

slgA ELISA Kit

***Zur in-vitro-Bestimmung des sekretorischen IgA
in Speichel und Stuhl***

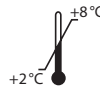
***For the in vitro determination of secretory IgA
in saliva and stool***

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Gültig ab / Valid from 02.09.2014

REF K 8870



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

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Speichelproben</i>	4
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<i>Stuhlprobenverdünnung</i>	6
<i>Stabilität der Stuhlproben</i>	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Spezifität</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	13
<i>Allgemeine Literatur</i>	13
<i>Literatur mit Verwendung des Immundiagnostik slgA ELISAs</i>	13

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, gastrointestinalen Sekreten, 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..

Indikationen

- Nachweis einer gestörten immunologischen Barriere an der Darmschleimhaut
- Autoimmunerkrankungen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 8870MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 8870WP	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 8870K	CONJ	Konjugatkonzentrat, (Maus-anti-slgA, 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

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 8870KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 8870TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8870AC	STOP	ELISA-Stoppplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8870EP	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x	2 x 100 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- 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 in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mi-

schen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Das **Extraktionspufferkonzentrat *IDK Extract***[®] muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 150 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Extraktionspufferkonzentrat *IDK Extract***[®] kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Extraktionspuffer) ist bei **2–8°C drei Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **lyophilisierten STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen unter gelegentlichem Mischen 10 Minuten stehen gelassen. **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 **Konjugatkonzentrat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das Konzentrat ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

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 Salvetten 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 = **Verdünnung I** (1:100)

50 µl Verdünnung I + 950 µl Waschpuffer = **Verdünnung II** (1:20)

Endverdünnung: 1:2000

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

Stuhlprobenextraktion

Der **verdünnte Extraktionspuffer *IDK Extract***® wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

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 1,5 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	1,5 ml
Verdünnungsfaktor:	1:100

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer *IDK Extract*® **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- Röhrchen aufschrauben (orangefarbenes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstecken in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- 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 (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnung I 1:100

Stuhlprobenverdünnung

Der Überstand (Verdünnung I) wird **1:125 mit Waschpuffer** weiterverdünnt.

Zum Beispiel:

40 µl Verdünnung I + **960 µl** Waschpuffer (mischen) = **Verdünnung II** (1:25)

200 µl Verdünnung II + **800 µl** Waschpuffer (mischen) = **Verdünnung III** (1:5)

Endverdünnung: 1:12500

100 µl der Verdünnung III werden im Test eingesetzt.

Stabilität der Stuhlproben

Die **Probenstabilität** ist wie folgt:

Rohstuhl: 24 Stunden bei 4°C, 8 Wochen bei -20°C

Stuhlextrakt (1:100): 1 Tag bei Raumtemperatur (15–30°C), 7 Tage bei 2–8°C, oder 7 Tage bei -20°C, maximal 2 Einfrier-/Auftauzyklen

7. TESTDURCHFÜHRUNG

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 Waschschruttes werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes slgA wird mit Hilfe eines Peroxidase-markierten (Maus-anti-slgA) Antikörpers detektiert. Dieser erkennt spezifisch das gebundene sekretorische IgA. Über ein Antikörper-Peroxidase/TMB-System wird das slgA schließlich detektiert. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Ana-

lytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Eine Standardkurve wird erstellt, aus der die Konzentrationen ermittelt werden.

Pipettierschema

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

Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen . Die PLATE (Mikrotiterplatte) nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.
2.	100 µl STD (Standards), CTRL (Kontrollen) und vorverdünnte Patientenproben in die jeweilige Vertiefung pipettieren.
3.	1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.
4.	Inhalt der Platte verwerfen, die Vertiefungen 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen, danach auf saugfähigem Papier ausschlagen.
5.	100 µl verdünntes CONJ (Konjugat) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Platte verwerfen, die Vertiefungen 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen, danach auf saugfähigem Papier ausschlagen.
8.	100 µl SUB (TMB-Substrat) zugeben.
9.	10–20 Minuten* im Dunkeln bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren, bis eine ausreichend große Farbdifferenz auftritt.
10.	100 µl STOP (Stopplösung) zusetzen und kurz 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 Farbschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

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.

Speichelproben

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

Stuhlproben

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit dem Verdünnungsfaktor **12500** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs müssen 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:

$$\text{Nachweisgrenze} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik 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 die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Sekretorisches IgA im Speichel (mit Hilfe von Salivetten gesammelt)

Kinder (n=37) 18–237 µg/ml (Mittelwert 128 µg/ml)*

Alter > 16 Jahre (n=33) 102–471 µg/ml

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

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

* Ergebnis einer laborinternen Studie

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

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

Probe	slgA [ng/ml]	VK [%]
1	77,7	5
2	92,5	9

Inter-Assay (n = 20)

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

Probe	slgA [ng/ml]	VK [%]
1	102,4	8
2	1277,4	7,4

Spike-Wiederfindung

Zwei slgA Proben wurden mit unterschiedlichen Spikes gemessen. Die Proben wurden nach der Probenaufarbeitung gespikt (n = 2).

Probe	Ungespikte Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	slgA erwartet [ng/ml]	slgA gemessen [ng/ml]
A	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
B	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

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben unterschiedlicher Konzentration wurden auf Verdünnungsgerechtigkeit überprüft. Als Verdünnungsmedium wurde Waschpuffer eingesetzt (n = 2).

Probe	Verdünnung	slgA erwartet [ng/ml]	slgA 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

Probe	Verdünnung	slgA erwartet [ng/ml]	slgA gemessen [ng/ml]
B	unverdünnt	184.9	184.9
	1:2	92.5	93.7
	1:4	46.2	52.1
	1:8	23.1	21.9

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 13,4 ng/ml.

Spezifität

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

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- 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.

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 Mindesthaltbarkeitsdatums 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 im 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.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina 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

Allgemeine Literatur

1. Brandtzaeg, P., 2010. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. *Current opinion in gastroenterology*, **26**(6), pp.554–63.
2. Corthésy, B., 2012. Autoimmunity Reviews Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis. *Autoimmunity Reviews*.

Literatur mit Verwendung des Immundiagnostik slgA ELISAs

3. Kalach, N. et al., 2013. Intestinal permeability and fecal eosinophil-derived neurotoxin are the best diagnosis tools for digestive non-IgE-mediated cow's milk allergy in toddlers. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, **51**(2), pp.351–61.
4. Kaur, R. et al., 2012. Antibody in middle ear fluid of children originates predominantly from sera and nasopharyngeal secretions. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, **19**(10), pp.1593–6.
5. Kabeerdoss, J. et al., 2011. Effect of yoghurt containing Bifidobacterium lactis Bb12® on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutrition journal*, **10**(1), p.138.
6. Senol, A. et al., 2011. Effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*, **22**(1), pp.18–26.
7. Chalkias, A. et al., 2011. Patients with colorectal cancer are characterized by increased concentration of fecal hb-hp complex, myeloperoxidase, and secretory IgA. *American journal of clinical oncology*, **34**(6), pp.561–6.
8. Mohan, R. et al., 2008. Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. *Pediatric research*, **64**(4), pp.418–22.
9. Hofman, L. & Le, T., 2002. Preliminary pediatric reference range for secretory IgA in saliva using an enzyme immunoassay. *Clinical Chemistry*, **48**(6, Supplement), p.A169-70.

zuwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer

*In-Vitro*-Diagnostikum

Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Chargenbezeichnung



Verwendbar bis

Manual

slgA ELISA Kit

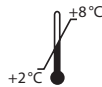
***For the in vitro determination of secretory IgA
in saliva and stool***

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Valid from 02.09.2014

REF **K 8870**



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

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
<i>Saliva</i>	19
<i>Extraction of the stool samples</i>	19
<i>Dilution of stool samples</i>	20
<i>Stability of stool samples</i>	20
7. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Spiking Recovery</i>	24
<i>Dilution recovery</i>	25
<i>Analytical Sensitivity</i>	25
<i>Specificity</i>	25
12. PRECAUTIONS	26
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	27
<i>General literature</i>	27
<i>Literature using the Immundiagnostik slgA ELISA</i>	27

1. INTENDED USE

This 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 propria 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 sIgA. Secretory IgA is the major immunoglobulin in saliva, tears, colostrum, nasal mucus, 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. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 8870MTP	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 8870WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 8870K	CONJ	Conjugate concentrate (mouse anti-sIgA, peroxidase-labeled)	1 x 200 µl
K 8870ST	STD	Standards, 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
K 8870EP	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract®</i> , 2,5x	2 x 100 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* 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).

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. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- The **extraction buffer concentrate** *IDK Extract*[®] must be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml concentrate + 150 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals must be redissolved at 37 °C in a water bath. The **extraction buffer concentrate** *IDK Extract*[®] is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** (extraction buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for three months**.
- The **lyophilized standards** (STD) and **controls** (CTRL) must be reconstituted with **500 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 mi-

minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure 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 **conjugate concentrate** (CONJ) must be diluted **1:101 in wash buffer** (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The concentrate is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Saliva

To avoid variation in slgA 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 = **dilution I** (1:100)

50 µl dilution I + **950 µl** wash buffer = **dilution II** (1:20)

Final dilution: 1:2000

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

Extraction of the stool samples

Diluted extraction buffer IDK Extract® is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

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

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.

SAS with 1.5 ml extraction buffer:

Applied amount of stool: 15 mg

Buffer Volume: 1.5 ml

Dilution Factor: 1:100

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 particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty sample tube** with **1.5 ml** of ready to use *IDK Extract*[®] extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (orange part of cap) to open. Insert the orange 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 dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 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 ~ 10 minutes improves the result.
- e) 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: 1:100

Dilution of stool samples

The supernatant of the sample preparation procedure (dilution I) is further diluted **1:125 in wash buffer**. For example:

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

200 µl dilution II + **800 µl** wash buffer (mix well) = **dilution III** (1:5)

Final dilution: 1:12500

For analysis, pipet **100 µl of dilution III** per well.

Stability of stool samples

The **sample stability** is as follows:

Raw stool: 24 hours at 4 °C, 8 weeks at -20 °C

Stool extracts (1:100): 1 day at room temperature (15–30°C), 7 days at 2–8°C or 7 days at -20°C; maximum 2 freeze-thaw cycles

7. ASSAY PROCEDURE

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 slgA 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-slga) 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, 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 IgA. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the results obtained from the standards. Secretory IgA in the patient samples is determined directly from this curve.

Test procedure

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

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips covered at 2–8°C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash the pre-coated microtiter plate 5 x with 250 µl ELISA wash buffer before use . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be tapped on absorbent paper.
2.	Add 100 µl STD (standards), CTRL (controls) and diluted patient samples into respective wells.
3.	Incubate for 1 hour shaking on a horizontal mixer at room temperature (15–30°C).
4.	Aspirate and wash the wells 5 x with 250 µl ELISA wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be tapped on absorbent paper.

5.	Add 100 µl diluted CONJ (conjugate).
6.	Incubate for 1 hour shaking on a horizontal mixer at room temperature (15–30 °C).
7.	Aspirate and wash the wells 5 x with 250 µl ELISA wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be tapped on absorbent paper.
8.	Add 100 µl SUB (TMB substrate).
9.	Incubate for 10–20 minutes* in the dark at room temperature (15–30 °C).
10.	Add 100 µl STOP (ELISA stop solution) and mix shortly.
last	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 as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

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 the optical density and a logarithmic abscissa for the 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 the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the 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 programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Saliva

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

Stool

For the calculation of the stool values, the results from the microplate reader must be multiplied by the dilution factor of **12500**.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater 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:

detection limit × sample dilution factor to be used

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik 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 sample are outside the acceptable limits.

Reference range

Secretory IgA in saliva (saliva samples collected using salivettes)

Children (n=37) 18 - 237 µg/ml (mean 128 µg/ml)*

Age >16 years (n=33) 102 - 471 µg/ml

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

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

* Based on Immundiagnostik studies of stool samples of apparently healthy persons

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

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

Sample	slgA [ng/ml]	CV [%]
1	77.7	5
2	92.5	9

Inter-Assay (n = 20)

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik anti-slgA 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.

Sample	slgA [ng/ml]	CV [%]
1	102.4	8
2	1277.4	7.4

Spiking Recovery

Two samples were spiked with slgA calibrator and measured with this assay (n = 2).

Sample	Unspiked Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	slgA expected [ng/ml]	slgA measured [ng/ml]
A	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

Sample	Unspiked Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	slgA expected [ng/ml]	slgA measured [ng/ml]
B	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

Dilution recovery

Two patient samples were diluted with ELISA wash buffer. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	slgA expected [ng/ml]	slgA 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

Analytical Sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 13.4 ng/ml.

Specificity

No cross reactivity to other proteins in stool and saliva.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are 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.
- Kit reagents contain sodium azide or Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric 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 breath 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 analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on 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 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.

- 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

General literature

1. Brandtzaeg, P., 2010. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. *Current opinion in gastroenterology*, **26**(6), pp.554–63.
2. Corthésy, B., 2012. Autoimmunity Reviews Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis. *Autoimmunity Reviews*.

Literature using the Immundiagnostik slgA ELISA

3. Kalach, N. et al., 2013. Intestinal permeability and fecal eosinophil-derived neurotoxin are the best diagnosis tools for digestive non-IgE-mediated cow's milk allergy in toddlers. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, **51**(2), pp.351–61.
4. Kaur, R. et al., 2012. Antibody in middle ear fluid of children originates predominantly from sera and nasopharyngeal secretions. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, **19**(10), pp.1593–6.
5. Kabeerdoss, J. et al., 2011. Effect of yoghurt containing Bifidobacterium lactis Bb12® on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutrition journal*, **10**(1), p.138.
6. Senol, A. et al., 2011. Effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*, **22**(1), pp.18–26.
7. Chalkias, A. et al., 2011. Patients with colorectal cancer are characterized by increased concentration of fecal hb-hp complex, myeloperoxidase, and secretory IgA. *American journal of clinical oncology*, **34**(6), pp.561–6.
8. Mohan, R. et al., 2008. Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants.

Pediatric research, **64**(4), pp.418–22.

9. Hofman, L. & Le, T., 2002. Preliminary pediatric reference range for secretory IgA in saliva using an enzyme immunoassay. *Clinical Chemistry*, **48**(6, Supplement), p.A169-70.

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