 8-Kanal-Pipette gearbeitet werden.

Proben, die nicht sofort analysiert werden können, müssen bei 2 - 8°C gelagert und innerhalb von 3 Tagen gemessen werden. Ist eine längere Lagerung vorgesehen, so müssen sie eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Aufgetaute Proben vor dem Verdünnen ausreichend durchmischen.

Anforderungen an die Proben: Stark lipämische oder hämolysierte Proben sowie mikrobiell verunreinigte Seren können falsche Ergebnisse liefern und sollten daher vermieden werden.

## 8. Durchführung des Tests

Bevor der Test gestartet wird, müssen alle Kitkomponenten Raumtemperatur ( $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ) erreicht haben.

Um das bestmögliche Ergebnis (d.h. ein maximales Verhältnis zwischen spezifischem und Hintergrund-Signal) zu erreichen, ist sorgfältiges Waschen ganz wesentlich (Schritte a, c und e). Insbesondere ist es wichtig, die Waschlösung vollständig aus den Kavitäten zu entfernen. Dazu klopf man die Festphase auf mehreren Lagen Saugpapier aus. Automatische *Wascher* müssen daraufhin geprüft werden, ob ihre Ergebnisse mit denen vergleichbar sind, die mit manuellem Waschen erzielt werden.

- a. Unmittelbar vor Testbeginn die Kavitäten der Mikrowell-Platte einmal mit je  $350 \mu\text{L}$  Waschpuffer füllen, ca. 10 Sekunden einwirken lassen und wieder entleeren.
- b. Je  $100 \mu\text{L}$  der Standards (je  $2,0 \text{ mL}$ , gebrauchsfertig, abgestuft blau), der Kontrollen (je  $2,0 \text{ mL}$ , gebrauchsfertig, grün und rot) und der verdünnten Proben zügig in die Kavitäten pipettieren. Doppelbestimmungen werden empfohlen.

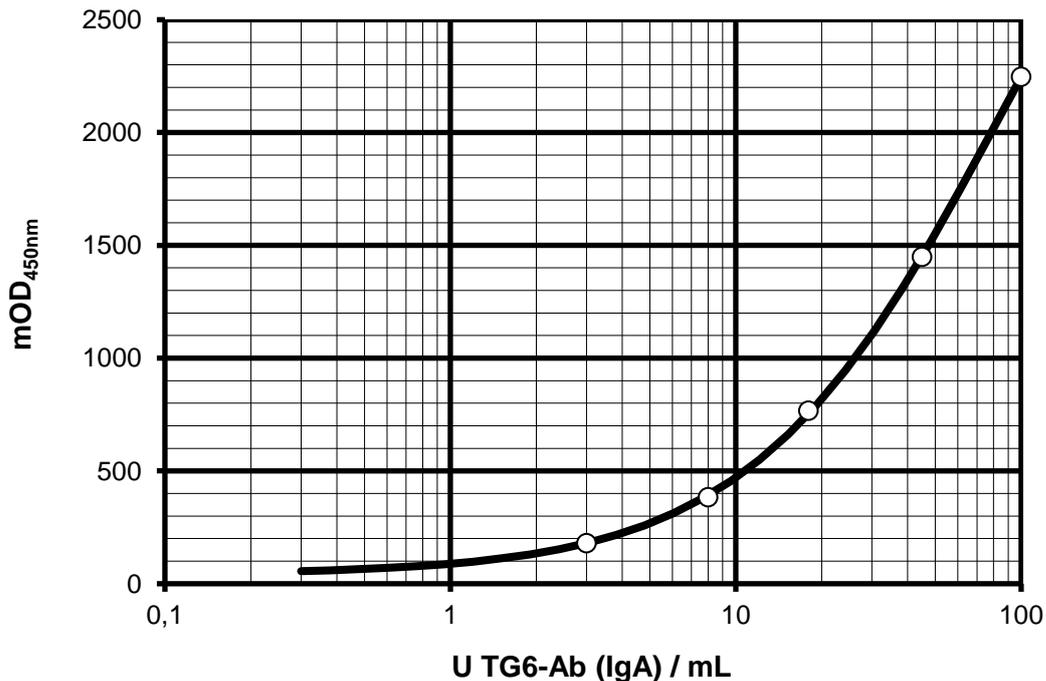
Die Mikrowell-Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur ( $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ) inkubieren

- c. Die Kavitäten 4x wie in Schritt a waschen.
- d.  $100 \mu\text{L}$  Konjugat ( $14 \text{ mL}$ , gebrauchsfertig, gelb) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b.
- e. Waschschrift c wiederholen.
- f. Je  $100 \mu\text{L}$  Substrat ( $14 \text{ mL}$ , gebrauchsfertig, farblos, im schwarzen Gefäß) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b. Das Substrat ist lichtempfindlich; direkte Belichtung (bspw. Sonnenlicht) während der Inkubation vermeiden.
- G  $100 \mu\text{L}$  Stopplösung ( $14 \text{ mL}$ , gebrauchsfertig, farblos. Vorsicht ätzend!) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren; in derselben Reihenfolge wie beim Substrat: Farbumschlag von blau nach gelb. Die Festphase für ca. 10 Sekunden vorsichtig schütteln, am besten auf einem Schüttler.
- h. Die Platte sofort im Mikrowell-Plattenphotometer bei  $450 \text{ nm}$ , bevorzugt bei  $450 \text{ nm}$  minus  $620 \text{ nm}$  messen.

Überschüssige Reagenzien weiter bei  $2 - 8^\circ\text{C}$  lagern, wenn sie später noch einmal verwendet werden sollen.

## 9. Auswertung und Qualitätskontrolle

Quantitative Auswertung: Die Messdaten werden anhand einer Standardkurve quantitativ ausgewertet. Die unten dargestellte Kurve kann jedoch nicht die Messung der Standards bei der Testdurchführung ersetzen, zusammen mit den Kontrollen und den aktuellen Proben. Sie dient lediglich als Modell. Die Kurve wurde von einem üblichen ELISA Auswertungsprogramm mit einer 4-Parameter-Funktion errechnet; die Spline-Approximation ist ebenso geeignet.



0412GE00.FEDv2405Q

Steht keine Rechner-gestützte Auswertung zur Verfügung, so zeichnet man die Standardkurve per Hand und liest an ihr die AK-Konzentration in den Proben ab (U TG6-Antikörper (IgA) / mL Serum).

Qualitative Auswertung: Der Test kann auch auf qualitative Art ausgewertet werden. Dazu muss nur die positive Kontrolle gemessen werden; allerdings empfiehlt es sich, auch die negative Kontrolle zu messen (s.u.: Qualitätskontrolle).

Bei der qualitativen Testauswertung wird die Absorption der Proben mit der grenzwertigen Absorption (=cut-off) verglichen. Diese errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Absorption}_{\text{cut-off}} = \text{Absorption}_{\text{positive Kontrolle}} \times \text{Faktor}$$

Der Faktor hängt von der Kit-Charge ab und ist im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben; dies liegt jedem Kit bei. Beispiel:

$$\begin{aligned} \text{Absorption}_{\text{positive Kontrolle}} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{Faktor} &= 0,35 \\ \text{Absorption}_{\text{cut-off}} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie hoch positiv eine bestimmte Probe an TG6-AK (IgA) ist, kann man ihre Ratio berechnen, nach der Formel:

$$\text{Ratio} = \text{Absorption}_{\text{Probe}} / \text{Absorption}_{\text{cut-off}}$$

Beispiel:

$$\begin{aligned} \text{Absorption}_{\text{cut-off}} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{Absorption}_{\text{Probe}} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{Ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

Qualitätskontrolle: Die positive und die negative Kontrolle dienen der Überprüfung des Tests. Ihre jeweiligen Sollwerte und akzeptablen Bereiche sind im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben. Die Messwerte der Kontrollen müssen innerhalb der Toleranzgrenzen liegen; ansonsten sind die Ergebnisse des Tests nicht gültig.

## 10. Interpretation der Ergebnisse / Grenzen der Methode

Der vorliegende Test ist ausschließlich für F+E-Anwendungen gedacht, nicht für diagnostische Zwecke.

Auf der Basis einer Serienmessung von Blutspender- und Positiv-Seren (s.u.) schlagen wir für die Beurteilung von Patientenseren vor:

Auswertung	quantitativ U TG6-AK (IgA) / mL Serum	qualitativ Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 2,6	< 0,89
Cut-off	3,2	1,0
Grenzwertiger Bereich	2,6 – 4,0	0,89 - 1,14
Positiver Bereich	> 4,0	> 1,14

Diese Spezifikationen sind nur als Anhaltspunkt zu verstehen. Zu ihrer Überprüfung sollten in jedem Test Normalseren mitgeführt werden.

Ein negatives Ergebnis zeigt an, dass die Probe keinen erhöhten Titer an IgA-Antikörpern gegen TG6 aufweist. Bei Vorliegen klinischer Anzeichen für eine gluten-sensitive neurologische Erkrankung sollten TG6-Antikörper (IgG) bestimmt werden.

Sind klinische Anzeichen der Zöliakie erkennbar, sollten Antikörper gegen TG2 (IgA/IgG) und/oder gegen deamidiertes Gliadin (DGP) bestimmt werden.

Ein positives Resultat sollte als Hinweis auf Gluten-sensitive neurologische Erkrankungen und/oder Zöliakie interpretiert werden.

Proben mit grenzwertigen Resultaten sollten als zweifelhaft betrachtet und als solche berichtet werden. Es empfiehlt sich, nach etwa 2 Wochen eine weitere Probe zu messen, parallel mit der zuerst entnommenen, um eine mögliche Änderung des Antikörper-Titers zu erfassen.

Wie bei jedem serologischen Test sollten dessen Resultate nicht isoliert interpretiert werden, sondern im Zusammenhang mit den Symptomen des Patienten und anderen diagnostischen Kriterien.

## 11. Testcharakteristika

Standardisierung: Der Test wird mit einem gereinigten Serumpräparat standardisiert, das IgA-Antikörper enthält, die spezifisch gegen TG6 gerichtet sind. Es wird seinerseits an einem Satz graduell-positiver Antikörper-Lösungen kalibriert, der ausschließlich für diesen Zweck reserviert ist.

Der Grad der Reaktivität einer Probe wird in willkürlichen Einheiten (U/mL) angegeben, da kein internationaler Standard verfügbar ist.

Analytische Spezifität: Der Test weist spezifisch humane IgA-Antikörper nach, die gegen TG6 gerichtet sind.

Nachweisgrenze (analytische Sensitivität:) Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die dem OD-Mittelwert des Probenpuffers entspricht, zu dem die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu  $< 0,5$  U TG6-Ak (IgA)/mL Serum bestimmt (n = 24).

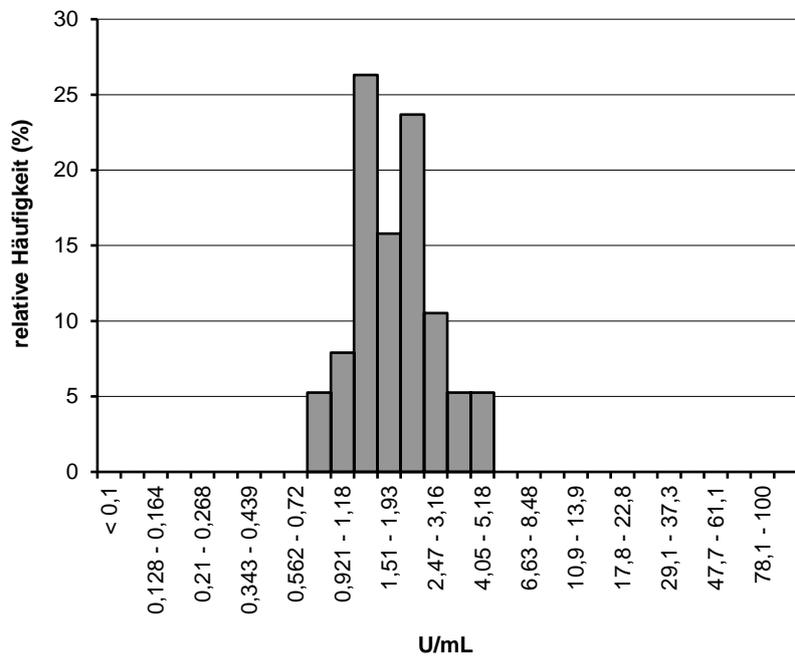
Empfohlener Messbereich: 0.5 - 100 U TG6-Ak (IgA)/mL Serum.

Häufigkeitsverteilung von TG6-AK (IgA): Diese wurde basierend auf einem Serenkollektiv von 38 Blutspendern (gleichverteilt bzgl. Alter und Geschlecht) sowie einem Serenkollektiv von 86 Patienten mit verschiedenen neurologischen Krankheiten bestimmt. Folgende Verteilung des Analyten wurde beobachtet:

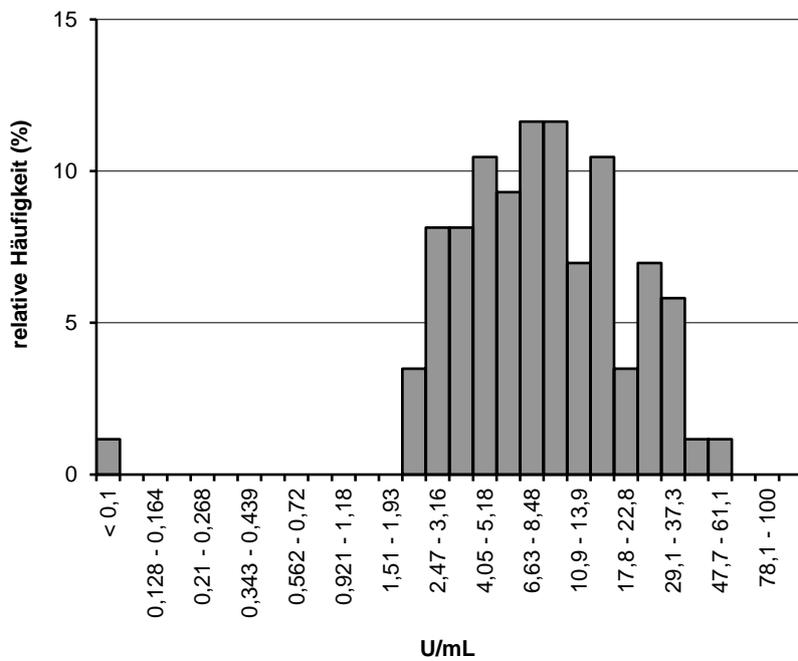
Blutspender-Seren		positiv erwartete Seren	
n:	38	n:	86
MW:	2,0 U/mL	MW:	11,6 U/mL
MW + s:	2,9 U/mL	MW - s:	1,5 U/mL
Median:	1,8 U/mL	Median:	8,1 U/mL
95. Perzentile:	3,8 U/mL	5. Perzentile:	2,5 U/mL

Mittels ROC-Analyse dieser Daten wurde der Cut-off des ELISAs zu 3,2 U/mL bestimmt. Aus den hier gezeigten Daten ergibt sich eine diagnostische Spezifität und Sensitivität des Tests von ca. 89 % bzw. ca. 87 %. Diese Werte gelten für das gemessene Seren-Kollektiv und können für andere Seren-Kollektive abweichen.

**Blutspender-Seren (n = 38)**



**Potentiell positive Seren (n = 86)**



1805QU01.BEDv2405Q

## **12. Garantie und Haftung**

Zedira GmbH garantiert, dass das ausgelieferte Produkt gründlich getestet wurde, um sicherzustellen, dass es seine Spezifikationen erfüllt und der hier gegebenen Beschreibung entspricht. Weitergehende Garantien werden nicht gegeben.

Die hier genannten Testcharakteristika wurden mit der angegebenen Methode ermittelt. Jede Änderung der Methode kann die Ergebnisse beeinflussen. In einem solchen Fall verweigert Zedira jede Haftung, ob ausgesprochen, impliziert oder gesetzlich. Darüber hinaus kann Zedira keinerlei Haftung für Schäden übernehmen, die aufgrund einer unkorrekten Lagerung oder Anwendung des Produktes entstanden sind; direkt, indirekt oder als Konsequenz.

# TG6-ab ELISA (IgA)

Art. No. E103

## 13. Kurzanleitung

- a. Die Seren 1/100 in Probenpuffer (100 mL, gebrauchsfertig, orange) verdünnen und durchmischen.
- b. Das 10x-Konzentrat des Waschpuffers (100 mL, blau) mit Wasser (900 mL) verdünnen und durchmischen.
- c. Die Kavitäten der Festphase einmal mit je 350  $\mu$ L Waschpuffer waschen. Dann je 100  $\mu$ L der Standards (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau), der Kontrollen (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot) und der verdünnten Proben in die Kavitäten pipettieren. Doppelbestimmungen sind zu empfehlen. 30 Minuten bei Raumtemperatur ( $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) inkubieren.
- d. Die Kavitäten 4x mit je 350  $\mu$ L Waschpuffer waschen.
- e. Je 100  $\mu$ L des Konjugats (14 mL, gebrauchsfertig, gelb) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c.
- f. Waschschrift d wiederholen.
- g. Je 100  $\mu$ L des Substrats (14 mL, gebrauchsfertig, in einem schwarzen Fläschchen) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c. Dann je 100  $\mu$ L Stopplösung (14 mL, gebrauchsfertig, farblos) zusetzen und die Platte kurz schütteln.
- h. Sofort die Absorption bei 450 nm (oder 450 minus 620 nm) messen.
- i. Quantitative Auswertung: Die Standardkurve ermitteln und anhand dieser Kurve die Absorption der Proben in ihre jeweilige Antikörper-Konzentration (U TG6-AK (IgA)/mL) umformen.
- j. Qualitative Auswertung: Die grenzwertige Absorption ermitteln, indem die Absorption der positiven Kontrolle mit dem Faktor multipliziert wird, der im Analysen-Zertifikat angegeben ist. Dann die Ratio-Werte der Proben berechnen, indem ihre Absorption durch die grenzwertige Absorption dividiert wird.



Zedira GmbH  
Tel.: + 49 6151 66628-0

Roesslerstrasse 83  
www.zedira.com

D-64293 Darmstadt  
contact@zedira.com