Arbeitsanleitung/Manual

sIgA ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung des Sekretorischen IgA in Speichel und Stuhl

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

Gültig ab / Valid from 03.08.2011

REF **K 8870**

Σ 96

+ 8 °C
+ 2 °C

IVD

CE

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/ Seite/Page
Table of content 2

1. VERWENDUNGSZWECK 3

2. EINLEITUNG 3

3. TESTPRINZIP 3

4. INHALT DER TESTPACKUNG 4

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL 4

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN 5

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN 5

8. PROBENVORBEREITUNG 6

STUHLPROBENEXTRAKTION 6

STUHLPROBENVERDÜNNUNG 7

9. TESTDURCHFÜHRUNG 8

HINWEISE 8

PIPPETTIERSCHEMA 8

10. ERGEBNISSE 9

11. EINSCHRÄNKUNGEN 10

12. QUALITÄTSKONTROLLE 10

ERWARTETE ERGEBNISSE 10

13. TESTCHARAKTERISTIKA 11

PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT 11

WIEDERFINDUNG 12

SENSITIVITÄT 12

KREUZREAKTIVITÄTEN 13

LINEARITÄT 13

14. LITERATUR 13

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST 15

TABLE OF CONTENT **PAGE**

1. INTENDED USE **18**

2. INTRODUCTION **18**

3. PRINCIPLE OF THE TEST **18**

4. MATERIAL SUPPLIED **19**

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED **19**

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS **20**

7. PRECAUTIONS **20**

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION **21**

EXTRACTION OF STOOL SAMPLES 21

DILUTION OF STOOL SAMPLES 22

9. ASSAY PROCEDURE **22**

PROCEDURAL NOTES 22

TEST PROCEDURE 23

10. RESULTS **24**

11. LIMITATIONS **24**

12. QUALITY CONTROL **25**

EXPECTED VALUES 25

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS **25**

PRECISION AND REPRODUCIBILITY 25

RECOVERY 26

SENSITIVITY 26

CROSS REACTIVITY 27

SAMPLE DILUTION 27

14. REFERENCES **27**

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE **29**

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **sekretorischem IgA** 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 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.

Indikationen

- Nachweis einer gestörten immunologischen Barriere an der Darmschleimhaut
- Autoimmunerkrankungen

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des **sekretorischen IgA** im Stuhl und Speichel. 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 Peroxidase-markierten (Maus anti sIgA) Antikörpers detektiert. Dieser erkennt spezifisch das gebundene sekretorische IgA. Über ein 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.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 8870MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 8870WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 8870K	CONJ	Konjugat, (Maus anti sIgA, Peroxidase-markiert)	1 x 200 µl
K 8870ST	STD	Standards, lyophilisiert (0; 22.2; 66.6; 200; 600 ng/ml)	2 x 5 vials
K 8870KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 8870KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 8870TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8870AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- 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

*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).

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 Reinstwasser verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser. 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** Reinstwasser 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 und können bis zu **2-mal eingefroren und wieder aufgetaut** werden.
- 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 mit Hilfe von Salivetten gesammelt. Zur Aufarbeitung werden die Speichelproben 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert.

Für den Test werden die **Speichelüberstände 1:2000** in Waschpuffer verdünnt,

z.B. 10 µl Speichelüberstand + 990 µl Waschpuffer und daraus noch einmal, 50 µl verdünnten Speichelüberstand + 950 µl Waschpuffer.

Aus dieser Endverdünnung werden dann **100 µl** / Vertiefung eingesetzt.

Stuhlprobenextraktion

1a. Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlröhrchen - Anwendung

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

SAS mit 0,75 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	0,75 ml
Verdünnungsfaktor:	1:50

Als Extraktionspuffer wird Waschpuffer verwendet.

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS 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) Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **0,75 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!

c) 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.

d) Das Röhrchen solange mischen 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.

e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.

f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens (türkiser 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.

1b. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim (Best. Nr. 10 745 804 322)

Alternativ kann ein anderes Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Proben-vorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet werden. Bei dem Roche Probenvorbereitungssystem werden 100 mg Stuhlprobe in 5 ml Extraktionspuffer mit Hilfe eines Vibrationsmischers (z. B. Vortex) homogenisiert. Anschließendes Zentrifugieren wird empfohlen.

Verdünnungsfaktor (1a. oder 1b.): 1:50

Stuhlprobenverdünnung

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

Zum Beispiel:
40µl Überstand + **960 µl** Waschpuffer, mischen (**Verdünnung I) (1:25**)
100 µl Verdünnung I + **900µl** 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. **10 - 20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis eine ausreichend große Farbdifferenz auftritt.

9. **50 µl** STOP (Stopplösung) zusetzen und kurz mischen.

10. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von **450 nm** messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards **(STD)** den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von **405 nm** wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

10. 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 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).

   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.

Speichelproben

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

Stuhlproben

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

Verdünnungsstufe 1:	50
Verdünnungsstufe 2:	250
Endverdünnungsfaktor:	50 x 250 = 12500

11. EINSCHRÄNKUNGEN

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

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen 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.

Erwartete Ergebnisse

Normbereich

Sekretorisches IgA im Speichel
(mit Hilfe von Salivetten gesammelt)

Kinder (n=37)	18 - 237µg/ml (Mittelwert 128 µg/ml)*
Alter > 16 Jahre (n=33)	102 - 471 µg/ml

Sekretorisches IgA im Stuhl	510 - 2040 µg/ml (n = 76)

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

*Hofman LF, Le T (2002) Preliminary pediatric reference range for secretory IgA in saliva using an enzyme immunoassay. *Clinical Chemistry* **48 (6):**A169, Suppl.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden 20 mal in einem sIgA ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 20

Probe	sIgA [ng/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	77.7	5
2	92.5	9

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im sIgA ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 20

Probe	sIgA [ng/ml]	Inter-Assay Vk [%]
1	102.4	8
2	1277.4	7.4

Wiederfindung

Zwei sIgA Proben wurden mit unterschiedlichen Spikes gemessen. Die Proben wurden nach der Probenaufarbeitung gespikt.

Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	sIgA Erwartet [ng/ml]	sIgA Gemessen [ng/ml]
103.7	150	253.7	279.7
103.7	75	178.7	194.7
103.7	50	153.7	158.7
103.7	25	128.7	141.2
100.3	150	250.3	272.4
100.3	75	175.3	212.9
100.3	50	150.3	165.4
100.3	25	125.3	126.5

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als B_0 + 2 SD. Gemessen wurde 20 mal der Standard Null im sIgA ELISA.

Nachweisgrenze n=20

Probe	sIgA Mittelwert [OD]	Standard-abweichung	Nachweis-grenze [ng/ml]
1	0.171	0.099	13.4

Kreuzreaktivitäten

Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu anderen Plasmaproteinen im Stuhl und Saliva gefunden.

Linearität

Zwei Proben unterschiedlicher Konzentration wurden auf Verdünnungsgerechtigkeit überprüft. Als Verdünnungsmedium wurde Waschpuffer eingesetzt.

Linearität n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	unverdünnt	126.8	126.8
	1:2	63.4	65.5
	1:4	31.7	35.1
	1:8	15.9	25.6
B	unverdünnt	184.9	184.9
	1:2	92.5	93.7
	1:4	46.2	52.1
	1:8	23.1	21.9

14. LITERATUR

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

Publikationen mit dem Immundiagnostik sIgA-ELISA

Hofman LF, Le T (2002) Preliminary pediatric reference range for secretory IgA in saliva using an enzyme immunoassay. *Clin Chem* Vol **48(6)** Suppl A169

Noel N, Levinson U, Ho J, Lee S (2001) Measurement of secretory IgA in fecal samples preserved with PBS/0.02% thimerosal. Abstract P 155 *Clin Chem* Vol **47 (6)**, Suppl A47

Martin M (1999) Diagnostik bei latent-entzündlichen Darmschleimhautveränderungen. *PRAXIS-telegramm* **1:** 17-21

Martin M (1998) Diagnostik chronisch entzündlicher Erkrankungen des Darms. *PRAXIS-telegramm* **6:** 16-18

Martin M (1998) Diagnostik zivilisationsbedingter Erkrankungen im Kindesalter. *PRAXIS-telegramm* **3-4:** 15-17

Schütz B, Poschwatta-Rupp S, Rusch K, Zimmermann K (1998) Das KyberPlus-Konzept. Diagnostische Verfahren zur Abklärung unklarer intestinaler Beschwerden. *Biologische Medizin* **27(1):** 31-36

15. 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

REF Bestellnummer

IVD In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

Hersteller

Verwendbar bis

LOT Chargenbezeichnung

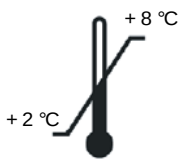
Manual

sIgA ELISA Kit

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

Valid from 03.08.2011

K 8870



1. INTENDED USE

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

2. INTRODUCTION

Secretory IgA (sIgA) 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 propia of mucosal membranes. Synthesis of sIgA is independent from the synthesis of serum IgA. This means that lack of serum IgA does not necessarily correlate with a lack of sIgA1. Secretory IgA is the major immunoglobulin in saliva, tears, colostrum, nasal mucous, mother's milk, tracheobronchial and gastrointestinal secretes. 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 sIgA by mother's milk and are passively immunized against gastrointestinal infections.

Indications

- Proof of an imbalanced immunological barrier on the intestinal mucosa
- Autoimmune disease

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of **secretory IgA** in stool and saliva. In a first incubation step, the sIgA in the samples is bound to polyclonal antibodies (rabbit anti human IgA), 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 conjugate (mouse anti-sIgA) is added which recognizes specifically the bound secretory IgA. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, Tetramethyl-benzidine (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 IgA. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the results obtained from the calibrators. Secretory IgA in the patient samples is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 8870MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 8870WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 8870K	CONJ	Conjugate (mouse anti-sIgA, Peroxidase-labeled)	1 x 200 µl
K 8870ST	STD	Calibrators, lyophilized (0; 22.2; 66.6; 200; 600 ng/ml)	2 x 5 vials
K 8870KO1	CTRL	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K 8870KO2	CTRL	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K 8870TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 8870AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- 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

*Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure 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).

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 ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water). 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** (control) must be reconstituted with **500 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for **10 minutes** and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and control are stable at -20 °C** until the expiry date stated on the label and can be subjected to a **maximum of two freeze-thaw cycles**.
- 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 sIgA content, take saliva samples always at the same time of the day. No food or liquid should be consumed 30 min before sample collection. Collect saliva samples using salivettes and centrifuge at 3000 rpm for 10 min.

For analysis, the **saliva supernatant** is diluted **1:2000** in ELISA wash buffer, e.g.:

10 µl saliva supernatant + 990 µl wash buffer; dilute the obtained solution again: 50 µl diluted saliva supernatant + 950 µl wash buffer.

Use **100 µl** of the final dilution per well.

Extraction of stool samples

1a. Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instruction for use

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

SAS with 0.75 ml Buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	0.75 ml
Dilution Factor:	1:50

Wash buffer is used as extraction buffer.

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

a) The raw Stool Sample has to be thawed. For remarkably inhomogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
b) **Fill the empty sample tube** with **0.75 ml** of ready-to-use extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert yellow dipstick into sample. The lower part of the dipstick exhibits notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off and leave 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.

d) 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 app. 10 minutes improves the result.
e) Allow sample to stand for app. 10 minutes until sediment has settled down. Floating material like shells of grains can be neglected.
f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the turquoise ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure, the sediment will not be dispersed again.

1b. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany (Cat. No. 10 745 804 322)
Alternatively, other stool sample preparation kits (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) can be used. In the Roche sample preparation kit, 100 mg of stool sample are suspended in 5 ml of extraction buffer using a vibrator mixer (e.g. Vortex mixer). Centrifugation of the suspension is recommended.

Dilution Factor (1a. or 1b.): 1:50

Dilution of 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 pre-coated 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 **10-20 minutes** at room temperature.
9. Add **50 µl** STOP (ELISA stop solution) and mix shortly.
10. Determine **absorption** immediately with an ELISA reader at **450 nm**. If the highest extinction of the standards **(STD)** is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

10. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use 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 calibrator 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 logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.001).

   The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Saliva

For the calculation of the saliva values, the results from the microplate reader must be multiplied by **2000**.

Faeces

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 x 250 = 12500

11. LIMITATIONS

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

12. 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.

Expected values

Normal range

Secretory IgA in saliva
(saliva samples collected using salivettes)

Children (n=37)	18 - 237µg/ml (mean 128 µg/ml)*
Age >16 years (n=33)	102 - 471 µg/ml

Secretory IgA in faeces	510 - 2040 µg/ml (n = 76)

It is recommended for each laboratory to establish its own normal range.

*Hofman LF, Le T (2002) Preliminary pediatric reference range for secretory IgA in saliva using an enzyme immunoassay. *Clinical Chemistry* **48 (6):**A169, Suppl.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik anti-sIgA ELISA test was calculated from 20 replicate determinations on each of one samples.

Intra-Assay CV n= 20

Sample	sIgA [ng/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	77.7	5
2	92.5	9

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik anti-sIgA ELISA test was calculated from data on 2 samples obtained in 20 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of three months.

Inter-Assay CV n= 20

Sample	sIgA [ng/ml]	Inter-Assay CV [%]
1	102.4	8
2	1277.4	7.4

Recovery

Two samples were spiked with sIgA calibrator and measured with this assay.

Recovery n=2

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	sIgA Expected [ng/ml]	sIgA Measured [ng/ml]
103.7	150	253.7	279.7
103.7	75	178.7	194.7
103.7	50	153.7	158.7
103.7	25	128.7	141.2
100.3	150	250.3	272.4
100.3	75	175.3	212.9
100.3	50	150.3	165.4
100.3	25	125.3	126.5

Sensitivity

n=20

Sample	sIgA Mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [ng/ml]
1	0.171	0.099	13.4

Cross reactivity

No cross reactivity to other proteins in stool and saliva.

Sample dilution

Linearity n= 2

Two patient samples were diluted with ELISA wash buffer. The results are shown below:

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
A	undiluted	126.8	126.8
	1:2	63.4	65.5
	1:4	31.7	35.1
	1:8	15.9	25.6
B	undiluted	184.9	184.9
	1:2	92.5	93.7
	1:4	46.2	52.1
	1:8	23.1	21.9

14. REFERENCES

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

Publications based on Immundiagnostik´s sIgA ELISA

Hofman LF, Le T (2002) Preliminary pediatric reference range for secretory IgA in saliva using an enzyme immunoassay. *Clin Chem* Vol **48(6)** Suppl A169

Noel N, Levinson U, Ho J, Lee S (2001) Measurement of secretory IgA in fecal samples preserved with PBS/0.02% thimerosal. Abstract P 155 *Clin Chem* Vol **47 (6)**, Suppl A47

Martin M (1999) Diagnostik bei latent-entzündlichen Darmschleimhautveränderungen. *PRAXIS-telegramm* **1:** 17-21

Martin M (1998) Diagnostik chronisch entzündlicher Erkrankungen des Darms. *PRAXIS-telegramm* **6:** 16-18

Martin M (1998) Diagnostik zivilisationsbedingter Erkrankungen im Kindesalter. *PRAXIS-telegramm* **3-4:** 15-17

Schütz B, Poschwatta-Rupp S, Rusch K, Zimmermann K (1998) Das KyberPlus-Konzept. Diagnostische Verfahren zur Abklärung unklarer intestinaler Beschwerden. *Biologische Medizin* **27(1):** 31-36

15. 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

REF Catalogue Number

IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

Contains sufficient for <n> tests

Manufacturer

Use by

LOT Lot number