

slgA1 ELISA Kit

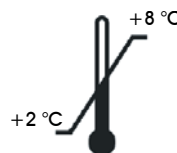
**Zur in vitro Bestimmung des Sekretorischen IgA1
in Speichel und Stuhl**

**For the in vitro determination of Secretory IgA1 in saliva and
stool**

Gültig ab / Valid from 07.05.2010



K 6863



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis/ Table of content	Seite/Page 2
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	6
STUHLPROBENEXTRAKTION	7
PROBENVERDÜNNUNG	8
9. TESTDURCHFÜHRUNG	9
HINWEISE	9
PIPPETTIERSHEMA	9
10. ERGEBNISSE	10
11. EINSCHRÄNKUNGEN	10
12. QUALITÄTSKONTROLLE	11
13. LITERATUR	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

TABLE OF CONTENT	PAGE
1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
7. PRECAUTIONS	17
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	18
EXTRACTION OF THE STOOL SAMPLE	18
DILUTION OF SAMPLES	20
9. ASSAY PROCEDURE	20
PROCEDURAL NOTES	20
TEST PROCEDURE	21
10. RESULTS	22
11. LIMITATIONS	22
12. QUALITY CONTROL	22
13. REFERENCES	23
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **sekretorischem IgA1** aus Speichel und Stuhl geeignet. Nur zur in vitro Diagnostik.

2. EINLEITUNG

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 propia 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 slgA versorgt und sind so gegenüber gastrointestinalen Infektionen passiv immunisiert.

Über die Konzentration des slgA im Stuhl können Rückschlüsse auf die körpereigene Abwehr der Darmschleimhäute getroffen werden. Ein Mangel an slgA deutet auf eine verminderte Aktivität des Mukosaimmunsystems hin, wohingegen erhöhte slgA-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 Atemwege, 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 den Atemwegen, dem oberen Verdauungstrakt und den Brustdrüsen
- Autoimmunerkrankungen

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des **sekretorischen IgA1** im Stuhl und Speichel. In diesem ELISA wird das sekretorische **IgA1** aus den Proben an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper (Schaaf anti human IgA1) gebunden. Während eines Waschschruttes werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes slgA1 wird mit Hilfe eines Peroxidase-markierten (Maus anti slgA1) Antikörpers detektiert. Dieser erkennt spezifisch das gebundene sekretorische IgA1. Über ein Antikörper-Peroxidase/TMB-System wird das slgA1 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.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6863MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 6863WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 6863K	CONJ	Konjugat, (Maus anti slgA1, Peroxidase-markiert)	1 x 200 µl
K 6863ST	STD	Standards, lyophilisiert (0; 3.3; 11; 33; 100 u)	2 x 5 vials
K 6863KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 vials
K 6863KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 vials
K 6863TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6863AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bei mehrfachem Ansatz der Platte ist bitte darauf zu achten, 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 (innerhalb des angegebenen Verfallsdatums) verwendet werden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in aqua bidest. verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C 1 Monat** (in einem geschlossenen Gefäß) haltbar.
- Die lyophilisierten **Standards** (STD) und **Kontrollen** (CTRL) müssen mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert werden. Um eine vollständige Lösung der rekonstituierten Standards zu gewährleisten müssen sie mindestens **10 min** bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen stehen bleiben. **Die rekonstituierten Standards und Kontrollen sind bei -20 °C** bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- Das **CONJ** (Konjugat; POD-markierter Antikörper) wird **1:101** in Waschpuffer verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei 2–8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.

- Alle Testreagenzien sind bei 2-8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Speichelproben

Um Schwankungen zu vermeiden, werden die Speichelproben immer zur gleichen Tageszeit abgenommen. 30 Minuten vor der Speichelentnahme sollte keine Nahrung oder Flüssigkeit aufgenommen werden. Die Speichelproben werden auf Eis gelagert und können gekühlt verschickt werden.

Zur Aufarbeitung werden die Speichelproben 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Es bilden sich drei Phasen (ein Sediment mit Überstand auf dem sich Schaum befindet). Die mittlere Phase wird abpipettiert und aliquotiert ohne das Sediment aufzuwirbeln. Die Proben können bei -20 °C gelagert werden.

Für den Test werden die **Speichelproben 1:2000** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 10 µl in 990 µl und daraus noch einmal 50 µl in 950 µl). Aus dieser Endverdünnung werden dann **100 µl** / Vertiefung eingesetzt.

Stuhlproben

Stuhlprobenextraktion

Der Waschpuffer wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

1. Es wird ein Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 745 804)) verwendet, das 100 mg dosiert. In diesem Stuhlaufarbeitungssystem wird die Stuhlprobe in 5 ml Puffer suspendiert.

Puffervolumen konstant: 5 ml

Verdünnungsfaktor konstant: 1:50

2. Alternativ kann eine Stuhlprobe im Bereich von 80 - 120 mg eingewogen werden. Exakte Menge von jeder Probe notieren!
 - a. Jede einzelne Probe wird in **5 ml** Puffer unabhängig von der eingewogenen Menge suspendiert.

Puffervolumen konstant: 5 ml

Der Verdünnungsfaktor ändert sich entsprechend der Einwaage. Er kann der folgenden Tabelle entnommen werden und muss bei der Auswertung berücksichtigt werden:

Einwaage [mg]	Verdünnungs- faktor
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
100	50

Einwaage [mg]	Verdünnungs- faktor
102	49.0
104	48.1
106	47.2
108	46.3
110	45.5
112	44.6
114	43.9
116	43.1
118	42.4
120	41.6

- b. **Die Puffermengen** für die einzelnen Proben variieren in Abhängigkeit von den Stuhleinwaagen (siehe Tabelle). Dabei bleibt der Verdünnungsfaktor konstant.

Puffervolumen variabel**Verdünnungsfaktor konstant: 1:50**

Somit kann der Verdünnungsfaktor für die Auswertung aller Proben einheitlich verwendet werden.

Einwaage [mg]	Puffervolumen [ml]
80	4.0
82	4.1
84	4.2
86	4.3
88	4.4
90	4.5
92	4.6
94	4.7
96	4.8
98	4.9
100	5.0

Einwaage [mg]	Puffervolumen [ml]
102	5.1
104	5.2
106	5.3
108	5.4
110	5.5
112	5.6
114	5.7
116	5.8
118	5.9
120	6.0

Anschließend wird die Stuhlprobe mit dem Puffer gut gemischt (z. B. Vortexer für mindestens 30 sec. je nach Stuhlkonsistenz).

Danach wird ca. 1 ml von der Suspension in ein verschließbares Einweggefäß (z. B. von Eppendorf) überführt und für 5 Minuten bei 13000 rpm ($\approx$ 13000 g) zentrifugiert.

Die Stuhlsuspension ist nicht haltbar. Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen.

Probenverdünnung**Stuhlproben**

Der Überstand nach der Zentrifugation wird **1:250 mit Waschpuffer** verdünnt.

Zum Beispiel:

40 µl Überstand + **960 µl** Waschpuffer, mischen (**Verdünnung I**) (**1:25**)

100 µl Verdünnung I + **900 µl** Waschpuffer, mischen (**Verdünnung II**) (**1:10**)

100 µl der **Verdünnung II** werden im Test eingesetzt.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer, nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Pippettierschema

Die vorbeschichtete PLATE (Mikrotiterplatte) vor Gebrauch **5x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. PLATE (Mikrotiterplatte) nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der PLATE (Mikrotiterplatte) in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl** STD (Standards), CTRL (Kontrollen) und vorverdünnte Patientenproben in die jeweilige Vertiefung pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. Inhalt der Platte verwerfen, die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen.
4. **100 µl** CONJ (Konjugat) in jede Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Inhalt der Platte verwerfen, die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen.
7. **100 µl** SUB (TMB-Substrat) zugeben.
8. **5 - 15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis eine ausreichend große Farbdifferenz auftritt.
9. **50 µl** STOP (Stopplösung) zusetzen und kurz mischen.
10. Die Extinktion wird **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) gemessen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

Speichelproben

Die ermittelte Speichelkonzentration wird mit **2000** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Stuhlproben

- 1. Endverdünnungsfaktor 1:12500** ergibt sich wenn in Verdünnungsstufe 1 der konstante Verdünnungsfaktor 50 beträgt:

Verdünnungsstufe 1: 50
Verdünnungsstufe 2: 250
Endverdünnungsfaktor: $50 \times 250 = 12500$

- 2. Endverdünnungsfaktor 1: 15625** ergibt sich bei einer Probeneinwaage von 80 mg und Puffervolumen 5ml in der Verdünnungsstufe 1:

Einwaage: 80 mg (1ml Stuhl = 1g) = 0,08 ml
Verdünnungsstufe 1: $5\text{ml} / 0,08\text{ml} = 62,5$
Verdünnungsstufe 2: 250
Endverdünnungsfaktor: $62,5 \times 250 = 15625$

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **15625** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen. Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer slgA1 Konzentration größer dem größten Standard sollten mit Waschpuffer verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

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

13. LITERATUR

slgA

Beckmann G; Rüffer A; Sonnenschein B (1997) Stuhluntersuchungen: Lesen aus dem Kaffeesatz oder wertvolles diagnostisches Werkzeug? - Einige kritische Anmerkungen zur Sinnhaftigkeit und Aussagekraft. *Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren* **38(2)**: 88-100

Brandtzaeg P (1981) Transport models for secretory IgA and secretory IgM. *Clin Exp Immunol*. May; **44(2)**: 221-32

Brandtzaeg P, Johansen FE (2005) Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev*. Aug; **206**: 32-63. Review

Burnett D, Crocker J, Stockley RA. (1987) Cells containing IgA subclasses in bronchi of subjects with and without chronic obstructive lung disease. *J Clin Pathol*. Oct; **40(10)**: 1217-20

Corthésy B and Spertini F (1999) Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol. Chem*. Nov; **380**: 1251–1262

Hein M, Petersen A C, Helmig Rb, Uldbjerg N, Reinholdt J (2005) Immunoglobulin levels and phagocytes in the cervical mucus plug at term of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. **84**: 734–742

Hocini H, Iscaki S, Bouvet JP, Kazatchkine MD, Bélec L (2000) An ELISA method to measure total and specific human secretory IgA subclasses based on selective degradation by IgA1-protease. *J Immunol Methods*. Feb 21; **235(1-2)**: 53-60

Kitz R, Ahrens P, Zielen S (2000) Immunoglobulin levels in bronchoalveolar lavage fluid of children with chronic chest disease. *Pediatric Pulmonology* **29**:443–451

Könönen E, Jousimies-Somer H, Bryk A, Kilpi T, Kilian M (2002) Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *J. Med. Microbiol*. **51**: 23-730

Majkowska-Skrobek G, Augustyniak D, Jankowski A (2003) Assessment of IgA subclasses synthesis in children with selective and partial IgA deficiency. *Centr Eur J Immunol* **28(3)**: 110–118

Mestecky J, Russell MW, Elson CO (1999) Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface intestinal. *Gut* **44**: 2-5

Rose MA, Schubert R, Schmitt-Grohe S, Reichenbach J, Zielen S (2006) Immunoglobulins and inflammatory cytokines in nasal secretions in humoral immunodeficiencies. *Laryngoscope* **116**: 239–244

Rüssmann H, Lissner R, Schmidt H, Karch H (1999) IgA/IgM and secretory immunity. *Sepsis* **3**: 219–224

slgA1

Brandtzaeg P, Johansen FE (2005) Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev.* Aug; **206**: 32-63. Review

Cole Mf, Bryan S, Evans MK, Pearce CL, Sheridan MJ, Sura, PA, Wientzen R, Bowden GHW (1998) Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants:

Kirkeby L, Rasmussen TT, Reinholdt J, Kilian M (2000) Immunoglobulins in nasal secretions of healthy humans: Structural integrity of secretory immunoglobulin A1 (IgA1) and occurrence of neutralizing antibodies to IgA1 proteases of nasal bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Jan.; p. 31–39

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.

- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik 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 zurück zu senden.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Hersteller		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		

Manual

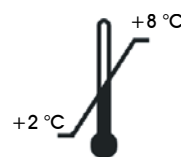
slgA1 ELISA Kit

For the in vitro determination of Secretory IgA1 in saliva and stool

Valid from 07.05.2010



K 6863



1. INTENDED USE

The Immundiagnostik Assay is intended for the quantitative determination of **secretory IgA1 (slgA1)** in saliva and stool. For in vitro diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Secretory IgA (slgA) consists of two IgA monomers joined by the J-chain and an additional secretory component. It is secreted in plasma cells located in the lamina propria of mucosal membranes. Synthesis of slgA is independent from the synthesis of serum IgA. This means that lack of serum IgA does not necessarily correlate with a lack of slgA1. Secretory IgA is the major immunoglobulin in saliva, tears, colostrum, nasal mucous, mother's milk, tracheobronchial and gastrointestinal secretions. It plays a major role in preventing adherence of microorganisms to mucosal sites, in activation of the alternative complement pathway and in activating inflammatory reactions. Newborns are provided with slgA by mother's milk and are passively immunized against gastrointestinal infections.

The human IgA exists in two isotypic forms: IgA1 and IgA2, which differ both in their primary amino acid sequences and carbohydrate structures. The distribution of the two IgA subclasses in secretions is dependent on the mucosal site: IgA1-secreting cells predominate in the respiratory tract, in the upper gastrointestinal tract and in mammary glands (60–93%), whereas IgA2-secreting cells predominate in the lower gastrointestinal and in the female reproductive tracts.

Indications

- Proof of an imbalanced immunological barrier on the respiratory tract, the upper gastrointestinal tract and the mammary glands
- Autoimmune disease

3. PRINCIPLE OF THE TEST

In a first incubation step, the slgA1 in the samples is bound to polyclonal rabbit antibodies (in excess), which are immobilized to the surface of the microtiter wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a Peroxidase-labeled mouse anti-slga1 conjugate is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, Tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stop solution is then added to stop the reaction. The color converts from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of secretory IgA1 in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using results obtained from the

calibrators. Secretory IgA1, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 6863MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6863WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 6863K	CONJ	Conjugate (mouse anti-slgA1, Peroxidase-labeled)	1 x 200 µl
K 6863ST	STD	Calibrators, lyophilized (0; 3.3; 11; 33; 100 u)	2 x 5 vials
K 6863KO1	CTRL	Control, lyophilized	2 vials
K 6863KO2	CTRL	Control, lyophilized	2 vials
K 6863TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 6863AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- The **ELISA WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua dest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.). Crystals could occur due to high salt concentration. The crystals must be resuspended **before dilution of the buffer solutions** using a water bath (37°C). The buffer concentrate is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted solutions can be stored at 2-8°C for 1 month.
- The **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 µl aqua bidest.** Allow the vial content to dissolve for **10 minutes** and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls are stable at -20 °C** until the expiry date stated on the label.
- The **CONJ** (conjugate; POD-labeled antibody) must be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The undiluted conjugate is stable at 2-8 °C until the expiry date stated on the label. Diluted conjugate is not stable and can not be stored.
- All other test reagents are ready for use. The test reagents are stable up to the date of expiry (see label of test package) when stored at **2 – 8 °C**.

7. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Saliva

To avoid variation in slgA1 content, take saliva samples always at the same time of the day.

No food or liquid should be consumed 30 min before sample collection. Centrifuge the samples at 3000 rpm for 10 min. Sample supernatant can be stored at -20°C. For analysis, the supernatant is diluted **1:2000** in ELISA wash buffer (10 µl supernatant + 1 ml wash buffer; dilute the obtained solution again: 50 µl diluted supernatant + 950 µl wash buffer. Use **100 µl** of the final dilution per well).

Faeces

Extraction of the stool sample

The **wash buffer** is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

1. We recommend the use of a stool sample preparation kit for dosing 100 mg of stool sample (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; cat # 745804). The stool sample has to be suspended in 5 ml buffer.

Constant buffer volume: 5 ml

Constant dilution factor: 1:50

2. Alternatively, stool samples can be manually weighted within a range of 80 – 120 mg. Please note the exact sample amount!
 - a. Add **5 ml** buffer to the stool sample independent from the sample amount.

Constant buffer volume: 5 ml

The dilution factor varies depending on the sample amount which must be considered in the subsequent calculations as shown below:

Weight [mg]	Dilution factor
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
100	50

Weight [mg]	Dilution factor
102	49.0
104	48.1
106	47.2
108	46.3
110	45.5
112	44.6
114	43.9
116	43.1
118	42.4
120	41.6

- b. **The buffer volume** for the individual samples varies depending on the sample amount (see table). The dilution factor remains constant.

Variable buffer volume

Constant dilution factor: 1:50

Therefore, the same dilution factor can be used for all samples in the subsequent evaluation of the results.

Weight [mg]	Buffer Volume [ml]
80	4.0
82	4.1
84	4.2
86	4.3
88	4.4
90	4.5
92	4.6
94	4.7
96	4.8
98	4.9
100	5.0

Weight [mg]	Buffer Volume [ml]
102	5.1
104	5.2
106	5.3
108	5.4
110	5.5
112	5.6
114	5.7
116	5.8
118	5.9
120	6.0

Afterwards, mix stool sample and buffer; vortex for at least 30 sec. depending on the stool consistency.

Transfer approx. 1 ml stool suspension to an Eppendorf-tube and centrifuge for 5 minutes at 13000 rpm ($\cong$ 13000 g).

The supernatant is not stable and can not be stored. We recommend to weight fresh sample amount for a new assay, if the analysis should be repeated.

Dilution of samples

Stool samples

After centrifugation, the supernatant is diluted **1:250 in wash buffer**.

For example:

40µl supernatant + **960 µl** wash buffer, mix well (**dilution I**) (**1:25**)

100 µl of this dilution I + **900µl** wash buffer, mix well (**dilution II**) (**1:10**)

For analysis, pipette **100 µl** of **dilution step II** solution per well.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Quality control guidelines should be followed.
- 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 wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Wash the precoated PLATE (microtiter plate) 5 x with 250 µl ELISA wash buffer. Carry out the tests in duplicate.

1. Add **100 µl** STD (standards), CTRL (controls) and patient samples (faeces and saliva diluted, see above).
2. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
3. Aspirate and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer.
4. Add **100 µl** CONJ (conjugate; POD antibody).
5. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
6. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** wash buffer.
7. Add **100 µl** SUB (TMB substrate).
8. Incubate for **5-15 minutes** at room temperature.
9. Add **50 µl** STOP (ELISA stop solution) and mix shortly.
10. Determine absorption with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as reference.

10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the calibrators. Commercially available software can be used as well as graph paper. Results of the samples are read from this calibration curve.

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a spline- or 4PL algorithm is recommended.

Saliva

For the calculation of the saliva values, the results from the microplate reader must be multiplied by **2.000**.

Faeces

1. A **final dilution factor of 1:12500** results for a constant dilution factor 50 in dilution step 1:

Dilution step 1: 50

Dilution step 2: 250

Final dilution factor: $50 \times 250 = 12500$

2. A **final dilution factor of 1: 15625** results for a sample weight of 80 mg and a buffer volume of 5ml in dilution step 1:

Weight: 80 mg (1ml stool = 1g) = 0,08 ml

Dilution step 1: $5\text{ml} / 0,08\text{ml} = 62,5$

Dilution step 2: 250

Final dilution factor: $62,5 \times 250 = 15625$

Multiply the result by **15625** to obtain the sample concentration. The dilution factor depends on the weight of the faeces.

11. LIMITATIONS

Samples with slgA1 levels greater than the highest calibrator, should be diluted and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of commercial control samples for internal quality control.

Control samples should be analyzed 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 sample are outside the acceptable limits.

13. REFERENCES

slgA

Beckmann G; Rüffer A; Sonnenschein B (1997) Stuhluntersuchungen: Lesen aus dem Kaffeesatz oder wertvolles diagnostisches Werkzeug? - Einige kritische Anmerkungen zur Sinnhaftigkeit und Aussagekraft. *Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren* **38(2)**: 88-100

Brandtzaeg P (1981) Transport models for secretory IgA and secretory IgM. *Clin Exp Immunol*. May; **44(2)**: 221-32

Brandtzaeg P, Johansen FE (2005) Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev*. Aug; **206**: 32-63. Review

Burnett D, Crocker J, Stockley RA. (1987) Cells containing IgA subclasses in bronchi of subjects with and without chronic obstructive lung disease. *J Clin Pathol*. Oct; **40(10)**: 1217-20

Corthésy B and Spertini F (1999) Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol. Chem*. Nov; **380**: 1251–1262

Hein M, Petersen A C, Helmig Rb, Uldbjerg N, Reinholdt J (2005) Immunoglobulin levels and phagocytes in the cervical mucus plug at term of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. **84**: 734–742

Hocini H, Iscaki S, Bouvet JP, Kazatchkine MD, Bélec L (2000) An ELISA method to measure total and specific human secretory IgA subclasses based on selective degradation by IgA1-protease. *J Immunol Methods*. Feb 21; **235(1-2)**: 53-60

Kitz R, Ahrens P, Zielen S (2000) Immunoglobulin levels in bronchoalveolar lavage fluid of children with chronic chest disease. *Pediatric Pulmonology* **29**:443–451

Könönen E, Jousimies-Somer H, Bryk A, Kilpi T, Kilian M (2002) Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *J. Med. Microbiol*. **51**: 23-730

Majkowska-Skrobek G, Augustyniak D, Jankowski A (2003) Assessment of IgA subclasses synthesis in children with selective and partial IgA deficiency. *Centr Eur J Immunol* **28(3)**: 110–118

Mestecky J, Russell MW, Elson CO (1999) Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface intestinal. *Gut* **44**: 2-5

Rose MA, Schubert R, Schmitt-Grohe S, Reichenbach J, Zielen S (2006) Immunoglobulins and inflammatory cytokines in nasal secretions in humoral immunodeficiencies. *Laryngoscope* **116**: 239–244

Rüssmann H, Lissner R, Schmidt H, Karch H (1999) IgA/IgM and secretory immunity. Sepsis **3**: 219–224

sIgA1

Brandtzaeg P, Johansen FE (2005) Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. Immunol Rev. Aug; **206**: 32-63. Review

Cole Mf, Bryan S, Evans MK, Pearce CL, Sheridan MJ, Sura, PA, Wientzen R, Bowden GHW (1998) Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants:

Kirkeby L, Rasmussen TT, Reinholdt J, Kilian M (2000) Immunoglobulins in nasal secretions of healthy humans: Structural integrity of secretory immunoglobulin A1 (IgA1) and occurrence of neutralizing antibodies to IgA1 proteases of nasal bacteria. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Jan.; p. 31–39

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- For in vitro diagnostic use only.
- Quality control guidelines should be followed.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Do not mix different lot numbers of any kit component.

- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number