

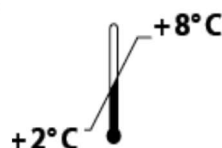
GABA ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung von GABA in Stuhl

For the in vitro determination of GABA in stool

Gültig ab / Valid from 2023-10-01

REF **K 7009**



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Probenstabilität und -lagerung</i>	5
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<i>Probenverdünnung</i>	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema Derivatisierung</i>	7
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	7
8. ERGEBNISSE	9
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
<i>Biotininterferenz</i>	10
10. QUALITÄTSKONTROLLE	10
<i>Referenzwerte</i>	10
11. TESTCHARAKTERISTIKA	11
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	11
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	11
<i>Linearität</i>	12
<i>Analytische Sensitivität</i>	13
<i>Analytische Spezifität</i>	13
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	13
13. TECHNISCHE MERKMALE	14
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14
15. LITERATUR	15

1. VERWENDUNGSZWECK

Der GABA (Stuhl) ELISA ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) zum quantitativen Nachweis der Konzentration von freier Gamma-Aminobuttersäure (GABA) in Stuhl.

Der Assay ist ein In-vitro diagnostischer Test zur Verwendung durch professionelle Anwender in einer Laborumgebung. Er kann manuell oder mit einer automatisierten Plattform verwendet werden.

Der Test dient als Hilfsmittel zur Diagnose einer verminderten GABA-Konzentration im Stuhl, die mit gastrointestinalen Beschwerden verbunden sein kann.

2. EINLEITUNG

GABA (γ -Aminobuttersäure) ist ein hemmender Neurotransmitter, der die Wahrnehmung von viszerale Schmerzen durch periphere afferente Neuronen reguliert^[1]. Es ist der am häufigsten vorkommende hemmende Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS)^[2]. Eine verminderte GABA-Signalübertragung ist nachweislich an der Pathogenese zahlreicher ZNS-Erkrankungen beteiligt, so dass die Steigerung der GABAergen Signalübertragung ein anerkanntes therapeutisches Ziel darstellt^[3].

Beim Reizdarmsyndrom (IBS) konnte von Aggarwal et al. gezeigt werden, dass ein verringerter GABA-Spiegel und eine veränderte GABA-erge Signalübertragung zur Pathogenese des von Durchfall geprägten IBS (IBS-D) beitragen, möglicherweise durch eine Abschwächung der hemmenden Prozesse^[4].

Wissenschaftliche Untersuchungen deuten darauf hin, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der mikrobiellen GABA-Produktion und der Wirkung von GABA im ZNS besteht:

- Es wurde nachgewiesen, dass beispielsweise Arten aus den Familien Bifidobacteriaceae und Lactobacillaceae dazu in der Lage sind, GABA zu produzieren^[5]. Insbesondere einige Stämme von Bifidobacterium weisen diese Fähigkeit auf^[6]. Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass niedrige GABA-Spiegel im Stuhl bei Personen mit einem Mangel an Bifidobakterien in Verbindung gebracht werden können^[7].
- Da die Mikrobiota den GABA-Spiegel im Darm beeinflusst, wird diskutiert, dass die GABA-Signalübertragung im Darm und im ZNS auch direkt von der Mikrobiota beeinflusst wird^[8;9].
- Es wird daher vermutet, dass eine mangelnde GABA-Signalgebung (z. B. durch eine Dysbiose) IBS-Symptome auslösen kann^[10].

Folglich scheint die bakterielle Freisetzung von GABA einen erheblichen Einfluss auf die Mikrobiom-Darm-Hirn-Achse zu haben. Probiotika, die GABA-produzierende Bakterien enthalten, führen zu einer Schmerzlinderung bei IBS-Patienten und auch zu einer Verringerung der IBS-assoziierten Depressionssymptome ^[11;12;13].

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7009	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0015	COPLATE	Kopplungsplatte	12 x 8 Vertiefungen
K 7009	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 µg/ml)	2 x 6 x 500 µl
K 7009	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 500 µl
K 7009	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 500 µl
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7999.100	IDK® Amino Extract	Extraktionspuffer <i>IDK® Amino Extract</i> , gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 7009	AB	GABA-Antikörper, peroxidase markiert, gebrauchsfertig	1 x 6 ml
K 7009	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 70 ml
K 7009	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	1 vial
K 0008.10	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 10 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehaltes im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das bei **2-8 °C** gelagerte **WASHBUF** kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2-8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **DMSO** kristallisiert bei 2-8 °C aus. Vor Gebrauch das DMSO auf Raumtemperatur bringen, um die Kristalle zu lösen.
- Das **lyophilisierte Derivatisierungsreagenz (DER)** ist, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor dem Öffnen auf Raumtemperatur bringen. Zum Rekonstituieren die auf dem Etikett angegebene Menge an **DMSO** zugeben und mit dem Vortex-Mixer mehrere Sekunden mischen, **15 min** stehen lassen und zwischendurch vortexen. Das **Derivatisierungsreagenz** (gelöstes DER) ist **2 Monate bei 2-8 °C** haltbar. Das Derivatisierungsreagenz vor dem erneuten Gebrauch wieder auf Raumtemperatur bringen. Bitte beachten: DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.

- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenstabilität und -lagerung

Rohstuhl kann bis zu 3 Tage bei Raumtemperatur gelagert werden. Zur längeren Lagerung bei -20 °C aufbewahren.

Stuhlextrakt ist 5 Tage bei Raumtemperatur oder 7 Tage bei 2-8 °C haltbar. Zur längeren Lagerung bei -20 °C aufbewahren.

Stuhlprobenextraktion

Wir empfehlen, das mit **IDK® Amino Extract** (Extraktionspuffer) **befüllte Stuhlprobenvorbereitungssystem (Artikel-Nr. K 7999)** zu verwenden.

Der Extraktionspuffer IDK® Amino Extract ist gebrauchsfertig. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

Stuhlprobenröhrchen mit 0,75 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen (IDK® Amino Extract):	0,75 ml
Verdünnungsfaktor:	1:50

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe der befüllten Stuhlprobenröhrchen wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o.Ä.
- b) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde). Der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- c) Das Röhrchen solange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist

darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres Einweichen (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.

- d) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u.Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- e) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Bei dem Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnung I: 1:50

Probenverdünnung

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:2 mit Extraktionspuffer (IDK® Amino Extract)** weiter verdünnt. Zum Beispiel:

100 µl Suspension (Verdünnung I) + **100 µl** IDK® Amino Extract, mischen
= **1:2 (Verdünnung II)**.

Dies entspricht nun einer Gesamtverdünnung von **1:100**.

Zur weiteren Probenvorbereitung werden **25 µl der Verdünnung II** derivatisiert (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von GABA aus Stuhl. Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zur Vorbereitung werden Standards, Kontrollen und extrahierte Proben mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen GABA versetzt. Anschließend werden in einer mit GABA-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte die derivatisierten Proben zusammen mit einem peroxidasemarkierten polyklonalen GABA-Antikörper inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper.

Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau

nach gelb erfolgt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender GABA-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema Derivatisierung

Vor Gebrauch alle **Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15-30 °C) bringen, gut mischen.

Die Derivatisierung der Standards, der Kontrollen und der verdünnten Stuhlproben wird in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aus Polypropylen) durchgeführt. Alternativ dazu kann die Derivatisierung auch in den Vertiefungen der Kopplungsplatte (COPLATE) durchgeführt werden.

Wir empfehlen, pro Standard, Kontrolle und Probe je eine Derivatisierung durchzuführen und diese jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Mikrotiterplatte aufzutragen.

1.	25 µl Standard (STD)/Kontrolle (CTRL)/Probe aus Verdünnung II in Mikroreaktionsgefäße bzw. in die Vertiefungen der Kopplungsplatte (COPLATE) pipettieren.
2.	250 µl Reaktionspuffer (REABUF) in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) bzw. in jede Vertiefung der Kopplungsplatte pipettieren.
3.	50 µl Derivatisierungsreagenz in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und gründlich mischen , z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen. Anschließend auf einem Horizontalschüttler 30 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubieren. <i>Alternativ dazu:</i> 50 µl Derivatisierungsreagenz in jede Vertiefung (STD, CTRL, Probe) der Kopplungsplatte pipettieren und sofort auf einem Horizontalschüttler 30 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubieren.

2 x 50 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Pipettierschema Testdurchführung

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben in Doppelbestimmung in einem Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden.

4.	2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben aus den Mikroreaktionsgefäßen, oder der COPLATE, als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
5.	50 µl GABA-Antikörper (AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Platte mit Folie dicht abkleben und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	12-18 min* bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automatenpezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Auf folgende Punkte ist zu achten:

Eine Derivatisierung der Proben ist sowohl in 30 Minuten auf einem Horizontal-schüttler als auch, nach sorgfältigem Durchmischen, in 90 Minuten ohne Schütteln in einem Automaten möglich. Bei automatisierter Abarbeitung dürfen unter Wahrung der jeweiligen Verdünnungen die Volumina von Proben und Verdünnern skaliert werden. Gerätespezifische Minimal- und Maximalvolumina sind zu beachten. Die Homogenität der resultierenden Verdünnung ist zu gewährleisten.

Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion.

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

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.

Stuhlproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 100** multipliziert (Verdünnung I x Verdünnung II), um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten. Sollte ein anderer Verdünnungsfaktor verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs können mit Extraktionspuffer (IDK® Amino Extract) stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

Biotininterferenz

Proben, die Biotin in einer Konzentration von $\leq 13 \mu\text{g/ml}$ enthalten, zeigen eine Veränderung der Ergebnisse von $< 25 \%$. Höhere Biotinkonzentrationen können zu falschen Ergebnissen führen. Bei Patienten, die $> 5 \text{ mg/Tag}$ Biotin einnehmen, sollte die Probeentnahme frühestens 24 Stunden nach der letzten Applikation erfolgen. Ergebnisse für Patienten, die Biotinpräparate einnehmen oder eine hochdosierte Biotintherapie erhalten, sollten grundsätzlich vorsichtig und im Zusammenhang mit dem gesamten klinischen Bild interpretiert werden.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

1 g Stuhl entspricht 1 ml.

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich gesunden Personen ($n = 40$) wurde ein Median von $27,4 \mu\text{g/g}$ ermittelt, die 10. Perzentile lag bei $13,6 \mu\text{g/g}$. Daraus ergibt sich folgender Normbereich:

GABA-Konzentration in Stuhl: $> 13,6 \mu\text{g/g}$

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 16

Die Wiederholbarkeit wurde mit 5 Proben unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [$\mu\text{g/ml}$]	VK [%]
1	10,4	11,0
2	21,7	5,2
3	15,3	11,1
4	54,3	5,0
5	167,4	5,1

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 13

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 8 Proben unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [$\mu\text{g/ml}$]	VK [%]
1	52,3	5,2
2	155,4	5,4
3	10,2	10,3
4	20,7	6,9
5	16,1	7,7
6	59,6	4,3
7	278,8	6,7
8	520,1	8,0

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Dafür wurden 4 niedrige Proben mit niedrigen und hohen Proben versetzt (Spike) und gemessen. Die erwarteten Werte resultieren aus dem Mittel von Probe und Spike.

Probe [µg/ml]	Spike [µg/ml]	erwartet [µg/ml]	gemessen [µg/ml]	Wiederfindung [%]
6,2	10,5	8,3	8,9	107,2
	20,3	13,2	12,3	93,2
	15,4	10,8	11,5	106,5
10,5	160,0	85,2	97,5	114,3
	64,8	37,7	40,6	107,8
	187,2	98,8	108,2	109,5
24,9	160,0	92,5	105,2	113,7
	64,8	44,9	51,4	114,4
	187,2	106,1	113,7	107,2
17,5	160,0	88,7	94,5	106,4
	64,8	41,2	38,5	93,5
	187,2	102,3	111,9	109,4

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels einer seriellen Verdünnung von 3 Stuhlproben nachgewiesen.

Für GABA in Stuhl wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 6,9 bis 160,6 µg/ml nachgewiesen mit einer Wiederfindung von 88,7 bis 119,4 % in diesem Bereich.

Probe [µg/ml]	Verdünnung	erwartet [µg/ml]	gemessen [µg/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:100		160,6	
	1:150	107,1	104,9	97,9
	1:200	80,3	80,2	99,9
	1:300	53,5	52,1	97,3
	1:400	40,2	42,4	105,6
	1:500	32,1	34,8	108,3
	1:600	26,8	29,2	108,9
	1:800	20,1	20,6	102,5
B	1:100		55,5	
	1:150	37,0	35,7	96,6
	1:200	27,7	27,0	97,5
	1:300	18,5	18,8	101,6
	1:400	13,9	13,7	98,9
	1:500	11,1	10,1	91,0
	1:600	9,2	11,0	119,4
	1:800	6,9	7,5	108,8

C	1:100		129,0	
	1:150	86,0	92,4	107,5
	1:200	64,5	65,7	101,9
	1:300	43,0	42,9	99,8
	1:400	32,2	33,3	103,2
	1:500	25,8	29,0	112,5
	1:600	21,5	21,9	101,9
	1:800	16,1	14,3	88,7

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank, LoB*) 0,036 µg/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection, LoD*) 0,047 µg/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation, LoQ*) 0,050 µg/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die GABA-Reaktivität:

β-Alanin < 0,14 %

β-Aminobuttersäure keine Kreuzreaktivität nachgewiesen

α-Aminobuttersäure keine Kreuzreaktivität nachgewiesen

Glycin keine Kreuzreaktivität nachgewiesen

Glutamin keine Kreuzreaktivität nachgewiesen

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Thimerosal oder ProClin. Thimerosal bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind

dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.

- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

Achtung: Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.

















- *IDK*[®] ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- 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 Immundiagnostik AG 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 Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. de Leon AS, Tadi P. Biochemistry, Gamma Aminobutyric Acid. [Updated 2021 May 9]. *StatPearls Publishing*; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551683/>
2. Li K, Xu E. The role and the mechanism of gamma-aminobutyric acid during central nervous system development. *Neurosci. Bull.* 2008, 24, 195–200
3. Torres-González MI, Manzano-Moreno FJ, Vallecillo-Capilla MF, Olmedo-Gaya MV. Preoperative oral pregabalin for anxiety control: a systematic review. *Clin Oral Investig.* 2020 Jul;24(7):2219-2228.
4. Aggarwal S, Ahuja V, Paul J. Dysregulation of GABAergic signalling contributes in the pathogenesis of diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Journal of Neurogastroenterology and Motility.* 2018, 24(3):422-430. doi: 10.5056/jnm17100
5. Strandwitz P, Kim KH, Terekhova D, Liu JK, Sharma A, Levering J, McDonald D, Dietrich D, Ramadhar TR, Lekbua A, Mroue N, Liston C, Stewart EJ, Dubin MJ, Zengler K, Knight R, Gilbert JA, Clardy J, Lewis K. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nat Microbiol.* 2019 Mar;4(3):396-403.
6. Yunes RA, Poluektova EU, Dyachkova MS, Klimina KM, Kovtun AS, Averina OV, Orlova VS, Danilenko VN. GABA production and structure of *gadB/gadC* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. *Anaerobe.* 2016, 42, 197–204
7. Altaib H, Nakamura K, Abe M, Badr Y, Yanase E, Nomura I, Suzuki T. Differences in the Concentration of the Fecal Neurotransmitters GABA and Glutamate Are Associated with Microbial Composition among Healthy Human Subjects. *Microorganisms.* 2021 Feb 13;9(2):378.
8. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res.* 2018, 1693, 128–133

9. Baj A, Moro E, Bistoletti M, Orlandi V, Crema F, Giaroni, C. Glutamatergic signaling along the microbiota-gut-brain axis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(6):1482. doi:10.3390/ijms20061482.
10. Raskov H, Burcharth J, Pommergaard H-C, Rosenberg J. Irritable bowel syndrome, the microbiota and the gut-brain axis. *Gut Microbes.* 2016, 7, 365–383.
11. Papalini S, Michels F, Kohn N, Wegman J, van Hemert S, Roelofs K, et al. Stress matters: randomized controlled trial on the effect of probiotics on neurocognition. *Neurobiol Stress.* 2019; 10: 100141.
12. Bagga D, Reichert JL, Koschutnig K, Aigner CS, Holzer P, Koskinen K, et al. Probiotics drive gut microbiome triggering emotional brain signatures. *Gut Microbes.* 2018; 9(6): 486–96.
13. Pinto-Sanchez MI, Hall GB, Ghajar K, Nardelli A, Bolino C, Lau JT, et al. Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: a pilot study in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2017; 153(2): 448–59.e8.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	Herstellungskennung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

Manual

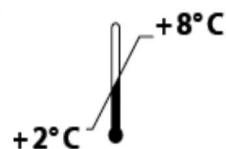
GABA ELISA

For the in vitro determination of GABA in stool

Valid from 2023-10-01



K 7009



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	19
2. INTRODUCTION	19
3. MATERIAL SUPPLIED	20
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	20
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	21
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	21
<i>Stability and storage of samples</i>	21
<i>Extraction of the stool samples</i>	22
<i>Dilution of samples</i>	23
7. ASSAY PROCEDURE	23
<i>Principle of the test</i>	23
<i>Derivatisation procedure</i>	23
<i>Test procedure</i>	24
8. RESULTS	25
9. LIMITATIONS	26
<i>Biotin interference</i>	26
10. QUALITY CONTROL	26
<i>Reference range</i>	27
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	27
<i>Accuracy – Precision</i>	27
<i>Accuracy – Trueness</i>	27
<i>Linearity</i>	28
<i>Analytical sensitivity</i>	29
<i>Analytical specificity</i>	29
12. PRECAUTIONS	30
13. TECHNICAL HINTS	30
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	30
15. REFERENCES	31

1. INTENDED USE

The GABA (stool) ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative detection of the concentration of free gamma-aminobutyric acid (GABA) in stool.

The assay is an *in vitro* diagnostic medical device and intended to be used by professional users in a laboratory environment. It can be performed manually or using an automated platform.

The test serves as an aid to diagnosis of a reduced GABA concentration in stool, which can be associated with gastrointestinal disorders.

2. INTRODUCTION

GABA (γ -aminobutyric acid) is an inhibitory neurotransmitter that regulates the perception of visceral pain by peripheral afferent neurons ^[1]. It is the most abundant inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) ^[2]. Decreased GABA signaling is known to be involved in the pathogenesis of numerous CNS disorders, and thus increasing GABAergic signaling is a known therapeutic target ^[3].

In the context of irritable bowel syndrome (IBS), Aggarwal et al. demonstrated that reduced GABA concentration and altered GABAergic signaling contribute to the pathogenesis of diarrhea-predominant IBS, potentially by alleviating inhibitory processes ^[4].

There is evidence from scientific research, that there may be a direct correlation of microbial GABA production and the effect of GABA in the CNS:

- It has been demonstrated that several species from the families Bifidobacteriaceae, Lactobacillaceae, among others can produce GABA ^[5]. In particular, some strains of Bifidobacterium exhibit the ability to produce GABA ^[6]. In addition, it has recently been shown that low fecal GABA levels in individuals are associated with a deficiency of bifidobacteria ^[7].
- Since the microbiota influences GABA levels in the gut, it is discussed that GABA signaling in the gut and CNS is also directly influenced by the microbiota ^[8;9].
- Hence, it is thought that deficient GABA signaling (e.g. induced by dysbiosis) may trigger IBS symptoms ^[10].

In summary, bacterial GABA-producing appears to have a significant impact on the microbiome-gut-brain axis. Probiotics containing GABA-producing bacteria lead to pain reduction in IBS patients and also to decreased IBS-associated depression symptoms ^[11;12;13].

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 7009	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0015	COPLATE	Plate for derivatisation	12 x 8 wells
K 7009	STD	Standards, ready-to-use (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 µg/ml)	2 x 6 x 500 µl
K 7009	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	2 x 500 µl
K 7009	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	2 x 500 µl
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
K 7999.100	IDK® Amino Extract	Extraction buffer <i>IDK® Amino Extract</i> , ready-to-use	1 x 100 ml
K 7009	AB	GABA antibody, peroxidase- labelled, ready-to-use	1 x 6 ml
K 7009	REABUF	Reaction buffer, ready-to-use	1 x 70 ml
K 7009	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	1 vial
K 0008.10	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 10 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2-8 °C for 1 month**.
- **DMSO** crystallises at 2-8 °C. Before use, bring to room temperature to dissolve the crystals.
- The **lyophilised derivatisation reagent (DER)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. Bring to room temperature before opening and dissolve the content of the vial in **DMSO** as stated on the label. Allow to dissolve for **15 min** and mix thoroughly with a vortex-mixer. The **derivatisation reagent** (reconstituted DER) can be stored at **2-8 °C for 2 months**. Bring to room temperature before reuse. Please note: DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Stability and storage of samples

Raw stool is stable for up to 3 days at room temperature. For longer storage keep frozen at -20 °C.

Stool extract is stable for 5 days at room temperature or for 7 days at 2-8°C. For longer storage keep frozen at -20 °C.

Extraction of the stool samples

We recommend using the **stool sample preparation system filled with IDK® Amino extract** (extraction buffer), **Cat No. K 7999**.

The extraction buffer IDK® Amino Extract is ready-to-use. We recommend the following sample preparation:

Stool sample tube – Instructions for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample used and the volume of the buffer:

Stool sample tube with 0.75 ml buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer volume (IDK® Amino Extract):	0.75 ml
Dilution factor:	1:50

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the stool sample tubes as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenization using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place the dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped of, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- c) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ~10 minutes improves the result.
- d) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution I: 1:50

Dilution of samples

Dilute the supernatant of the sample preparation procedure (dilution I) **1:2 with extraction buffer (IDK® Amino Extract)**. For example:

100 µl supernatant (dilution I) + **100 µl** IDK® Amino Extract, mix well
= **1:2 (dilution II)**. This results in a final dilution of **1:100**.

To **25 µl of dilution II** a derivatisation reagent is added (see derivatisation procedure).

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of GABA in stool. This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays.

The sample preparation includes the addition of a derivatisation reagent for GABA derivatisation. Afterwards, the treated samples and a peroxidase-conjugated polyclonal GABA antibody are incubated in wells of a microtiter plate coated with GABA derivative (tracer). During the incubation period, the target GABA in the sample competes with the tracer, immobilised on the wall of the microtiter wells, for the binding of the polyclonal antibodies.

After washing away the unbound components, tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The colour changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour is inverse proportional to the GABA concentration in the sample; this means, high GABA concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibody and lowers the photometric signal. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standards. GABA, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Derivatisation procedure

Bring **all reagents and samples to room temperature** (15-30 °C) and mix well.

Derivatisation of standards, controls and diluted stool samples is carried out in reaction vials (e.g. 1.5 ml polypropylene vials). Alternatively, the derivatisation can be carried out in the wells of the COPLATE.

We recommend preparing one derivatisation per standard, control and sample and transferring it in duplicate determinations into the wells of the microtiter plate.

1.	Add 25 µl standard (STD)/ control (CTRL)/ sample from dilution II into the respective vials, or into the wells of the COPLATE.
2.	Add 250 µl reaction buffer (REABUF) into each vial (STD, CTRL, sample), or into each well of the COPLATE.
3.	Add 50 µl derivatisation reagent into each vial (STD, CTRL, sample) and mix thoroughly by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate for 30 min at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker . <i>Alternatively:</i> Add 50 µl derivatisation reagent into each well (STD, CTRL, sample) of the COPLATE and incubate immediately on a horizontal shaker for 30 min at room temperature (15-30 °C).

2 x 50 µl of the derivatised standards, controls and samples are used in the ELISA as duplicates.

Test procedure

Mark the positions of standards/controls/samples in duplicate on a protocol sheet. Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from the kit. Store unused strips covered with foil at 2-8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

4.	For the analysis in duplicate take 2 x 50 µl of the derivatised standards/controls/ samples out of the vials, or the COPLATE, and add into the respective wells of the microtiter plate.
5.	Add 50 µl GABA antibody (AB) into each well of the microtiter plate.
6.	Cover the strips tightly with foil and incubate for 1 hour at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 12-18 min* at room temperature (15-30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.

- | | |
|-----|--|
| 11. | Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (690 nm) as a reference. |
|-----|--|

* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend to observe the colour change and to stop the reaction upon good differentiation.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. Attention should be paid to the following points:

Derivatisation of the samples is possible in 30 minutes on a horizontal shaker or, after thorough mixing, in 90 minutes without shaking in an automated processor. In automated processing, the volumes of samples and diluents may be scaled while maintaining the respective dilutions. Device-specific minimum and maximum volumes must be taken into account. The homogeneity of the resulting dilution must be ensured.

For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the 4 parameter algorithm.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the program used, the duplicate values should be evaluated manually.

Stool samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 100** (dilution I x dilution II) to get the actual concentrations.

In case another dilution factor has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range can be further diluted with extraction buffer (IDK® Amino Extract) and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

LoB see chapter "Performance Characteristics".

Biotin interference

Samples containing a biotin concentration of $\leq 13 \mu\text{g/ml}$ show a change of the results of $< 25 \%$. Higher concentrations of biotin can lead to false results. Patients taking $> 5 \text{ mg}$ biotin per day should wait at least 24 hours after taking biotin to have their samples collected. Results of patients taking biotin supplements or receiving a high-dose biotin therapy should generally be interpreted along with the total clinical picture.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control samples are outside of the acceptable limits.

Reference range

1 g stool is equivalent to 1 ml.

Based on in-house studies with samples of apparently healthy persons, a median of 27.4 µg/g was determined (n = 40). The 10th percentile was 13.6 µg/g, resulting in the following normal range:

GABA concentration in stool: > 13.6 µg/g

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 16

The repeatability was assessed with 5 samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

sample	mean value [µg/ml]	CV [%]
1	10.4	11.0
2	21.7	5.2
3	15.3	11.1
4	54.3	5.0
5	167.4	5.1

Reproducibility (Inter-Assay); n = 13

The reproducibility was assessed with 8 samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

sample	mean value [µg/ml]	CV [%]
1	52.3	5.2
2	155.4	5.4
3	10.2	10.3
4	20.7	6.9
5	16.1	7.7
6	59.6	4.3
7	278.8	6.7
8	520.1	8.0

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, high and low level

samples (spikes) were added to 4 different low level samples. The expected values result from the mean of sample and spike.

sample [µg/ml]	spike [µg/ml]	expected [µg/ml]	obtained [µg/ml]	recovery [%]
6.2	10.5	8.3	8.9	107.2
	20.3	13.2	12.3	93.2
	15.4	10.8	11.5	106.5
10.5	160.0	85.2	97.5	114.3
	64.8	37.7	40.6	107.8
	187.2	98.8	108.2	109.5
24.9	160.0	92.5	105.2	113.7
	64.8	44.9	51.4	114.4
	187.2	106.1	113.7	107.2
17.5	160.0	88.7	94.5	106.4
	64.8	41.2	38.5	93.5
	187.2	102.3	111.9	109.4

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed with a serial dilution of 3 extracted stool samples.

For GABA in stool, the method has been demonstrated to be linear from 6.9 to 160.6 µg/ml, showing a recovery rate of 88.7 - 119.4 % in this interval.

sample [µg/ml]	dilution	expected [µg/ml]	obtained [µg/ml]	recovery [%]
A	1:100		160.6	
	1:150	107.1	104.9	97.9
	1:200	80.3	80.2	99.9
	1:300	53.5	52.1	97.3
	1:400	40.2	42.4	105.6
	1:500	32.1	34.8	108.3
	1:600	26.8	29.2	108.9
	1:800	20.1	20.6	102.5

B	1:100		55.5	
	1:150	37.0	35.7	96.6
	1:200	27.7	27.0	97.5
	1:300	18.5	18.8	101.6
	1:400	13.9	13.7	98.9
	1:500	11.1	10.1	91.0
	1:600	9.2	11.0	119.4
	1:800	6.9	7.5	108.8
C	1:100		129.0	
	1:150	86.0	92.4	107.5
	1:200	64.5	65.7	101.9
	1:300	43.0	42.9	99.8
	1:400	32.2	33.3	103.2
	1:500	25.8	29.0	112.5
	1:600	21.5	21.9	101.9
	1:800	16.1	14.3	88.7

Analytical sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB 0.036 µg/ml

Limit of detection, LoD 0.047 µg/ml

Limit of quantitation, LoQ 0.050 µg/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to GABA. The specificity is calculated in percent in relation to the GABA-binding activity:

β-alanine	< 0.14 %
β -aminobutyric acid	no cross reactivity was observed
α-aminobutyric acid	no cross reactivity was observed
glycine	no cross reactivity was observed
glutamine	no cross reactivity was observed

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Kit reagents contain thimerosal or ProClin as bactericides. Thimerosal and ProClin are harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulfuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.

















- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK*[®] is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. de Leon AS, Tadi P. Biochemistry, Gamma Aminobutyric Acid. [Updated 2021 May 9]. *StatPearls Publishing*; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551683/>
2. Li K, Xu E. The role and the mechanism of gamma-aminobutyric acid during central nervous system development. *Neurosci. Bull.* 2008, 24, 195–200
3. Torres-González MI, Manzano-Moreno FJ, Vallecillo-Capilla MF, Olmedo-Gaya MV. Preoperative oral pregabalin for anxiety control: a systematic review. *Clin Oral Investig.* 2020 Jul;24(7):2219-2228.
4. Aggarwal S, Ahuja V, Paul J. Dysregulation of GABAergic signalling contributes in the pathogenesis of diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Journal of Neurogastroenterology and Motility.* 2018, 24(3):422-430. doi: 10.5056/jnm17100
5. Strandwitz P, Kim KH, Terekhova D, Liu JK, Sharma A, Levering J, McDonald D, Dietrich D, Ramadhar TR, Lekbua A, Mroue N, Liston C, Stewart EJ, Dubin MJ, Zengler K, Knight R, Gilbert JA, Clardy J, Lewis K. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nat Microbiol.* 2019 Mar;4(3):396-403.
6. Yunes RA, Poluektova EU, Dyachkova MS, Klimina KM, Kovtun AS, Averina OV, Orlova VS, Danilenko VN. GABA production and structure of gadB/gadC genes in Lactobacillus and Bifidobacterium strains from human microbiota. *Anaerobe.* 2016, 42, 197–204
7. Altaib H, Nakamura K, Abe M, Badr Y, Yanase E, Nomura I, Suzuki T. Differences in the Concentration of the Fecal Neurotransmitters GABA and Glutamate Are Associated with Microbial Composition among Healthy Human Subjects. *Microorganisms.* 2021 Feb 13;9(2):378.

8. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res.* 2018, 1693, 128–133
9. Baj A, Moro E, Bistoletti M, Orlandi V, Crema F, Giaroni, C. Glutamatergic signaling along the microbiota-gut-brain axis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(6):1482. doi:10.3390/ijms20061482.
10. Raskov H, Burcharth J, Pommergaard H-C, Rosenberg J. Irritable bowel syndrome, the microbiota and the gut-brain axis. *Gut Microbes.* 2016, 7, 365–383.
11. Papalini S, Michels F, Kohn N, Wegman J, van Hemert S, Roelofs K, et al. Stress matters: randomized controlled trial on the effect of probiotics on neurocognition. *Neurobiol Stress.* 2019; 10: 100141.
12. Bagga D, Reichert JL, Koschutnig K, Aigner CS, Holzer P, Koskinen K, et al. Probiotics drive gut microbiome triggering emotional brain signatures. *Gut Microbes.* 2018; 9(6): 486–96.
13. Pinto-Sanchez MI, Hall GB, Ghajar K, Nardelli A, Bolino C, Lau JT, et al. Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: a pilot study in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2017; 153(2): 448–59.e8.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin