

RIDASCREEN® sIgA

REF G09035



1. Zweckbestimmung

Für die *In-vitro*-Diagnostik. Der RIDASCREEN® sIgA ist ein Enzymimmunoassay zum quantitativen Nachweis von humanem sekretorischem IgA (sIgA) in Stuhlproben.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Von allen humanen Immunglobulinen ist IgA am stärksten heterogen. IgA-Antikörper kommen in externen Körperflüssigkeiten vor und bilden dort eine bedeutende Abwehrbarriere gegen Krankheitserreger.

Über die Konzentration des sIgA im Stuhl können Rückschlüsse auf die körpereigene Abwehr der Darmschleimhäute getroffen werden.

IgA tritt in monomerer (mIgA), polymerer (pIgA) und sekretorisch dimerer Form (sIgA) auf. Die Bildung des sekretorischen IgAs erfolgt unabhängig von der Serum-IgA-Synthese. Das sekretorische IgA besteht insgesamt aus zwei (monomeren) IgA-Molekülen, der J-Kette sowie der sekretorischen Komponente (SC-Kette), einem Polypeptid mit einer Molekülmasse von 70 kDa. Die sekretorische Komponente wird von den Epithelzellen der Schleimhäute von Gastrointestinal-, Respirations- und Urogenitaltrakt sowie in Speichel-, Tränen- und Brustdrüsen synthetisiert. Die Plasmazellen im subendothelialen Raum der Schleimhäute sezernieren einen Komplex aus zwei IgA-Molekülen, die über das J-Protein verbunden sind. Dieser Komplex bindet dann an die sekretorische Komponente, die an der Oberfläche der Epithelzelle sitzt. Nach der Bindung wird das sIgA mit Hilfe epithelialer Rezeptoren selektiv durch die Epithelzelle transportiert und an der Schleimhautoberfläche mittels Exozytose ausgeschieden. Auf diese Weise wird sekretorisches IgA (sIgA) in großen Mengen z. B. auf die Mukosa-Oberfläche des Darms gebracht. Aber auch in anderen Körpersekreten wie u.a. Muttermilch, Speichel, Tränen, Nasen- oder Tracheobronchialschleim ist sIgA enthalten.

Die Bestimmung der sIgA-Konzentration im Stuhl lässt Rückschlüsse auf den Funktionszustand des darmassoziierten Immunsystems (GALT) zu, indem die Sekretionsleistung sowie der Stimulationsgrad der Plasmazellen in der Submukosa des Intestinums erfasst wird.

Während ein sIgA-Mangel auf eine verminderte Aktivität der immunologischen Abwehr der Darmschleimhaut deutet, weisen erhöhte sIgA-Werte auf eine verstärkte Aktivität des Darm-Abwehrsystems hin.

Aufgrund der stark anti-inflammatorischen Eigenschaften von IgA deuten erhöhte sIgA-Werte im Stuhl auch auf eine mögliche lokale Entzündungsreaktionen in der Darmschleimhaut hin.

RIDASCREEN® sIgA für einen schnellen und zuverlässigen Nachweis:

- des funktionellen Status des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (GALT)
- verminderte sIgA-Spiegel: verminderte Aktivität des darmassoziierten Immunsystems
- erhöhte sIgA-Spiegel: erhöhte Aktivität des darmassoziierten Immunsystems
- einer gestörten immunologischen Barriere an der Darmschleimhaut (erhöhte Infektanfälligkeit, allergische Erkrankung)
- einer lokalen Entzündung der Darmschleimhaut
- von Autoimmunerkrankungen

3. Testprinzip

Im RIDASCREEN® sIgA werden spezifische Antikörper in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte ist ein spezifischer Antikörper gegen Epitope des humanen sIgA gebunden. Eine Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe wird in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und darin inkubiert. Danach erfolgt ein Waschschrift und eine zweite Inkubation zusammen mit einem monoklonalen Antikörper, welcher mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Bei Anwesenheit von sIgA bildet sich ein Sandwich-Komplex aus dem immobilisierten Antikörper, sIgA-Antigen und dem konjugierten Antikörper. Nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die gemessene Extinktion ist proportional zur in der Probe vorhandenen sIgA-Konzentration.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung sind ausreichend für 96 Bestimmungen.

| | | |
|--------------|----------|---|
| Plate | 96 Best. | Mikrotiterplatte; 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit polyklonalen Antikörpern (aus Kaninchen) gegen sekretorisches IgA |
| Extract 10x | 100 ml | Extraktions- und Verdünnungspuffer (10-fach konz.); für Extraktion und primäre Stuhlverdünnung; Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung; enthält 0,1 % Tween und 0,1 % NaN ₃ |
| Diluent 3 | 100 ml | Probenverdünnungspuffer 3 (zur Endverdünnung); Protein-gepufferte NaCl-Lösung; enthält 0,1 % NaN ₃ ; gebrauchsfertig; rot gefärbt |
| Wash buffer | 100 ml | Waschpuffer 10x (10-fach konz.); Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung; enthält 0,1 % Thimerosal |
| Calibrator | 1 ml | Kalibrator (zum Standardabgleich); enthält 0,1 % NaN ₃ ; gebrauchsfertig |
| High control | 1 ml | High-Kontrolle; enthält 0,1 % NaN ₃ ; gebrauchsfertig |
| Low control | 1 ml | Low-Kontrolle; enthält 0,1 % NaN ₃ ; gebrauchsfertig |
| Conjugate | 12 ml | Peroxidase-konjugierter, monoklonaler Antikörper (Maus) gegen humanes sIgA in stabilisierender Proteinlösung; gebrauchsfertig |
| SeroSC | 12 ml | Substrat; Wasserstoffperoxid / TMB; gebrauchsfertig |
| Stop | 12 ml | Stopp-Reagenz; 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig |

Gefahrstoffangabe gemäß Kennzeichnungspflicht. Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) auf www.r-biopharm.com.

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf dem jeweiligen Etikett aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Der verdünnte Wasch- bzw. der verdünnte Extraktionspuffer sind bei einer Lagerung von 2 - 8 °C für 4 Wochen haltbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. Der Alu-Beutel, der die Mikrotiterstreifen enthält, ist mit einer Schere so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im

verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

6.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

6.2. Zubehör

- Feinwaage
- Vortex-Mixer (optional, siehe 9.4.)
- Mikropipette für 50 - 100 µl und 1 ml Volumina
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm; Referenzfilter ≥ 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter mit einer 0,5 %-igen Hypochloritlösung

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *In-vitro*-Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) www.r-biopharm.com.

Die Stuhlproben sollten als potenziell infektiös gemäß den nationalen Sicherheitsbestimmungen behandelt werden.

Der Waschpuffer enthält als Konservierungsmittel 0,1 % Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Kalibrator, High-Kontrolle, Low-Kontrolle, Extraktions- und Probenverdünnungspuffer enthalten als Konservierungsmittel 0,1 % NaN₃. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Wasserstoffperoxid (Substrat) kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben! Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden! Bei Hautkontakt mit Wasser spülen.

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potenziell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

VORSICHT: Um die Bildung giftiger Gase zu vermeiden, muss Flüssigabfall, der Stoppreagenz enthält, neutralisiert werden, bevor er in eine Hypochloritlösung gegeben wird.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften!

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Die Stuhlproben sollten wenn möglich gekühlt transportiert und bis zum Testbeginn bei 2 - 8 °C gelagert werden. Wir empfehlen eine unmittelbare Abarbeitung der Probe oder eine Lagerung bei -20 °C oder kälter. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden. Stuhlproben sollten nicht in Transportbehältern gesammelt werden, die Transportmedien mit Konservierungsstoffen, tierischen Seren, Metallionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien enthalten, da Interferenzen mit dem RIDASCREEN® sIgA auftreten können.

9. Testdurchführung

9.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte Plate auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch sind die nicht benötigten Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Beutel) und die Reagenzien wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind. Ein direkter Kontakt von Proben mit den Kitkomponenten ist zum Ausschluss von Kreuzkontamination zu vermeiden. Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung sollte vermieden werden. Es wird empfohlen, die Mikrotiterplatte zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten abzudecken oder abzukleben.

9.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrats Wash 10x wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt (1:10). Hierfür werden 100 ml des Konzentrats in einen 1000 ml Messzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

9.3. Herstellung des Extraktionspuffers

1 Teil des Extraktionspuffers-Konzentrates **Extract 10x** wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt (1:10). Hierfür werden 100 ml des Konzentrats in einen 1000 ml Messzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

9.4. Vorbereitung der Proben

9.4.1. Probeneinwaage und -suspension

Wir empfehlen die Stuhlproben bis zur Abarbeitung bei -20 °C zu lagern. Gefrorene Proben sollten langsam auf Raumtemperatur gebracht werden.

In ein gekennzeichnetes Teströhrchen werden 100 mg Stuhlprobe eingewogen und anschließend 5 ml des verdünnten Extraktionspuffers dazu pipettiert (1:50-Verdünnung).

Alternativ können zwischen 80 - 130 mg der Stuhlprobe eingewogen und zur Gewährleistung eines konstanten Verdünnungsverhältnisses (1:50) die Volumina der Extraktionspuffermengen in Abhängigkeit von der eingewogenen Stuhlprobe variabel eingesetzt werden (siehe Tab. 1).

Tab.1: Angaben zu den benötigten Mengen an verdünntem Extraktionspuffer, abhängig von der jeweils eingewogenen Stuhlmenge (konstanter Verdünnungsfaktor von 1:50)

| Einwaage [mg] | Volumen [ml] |
|-----------------|----------------|
| 80 | 4,00 |
| 85 | 4,25 |
| 90 | 4,50 |
| 95 | 4,75 |
| 100 | 5,00 |
| 105 | 5,25 |
| 110 | 5,50 |
| 115 | 5,75 |
| 120 | 6,00 |
| 125 | 6,25 |
| 130 | 6,50 |

Bei Resuspension im konstanten Extraktionspuffervolumen von 5 ml muss der dabei variable Verdünnungsfaktor bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt werden (siehe Tab.2).

Tab.2: Angaben des Verdünnungsfaktors bei konstanter Zugabe an verdünntem Extraktpuffer (5 ml), abhängig von der jeweils eingewogenen Stuhlmenge

| Einwaage [mg] | Verdünnungsfaktor |
|-----------------|-------------------|
| 80 | 62,50 |
| 85 | 58,82 |
| 90 | 55,55 |
| 95 | 52,63 |
| 100 | 50,00 |
| 105 | 47,62 |
| 110 | 45,45 |
| 115 | 43,45 |
| 120 | 41,66 |
| 125 | 40,05 |
| 130 | 38,46 |

Das Homogenisieren der Stuhlsuspension erfolgt unabhängig von der Einwaage-Methode durch gründliches Mischen auf einem Vortexer. Bei flüssigem Stuhl werden genau 100 µl in eine Pipette aufgesaugt und in genau 5 ml vorgelegtem, verdünnten Extraktpuffer suspendiert.

- Im Anschluss muss das Homogenisat zur Sedimentation grober Stuhlpartikel für 10 Minuten bei mindestens 3000 g zentrifugiert werden. Der Überstand des Extraktes muss für den Testeinsatz direkt weiter verdünnt werden. Wir empfehlen eine Lagerung des aliquotierten Überstands bei -20 °C oder kälter.

9.4.2. Manuelle Probenverdünnung

50 µl des geklärten Überstandes (aus 9.4.1) werden mit 950 µl verdünntem Extraktpuffer verdünnt (1:20) und gevortext. Danach erfolgt eine weitere Verdünnung der Probe, indem 100 µl der ersten Verdünnung mit 900 µl RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer 3 verdünnt (1:10) und gevortext werden. Diese Endverdünnung der Stuhlprobe (Endverdünnung 1:10.000) wird anschließend im Test eingesetzt.

Als Alternative zur oben beschriebenen Aufarbeitung und Homogenisierung des Probenmaterials eignet sich das Probenvorbereitungssystem der Firma. Spezielle Anweisungen hierzu stellt die R-Biopharm AG auf Anfrage hin gerne zur Verfügung.

9.4.3. Automatische Probenverdünnung

Erfolgt die Testdurchführung auf einem DSX-ELISA-Vollautomaten der Firma Dynex, wird das hierfür erforderliche Messprotokoll auf Anfrage von der R-Biopharm AG zur

Verfügung gestellt und auf dem Gerät appliziert. Die Probe wird dann, wie folgend aufgeführt, vom Gerät automatisch verdünnt.

25 µl des geklärten Überstandes werden vom ELISA-Automat in eine Deepwell-Platte pipettiert und mit 975 µl verdünntem Extraktionspuffer verdünnt (1:40). Es folgen zwei Misch-Zyklen.

In den Halterahmen der RIDASCREEN® sIgA-Mikrotiterplatte **Plate** wird die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen eingesetzt.

Aus der Deepwell-Platte werden jeweils 20 µl der Probenverdünnung in die RIDASCREEN® sIgA-Mikrotiterplatte **Plate** überführt und mit 80 µl RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent | 3** weiter verdünnt (1:5; Endverdünnung 1:10.000).

Zur Testdurchführung auf anderen ELISA-Pipettierautomaten wenden Sie sich bitte an die R-Biopharm AG.

9.5. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen erfolgt die Zugabe von je 100 µl Kalibrator **Calibrator** (in Doppelbestimmung), RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent | 3** (= Negativ-Kontrolle), High-Kontrolle **High control | +** sowie von der zu untersuchenden Stuhlprobenendverdünnung in die jeweiligen Vertiefungen. Bei Verwendung der Low-Kontrolle **Low control | +** werden hiervon ebenfalls 100 µl in den Test eingesetzt. Anschließend wird die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) inkubiert.

9.6. Erster Waschschrift

Sorgfältiges Waschen ist wichtig zum Erzielen korrekter Ergebnisse und sollte daher strikt nach Anleitung erfolgen. Das Inkubat in den Kavitäten sollte zunächst in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit-Lösung zwecks Desinfektion entleert werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5-mal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 9.2.) gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

Bei der Verwendung eines Waschautomaten ist auf eine korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Mikrotiter-Plattentyp zu achten. Ferner sollte eine nicht komplett partikelfreie Stuhlsuspension vor dem ersten Waschen manuell durch Ausschleudern aus den Kavitäten entfernt werden, um Verstopfungen der Waschnadeln zu vermeiden. Bei den Waschschriften muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden. Nach dem letzten Waschschrift sollte die Platte gründlich auf saugfähigem, sauberem Papier oder Labortüchern ausgeschlagen werden, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen.

9.7. Zweite Inkubation

Zugabe von 100 µl Konjugat **Conjugate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) inkubiert.

9.8. Zweiter Waschschrift

Nach Ablauf der Inkubationszeit sollte das Konjugat in den Kavitäten zunächst in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit-Lösung zwecks Desinfektion entleert werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5-mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

9.9. Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl Substrat **SeroSC** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) im Dunkeln inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt.

Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Hinweis: Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Substrates verursachen. Diese Proben sollten 1:10 verdünnt und erneut in den Test eingesetzt (siehe 9.5.) werden (Endverdünnung der Stuhlprobe: 1:10.0000).

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle muss bei jeder Testdurchführung der Kalibrator **Calibrator** (in Doppelbestimmung), der RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent | 3** als Negativ-Kontrolle und die High-Kontrolle **High control | +** mitgeführt werden, um Reagenzien-Stabilität und die korrekte Testdurchführung sicherzustellen. Die Verwendung der Low-Kontrolle ist optional.

Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (OD) der Negativ-Kontrolle bei 450 nm / 620 nm kleiner als 0,05 ist und der gemittelte Extinktionswert (OD) des Kalibrators innerhalb des auf dem chargenspezifischen Datenblatt angegebenen Bereiches liegt. Die High-Kontrolle muss innerhalb des auf dem Datenblatt angegebenen chargenspezifischen Konzentrationsbereiches liegen.

Bei der Abarbeitung des RIDASCREEN® sIgA auf offenen ELISA-Vollautomaten kann, je nach Automat, der gemessene OD-Wert des Kalibrators **Calibrator** von dem auf dem chargenspezifischen Zertifikat vorgegebenen Bereich abweichen. Auch auf ELISA-Vollautomaten ist allein die High-Kontrolle **High control | +** für die Validität der Testergebnisse ausschlaggebend und muss daher immer mitgeführt werden. Die Verwendung der Low-Kontrolle **Low control | +** ist nicht zwingend erforderlich.

Eine Abweichung von den geforderten Werten sowie eine Reagenzientrübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten können ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein. Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

Sind nach Testwiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm-Distributeur.

11. Auswertung und Interpretation

11.1. Ein-Punkt-Quantifizierung nach dem 4-Parameter-logistic-log-Modell

Die Bestimmung der Konzentration von slgA in $\mu\text{g/g}$ Stuhl erfolgt beim RIDASCREEN® slgA nach dem 4-Parameter-logistic-log-Modell (4PL).

Für die Ergebnisermittlung wird die Auswertesoftware RIDA®SOFT Win.net benötigt. Die RIDA®SOFT Win.net bzw. ein Update kann auf Anfrage von der R-Biopharm AG oder über Ihren lokalen R-Biopharm Distributeur bezogen werden.

Die für die 4PL-Berechnung benötigten Parameter (A - D) der Standardkurve sowie der Sollwert für Kalibrator, High-Kontrolle und Low-Kontrolle sind auf dem, dem Testkit beiliegenden, chargenspezifischen Datenblatt aufgeführt und müssen vor einer Messung jeweils mit den Werten in der Auswertesoftware abgeglichen werden.

Die R-Biopharm AG ermittelt in der Qualitäts-Endkontrolle unter optimalen Testbedingungen für jede Kitcharge die Standardkurve (inkl. der Parameter A - D) sowie jeweils einen Sollwert und einen erlaubten Bereich für die Standardabweichung von Kalibrator, High-Kontrolle und Low-Kontrolle.

Der Kalibrator wird mitgeführt, um Testschwankungen auszugleichen und um die Qualität des Testlaufes prüfen zu können. Die High-Kontrolle gibt Auskunft über die Validität des Testes.

Aus dem Mittelwert der Doppelbestimmung des Kalibrators und dessen Sollwert wird durch die RIDA®SOFT Win.net intern ein Korrekturfaktor F berechnet und mit den Extinktionen der Stuhlproben verrechnet. Innerhalb der Grenzen der Standardkurve ist eine sichere und zuverlässige Bewertung der Testergebnisse möglich.

Alternativ zur RIDA®SOFT Win.net kann eine andere Auswertesoftware, die das 4-Parameter-logistic-log-Modell zur Verfügung stellt, verwendet werden.

11.2. Testergebnis

Der ermittelte Normbereich von sIgA liegt bei 100 – 1200 µg sIgA/g Stuhl. Liegen die Messwerte unterhalb von 100 µg sIgA/g Stuhl, sind die Patienten sIgA-insuffizient. Bei Messwerten über 1200 µg sIgA/g Stuhl weisen die Patienten erhöhte sIgA-Werte auf.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® sIgA weist Epitope von humanem sIgA in Stuhlproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Extinktionswertes und der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die ermittelten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.

13. Leistungsmerkmale

13.1. Analytische Sensitivität

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität wurde der LoB (Limit of Blank) mit insgesamt 210 Messungen eines Puffers, bestehend aus Extraktionspuffer und Diluent und der LoD (Limit of Detection) mit 70 Messungen einer positiven Kontrollprobe analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab.3: Ergebnisse der analytischen Sensitivität

| | MW [OD 450/620 nm] | µg/g |
|-----|-----------------------|-------|
| LoB | 0.003 | - |
| LoD | - | 65.07 |

13.2. Präzision

Die Intra- und Inter-Assay-Reproduzierbarkeit des RIDASCREEN® sIgA wurde durch Mehrfachbestimmung an verschiedenen Tagen unter Einhaltung optimaler Bedingungen ermittelt. Aus den Ergebnissen erfolgte die Berechnung des Mittelwertes (MW), der Standardabweichung (SD) sowie des Variationskoeffizienten (VK). Die Tabellen 3 und 4 geben die Ergebnisse wieder.

Tab.4: Intra-Assay-Reproduzierbarkeit (n=16)

| | 1. Konzentration [600 µg/g] | 2. Konzentration [1200 µg/g] |
|--------------------|--|---|
| Mittelwert (ng/ml) | 674 | 1380 |
| SD | 45,6 | 55,80 |
| % VK | 6,8 | 4,0 |

Tab.5: Inter-Assay-Reproduzierbarkeit (n=8)

| | 1. Konzentration [660 µg/g] | 2. Konzentration [1500 µg/g] |
|--------------------|--|---|
| Mittelwert (ng/ml) | 677 | 1461 |
| SD | 79,7 | 85,5 |
| % VK | 11,8 | 5,9 |

13.3. Linearität der Testergebnisse

Um die Linearität der Ergebnisse des RIDASCREEN® slgA zu überprüfen, wurden serielle Verdünnungsreihen mehrerer slgA-haltiger Stuhlproben hergestellt. Probeneinwaage und -suspension sowie der erste Verdünnungsschritt erfolgten analog zu den Angaben in dieser Anleitung (siehe Punkt 9.4.). Die seriellen Verdünnungsschritte wurden anschließend mit RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer Diluent | 3 hergestellt.

Errechnet wurden die im Test ermittelten Konzentrationen im Vergleich zu den erwarteten. Die Tabelle 5 gibt die Ergebnisse der Verdünnungsreihen von drei Proben mit unterschiedlichen slgA-Konzentrationen wieder.

Tab.5: Bestimmung der Linearität der Testergebnisse










| Probe | Verdünnung | Ermittelte Konzentration (µg/g) | Erwartete Konzentration (µg/g) | Ermittelte Konz. / Erwartete Konz. |
|-------|-------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 1:10.000 | 807,00 | | |
| | 1:20.000 | 406,00 | 403,50 | 101 % |
| | 1:40.000 | 207,50 | 201,75 | 103 % |
| | 1:80.000 | 104,25 | 100,88 | 103 % |
| | 1:160.000 | 57,69 | 50,44 | 114 % |
| | MW | | | 105 % |
| 2 | 1:10.000 | 1175,00 | | |
| | 1:20.000 | 576,50 | 587,50 | 98 % |
| | 1:40.000 | 280,25 | 293,75 | 95 % |
| | 1:80.000 | 146,38 | 146,88 | 100 % |
| | 1:160.000 | 74,69 | 73,44 | 102 % |
| | MW | | | 99 % |
| 3 | 1:10.000 | 378,00 | | |
| | 1:20.000 | 202,50 | 189,00 | 107 % |
| | 1:40.000 | 107,25 | 94,50 | 113 % |
| | 1:80.000 | 58,75 | 47,25 | 124 % |
| | 1:160.000 | - | 23,63 | - |
| | MW | | | 115 % |
| | MW (gesamt) | | | 106 % |

14. Versionsübersicht


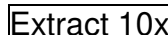

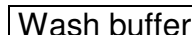
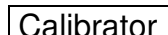
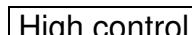
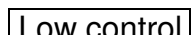
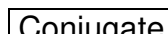
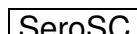

| Versionnummer | Kapitel und Bezeichnung |
|---------------|---|
| 2019-02-27 | Generelle Überarbeitung 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung |

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

| | |
|---|-----------------------------|
|  | In-vitro-Diagnostikum |
|  | Gebrauchsanweisung beachten |
|  | Chargennummer |
|  | Verwendbar bis |
|  | Lagertemperatur |
|  | Artikelnummer |
|  | Anzahl Tests |
|  | Herstelltdatum |
|  | Hersteller |

Testspezifische Symbole

| | |
|---|------------------------------------|
|  | Mikrotiterplatte |
|  | Extraktions- und Verdünnungspuffer |
|  | Probenverdünnungspuffer |
|  | Waschpuffer 10x |
|  | Kalibrator |
|  | Hohe Kontrolle |
|  | Niedrige Kontrolle |
|  | Konjugat |
|  | Substrat |
|  | Stopp-Reagenz |

16. Literatur

1. Brand S, Gerritzen A. Evaluation eines neuen Enzym-Immuno-Assays zum Nachweis von sekretorischem IgA im Stuhl. Poster DGKL 2010.
2. Brandtzaeg P. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. *Current Opinion in Gastroenterology* 2010, 26: 554–563.
3. Goldblum RM. The role of IgA in local immune protection. *J Clin Immunol* 1990; 10(6): 64S-71S.
4. Mestecky Y et al. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut* 1999; 44: 2-5.
5. Motegi Y et al. Role of secretory component, and eosinophils in mucosal inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122(suppl 1): 25–27.
6. Rüssmann H et al. IgA/IgM and secretory immunity. *Sepsis* 1999; 3: 219-234.
7. Russel MW et al. Molecular heterogeneity of human IgA antibodies during an immune response. *Clin Exp Immunol* 1992; 87: 1-6.