

**Zusammensetzung der Testkits**

Menge	Artikel
gebrauchsfertig 12 x 8 Vertiefungen	<b>Mikrotiterplatte</b> (Mit polyklonalen Antikörpern 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 150 µl	<b>Antikörper - Konzentrat</b> (Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Thimerosal)
gebrauchsfertig 150 µl	<b>Konjugat - Konzentrat</b> (HRP markierter Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Thimerosal)
gebrauchsfertig 2 x 15 ml	<b>Konjugat - Puffer</b> (Phosphatpuffer mit Thimerosal und Proteinzusatz)
gebrauchsfertig 12 ml	<b>Substrat</b> (TMB)
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 befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H2SO4). H2SO4 ist eine starke Säure und muss auch in 2verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H2SO4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

**Technische Merkmale**

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien sollte vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Im Falle von nicht optimalen Ergebnissen wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

**Allgemeine Hinweise**

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Maier analytik GmbH übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Firma Maier Analytik GmbH, zurück zu senden.

**Bestimmung von ScIgA gesamt im Stuhl mittels eines ELISAs.**

Nur zur "in vitro Diagnostik"



**Einführung**

Das sekretorische IgA besteht aus zwei IgA Monomeren, die durch eine J-Kette miteinander verbunden sind und eine sekretorische Komponente enthalten. Es wird von den in der Lamina propria der Schleimhäute gelegenen Plasmazellen gebildet und kommt in Körpersekreten wie Speichel, Tränen, Nasenschleim, Tracheobronchialschleim, gastrointestinale Sekrete, Muttermilch und Kolostrum vor. Die Bildung des sekretorischen IgA erfolgt unabhängig von der Serum-IgA Synthese. Somit bedeutet ein Mangel an Serum-IgA nicht zwangsläufig ein Fehlen von sekretorischem IgA. Das Neugeborene und der Säugling werden über die Muttermilch mit sIgA versorgt und sind so gegenüber gastrointestinalen Infektionen passiv immunisiert. Über die Konzentration des sIgA im Stuhl können Rückschlüsse auf die körpereigene Abwehr der Darmschleimhäute getroffen werden. Ein Mangel an sIgA deutet auf eine verminderte Aktivität des Mukosaimmunsystems hin, wohingegen erhöhte sIgA-Werte auf erhöhte Aktivität und somit auf eine lokale Entzündung der Darmschleimhaut hinweisen.

Der Mensch produziert zwei IgA Isotyp-Subklassen: IgA1 und IgA2, die sich sowohl in ihrer Aminosäuresequenz als auch in ihren Kohlenhydratstrukturen unterscheiden. Die Verteilung beider IgA-Subklassen in den Sekreten hängt von der Mucosaseite ab: IgA1 wird von Plasmazellen der Atemungswege, des oberen Verdauungstrakts und der Brustdrüsen sezerniert (60–93%), während IgA2 vorwiegend im unteren Verdauungstrakt und von den weiblichen Fortpflanzungsorganen produziert wird.

**Indikationen**

Nachweis einer gestörten immunologischen Barriere an der Darmschleimhaut  
Autoimmunerkrankungen.

**Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode**

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des sekretorischen IgA im Stuhl. In diesem ELISA wird das sekretorische IgA aus den Proben an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper (Kaninchen anti human IgA) gebunden. Während eines Waschschrittes werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes sIgA wird mit Hilfe eines MAUS anti sekretorische Komponente) Antikörpers detektiert. Dieser erkennt spezifisch das gebundene sekretorische IgA. Während eines Waschschrittes werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes sIgA wird mit Hilfe eines Peroxidase-markierten (Maus Anti Rabbit IGG-HRP) Antikörpers detektiert. Dieser erkennt spezifisch das gebundene Maus IGG. Über ein Antikörper-Antikörper-Peroxidase/TMB-System wird das sIgA schließlich detektiert. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Eine Standardkurve wird erstellt, aus der die Konzentrationen ermittelt werden.

**Assay Parameter**

1. Antikörper an der Platte:	Rabbit-Anti-human-IGA
Antikörper	Maus Anti-ScIgA
Konjugat	Rabbit Anti-Maus IgG HRP markiert
Probenmaterial:	Stuhl 1/1000 in Probenverdünnungspuffer
Probenvolumen	100 µl
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	341 µg/g
Recovery :	78,6%-101,5%
Linearität (r= Korrelationskoeffizient):	R = 0,99
Intraassayvarianz:	< 8,8 %
Interassayvarianz:	< 8,9 %
Meßbereich:	500-4000 µg/g
<b>Normbereich</b> Cut off-Wert für Gesunde (Stuhl):	<b>500-2000 µg/g</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                            |
| Entrifuge 3000 x g  | Folie zum Abkleben der Platte           |
| Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm). |   |

Vorbereitungen für die Methodendurchführung						
<b>1</b>	<b>Alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18-26 °C)bringen.</b>					
<b>2</b>	<b>Probenverdünnungspuffer:</b> Das Röhrchen mit dem Probenverdünnungspufferkonzentrat wird in einem Wasserbad so lange erhitzt bis die Lösung klar ist. Danach wird der gesamte Inhalt in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt.					
<b>3</b>	<b>Waschpuffer:</b> Der gesamte Inhalt des Waschpufferkonzentrat wird in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt					
<b>4</b>	<b>Vorbereitung der Stuhlproben:</b> Stuhlproben werden eingewogen und <b>1/50</b> (Gewicht zu Volumen) mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt (Zu 0,1 g Stuhl werden 5 ml Puffer zugegeben).Die Proben werden so lange gemischt bis die Lösung homogen ist. Die Röhrchen werden 15 min bei 3000 g zentrifugiert.					
<b>5</b>	<b>Verdünnen der extrahierten Proben (1/20; Endverdünnung: 1/1000) :</b> 10 µl des klaren Überstandes wird in 190 µl des Probenverdünnungspuffers gelöst.					
<b>6</b>	<b>Verdünnen des Konjugats und des Antikörpers jeweils (1/100):</b>					
	<b>Anzahl der Streifen</b>	<b>Konjugat/ Antikörper</b>	<b>Konjugatpuffer</b>	<b>Anzahl der Streifen</b>	<b>Konjugat/ Antikörper</b>	<b>Konjugat-puffer</b>
	<b>1</b>	<b>10 µl</b>	<b>1 ml</b>	<b>7</b>	<b>70 µl</b>	<b>7 ml</b>
	<b>2</b>	<b>20 µl</b>	<b>2 ml</b>	<b>8</b>	<b>80 µl</b>	<b>8 ml</b>
	<b>3</b>	<b>30 µl</b>	<b>3 ml</b>	<b>9</b>	<b>90 µl</b>	<b>9 ml</b>
	<b>4</b>	<b>40 µl</b>	<b>4 ml</b>	<b>10</b>	<b>100 µl</b>	<b>10 ml</b>
	<b>5</b>	<b>50 µl</b>	<b>5 ml</b>	<b>11</b>	<b>110 µl</b>	<b>11 ml</b>
	<b>6</b>	<b>60 µl</b>	<b>6 ml</b>	<b>12</b>	<b>120 µl</b>	<b>12 ml</b>

**Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien**

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.
- Reagenzien mit einem Volumen kleiner als 200 µl sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** und **Probenpufferkonzentrat** müssen vor Gebrauch in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (35 ml bzw. 30 ml Konzentrat + 500 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentrate kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Die Pufferkonzentrate können bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnten Pufferlösungen sind bei 2-8 °C einen Monat in geschlossenen Gefäßen haltbar..
- Die **Standards und Kontrollen** sind bei <15 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil und können bis zu 2-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.
- Die **Mikrotiterplatte** ist in verschlossenem Plastikbeutel 30 Tage bei Raumtemperatur und bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- **Alle anderen Testreagenzien** sind bei 2-8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

**Probenmaterial und Probenhaltbarkeit**

Die Stuhlproben werden vor der Bestimmung extrahiert und verdünnt. Die Haltbarkeit der verdünnten Proben (1/50) beträgt 2 Tage bei <8 °C oder 12 Monate in tiefgefrorenem Zustand. Die Stuhlsuspension (1/1000) ist nicht haltbar. Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen bzw. zu verdünnen. Es ist zu bedenken, das Einfrieren und Auftauen einen Aktivitätsverlust von bis zu 20 % mit sich bringen kann.

**Testansatz: alle Reaktionen sollten im Dunkeln stattfinden**

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen.

**100 µl** Kalibrator, Kontrollen und Proben in die Vertiefungen pipetieren.

den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren

Waschen mit 3 \* 250 µl Waschpuffer

**100 µl** verdünnter Antikörper (1/100) in alle Vertiefungen

den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren

Waschen mit 3 \* 250 µl Waschpuffer

**100 µl** verdünntes Konjugat (1/100) in alle Vertiefungen

den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren

Waschen mit 3 \* 250 µl Waschpuffer

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

den Testansatz **30 min** bei Raumtemperatur inkubieren

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

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

**Standards**

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>→</b>	<b>600 – 1400 µg/g</b>
<b>Kontrolle 2:</b>	<b>→</b>	<b>1200 – 2800 µg/g</b>