

# slgA ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung des Sekretorischen IgA in Saliva und Stuhl*

# slgA ELISA Kit

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

Gültig ab/valid from 14.07.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 8870

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C



Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of content	2
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>4</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>4</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>5</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN</b>	<b>6</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>6</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>7</b>
HINWEISE	7
PIPPETTIERSCHEMA	8
<b>10. ERGEBNISSE</b>	<b>9</b>
MUSTEREICHKURVE	9
<b>11. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>10</b>
<b>12. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>10</b>
ERWARTETE ERGEBNISSE	10
<b>13. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>11</b>
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	11
WIEDERFINDUNG	12
SENSITIVITÄT	12
KREUZREAKTIVITÄTEN	13
LINEARITÄT	13
<b>14. LITERATUR</b>	<b>13</b>
<b>15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>14</b>

Table of content	Page
<b>1. INTENDED USE</b>	<b>16</b>
<b>2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST</b>	<b>16</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>18</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>19</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>19</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>20</b>
PROCEDURAL NOTES	20
TEST PROCEDURE	20
<b>10. RESULTS</b>	<b>22</b>
TYPICAL CALIBRATION CURVE	22
<b>11. LIMITATIONS</b>	<b>23</b>
<b>12. QUALITY CONTROL</b>	<b>23</b>
EXPECTED VALUES	23
<b>13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>24</b>
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	24
RECOVERY	25
SENSITIVITY	26
CROSS REACTIVITY	26
SAMPLE DILUTION	26
<b>14. REFERENCES</b>	<b>26</b>
<b>15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>27</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **sekretorischem IgA** aus Sputum 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 propria der Schleimhäute gelegenen Plasmazellen gebildet und kommt in Körpersekreten wie Speichel, Tränen, Nasenschleim, Tracheobronchialschleim, gastrointestinale Sekrete, Muttermilch und Kolostrum vor.

Die Bildung des sekretorischen IgA erfolgt unabhängig von der Serum-IgA Synthese. Somit bedeutet ein Mangel an Serum-IgA nicht zwangsläufig ein Fehlen von sekretorischem IgA.

Das Neugeborene und der Säugling werden über die Muttermilch mit sIgA versorgt und sind so gegenüber gastrointestinalen Infektionen passiv immunisiert.

Über die Konzentration des sIgA im Stuhl können Rückschlüsse auf die körpereigene Abwehr der Darmschleimhäute getroffen werden. Ein Mangel an sIgA deutet auf eine verminderte Aktivität des Mukosaimmunsystems hin, wohingegen erhöhte sIgA-Werte auf erhöhte Aktivität und somit auf eine lokale Entzündung der Darmschleimhaut hinweisen.

### 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 Waschschrilles werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes slgA wird mit Hilfe eines Peroxidase-markierten (Kaninchen 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 Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Eine Standardkurve wird erstellt, aus der die Konzentrationen ermittelt werden.

### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
K 8870MTP	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 8870WP	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 8870K	POD Antikörper, (Kaninchen anti slgA, Peroxidase-markiert), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8870ST	Standards, lyophilisiert (1ml) (0; 22.2; 66.6; 200; 600 ng/ml)	5 x 1 ml
K 8870Ko	Kontrolle, lyophilisiert	1 x 1 ml
K 8870TMB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8870AC	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

## 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes oder deionisiertes Wasser
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000  $\mu\text{l}$
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 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** (z.B. peroxidase-markierter Antikörper ist in der größten Verdünnungsstufe nicht haltbar). Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen (innerhalb des angegebenen Verfallsdatums) verwendet werden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** 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 und Kontrolle** müssen mit **1000  $\mu\text{l}$**  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 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- 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  $-20\text{ °C}$  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

Ca. **100 mg** Stuhl genau einwiegen und in **5 ml** des Waschpuffers lösen (sehr gut mischen) und die eingewogene Stuhlmenge notieren. Danach wird die Suspension für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wird abgenommen, in ein Eppendorfröhrchen überführt und ein weiteres Mal in einer Eppendorfszentrifuge bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand ist bei -20°C für ca. einen Monat haltbar.

Der Überstand wird vor jedem Testansatz für **2 Minuten** bei 13000 rpm in der Eppendorfszentrifuge anzentrifugiert. Danach wird der Überstand **1:250** im Waschpuffer weiterverdünnt (z.B. 4 µl Überstand + 996 µl Waschpuffer). Von dieser Endverdünnung werden dann **100 µl** in den Test eingesetzt.

Zur einfacheren Dosierung und Homogenisierung des Probenmaterials empfehlen wir das Probenvorbereitungssystem der der Fa. Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 745804).

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Hinweise*

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumen 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.

### *Pipettierschema*

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

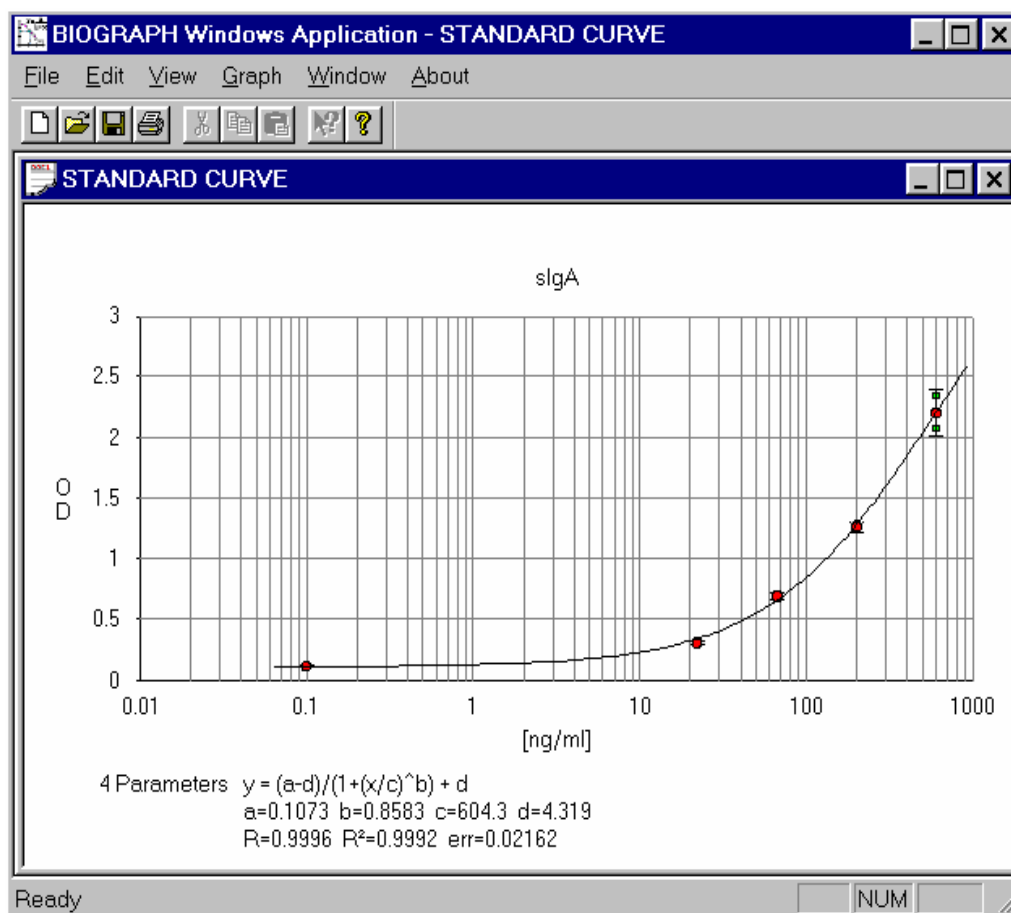
Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl** Standards, Kontrolle 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** POD-Antikörper 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** TMB-Substratlösung zugeben.
8. **5 - 15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis eine ausreichend große Farbdifferenz auftritt.
9. **50 µl** 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.

### Mustereichkurve



Konzentration [ng/ml]	600	200	66.6	22.2	0
OD Mittelwert	2.209	1.268	0.692	0.310	0.118

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Assays verwendet werden.

**Stuhlproben:**

Die ermittelte sIgA Konzentration der Stuhlprobe wird wie im folgendem Beispiel berechnet:

Einwaage: 80 mg (1ml Stuhl = 1g) = 0,08 ml

Verdünnungsstufe 1: 5ml / 0,08ml = 62,5

Verdünnungsstufe 2: 250

Verdünnungsfaktor: 62,5 x 250 = 15625

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

**Speichelproben:**

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

**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 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.

*Erwartete Ergebnisse***Normbereich:**

Sekretorisches IgA im Speichel 102-471 µg/ml (n=33)  
Alter > 16 Jahre

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

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

### 13. TESTCHARAKTERISTIKA

#### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

Es wird die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Meßserie geprüft. Zwei Normalproben wurden 20 mal in einem slgA ELISA von einer Person angesetzt.

Tabelle1: Intra-Assay VK n= 20

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

Es wird die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen geprüft. Zwei Normalproben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im slgA ELISA gemessen.

Tabelle 2: Inter-Assay VK n= 20

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

### Wiederfindung

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

Tabelle 3: Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	slgA Erwartet [ng/ml]	slgA 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  $B_0 + 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 20 mal der Standard Null von einer Person im slgA ELISA.

Tabelle 5: Nachweisgrenze n=20

Probe	slgA Mittelwert [OD]	Standard-abweichung	Nachweisgrenze [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.

Tabelle 4: 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

- 1.Brandtzaeg P., 1981; *Clin. Exp. Immunol.* 44, 221-231
- 2.Schütz, B., 1998, *Biol Med*, 27(1):31-6
- 3.Sonnenschein et al. 1997, *Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren* 38, 2

## 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 Humansenen verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden 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.

# slgA ELISA Kit

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

Gültig ab/valid from 10.10.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 8870

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C



## 1. INTENDED USE

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

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Secretory IgA (slgA) consists of two IgA monomers joined by the J-chain and furthermore a secretory component. It is secreted in plasma cells based in the lamina propria of mucosal membranes. Synthesis of slgA is independent from the synthesis of serum IgA. This means lack of serum IgA does not necessarily mean a lack of slgA. 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 slgA by mother's milk and are passively immunized against gastrointestinal infections.

### Indication

- Activity of the mucosa immune system (MIS)
- Proof of an imbalanced immunological barrier on the intestinal mucosa
- Autoimmune disease

### 3. PRINCIPLE OF THE TEST

In a first incubation step, the slgA in the samples is bound to polyclonal rabbit antibodies (in excess), which are immobilized to the surface of the microtitre wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a Peroxidase-labelled anti-slGA (POD-Antibody) antibody (polyclonal) 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 IgA 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 IgA, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

### 4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Kit Components	Quantity
K 8870MTP	one holder with precoated strips	12 x 8
K 8870WP	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 8870K	POD antibody, (polyclonal anti-slGA, Peroxidase-labeled), ready-to-use	1 x 15 ml
K 8870ST	Calibrators, lyophilized (0; 22.2; 66.6; 200; 600 ng/ml)	5 x 1 ml
K 8870KO	Control, lyophilized	1 x 1ml
K 8870TMB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 8870AC	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 7 ml

## 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Deionized or bidistilled water
- Precision pipettes calibrated to deliver 10-1000  $\mu$ l
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Horizontal mixer
- Vortex-Mixer
- Microplate reader 450 nm

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, please make sure that the reagents are carefully stored as mentioned. Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.
- The **ELISA wash buffer concentrate** should be diluted with aqua dest. **1:10** before use (add 900 ml aqua bidest. to 100 ml concentrate). Crystals could occur due to high salt concentration. The crystals have to be resuspended **before dilution of the buffer solutions** using a water bath (37°C). The buffer concentrates are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted solutions could be stored at 2-8°C for 1 month.
- The **calibrators and control** have to be reconstituted with **1000  $\mu$ l aqua bidest.** Allow the vial to stand for **10 minutes** and then mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Reconstituted calibrator and control are stable at 2-8 °C until the expiry date stated on the label.
- 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.
- The calibrators and controls contain human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HCV or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- The stop solution consists of diluted Sulfuric Acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breath vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### Saliva

To avoid variation we recommend to collect the sputum sample always at the same time of the day.

30 min before collection no food or liquid should be consumed. The samples are centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Take the supernatant and dilute **1:2000** in ELISA wash buffer (add 10 µl in 1 ml and dilute this solution once more 50 µl in 1 ml - **100 µl** of this working solution is used).

### Faeces

Give about **100 mg** of the sample (please note the real weight for the calculation) to **5 ml** of the ELISA wash buffer and mix. Centrifuge the diluted sample for 10 min at 3000 rpm. 1 ml supernatant is given into an eppendorf tube and centrifuged once more at 13.000 rpm for 5 min. The resulting supernatant could be stored at -20°C for about 1 month.

After thawing, the supernatant is centrifuged at 13.000 rpm for 2 min. Afterwards the supernatant is diluted **1:250** in ELISA wash buffer (4µl supernatant is added to 996 µl ELISA wash buffer). **100 µl** of this solution is used for the assay.

Immundiagnostik recommends the use of the sample tubes from Roche Diagnostics (Cat.-No. 745804) for sample preparation.

## 9. ASSAY PROCEDURE

### *Procedural notes*

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage.
- Carry out the assay with the actual manual delivered with the kit.

### *Test procedure*

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

1. Add **100 µl** calibrators, control and patient samples (faeces and sputum 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** Peroxidase-labelled anti-slgA 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** TMB substrate solution.
8. Incubate for **5-10 minutes** at room temperature.

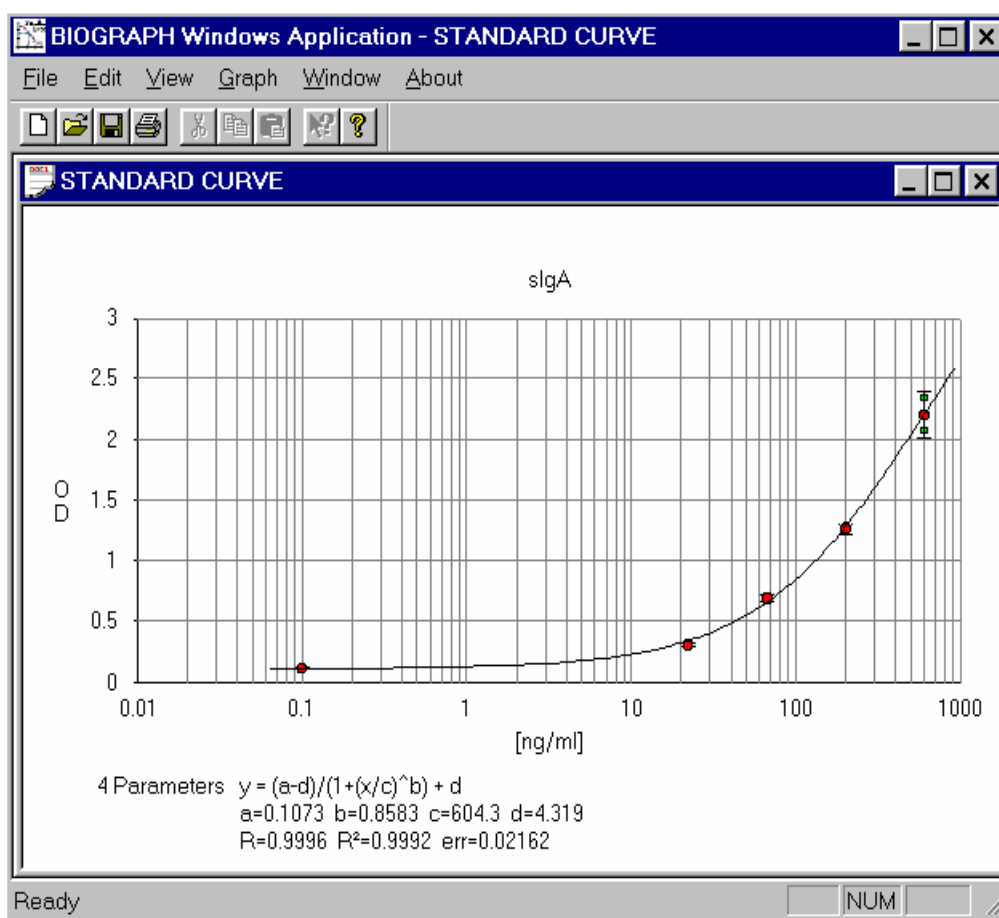
9. Add **50 µl** stop solution and mix shortly.
10. Determine absorption with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption 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.

### *Typical calibration curve*



Concentration [ng/ml]	600	200	66.6	22.2	0
OD mean value	2.209	1.286	0.692	0.310	0.118

These data are for demonstration only and cannot be used instead of data obtained from the actual assay.

## Saliva

For the calculation of the saliva values the results from the microplate reader has to be multiplied with **2.000**.

## Faeces

For the sIgA concentration of faeces samples, calculate as described in the following example:

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

dilution step 1: 5ml / 0,08ml = 62,5

dilution step 2: 250

dilution factor: 62,5 x 250 = 15625

Multiply the result with **15625** to get the real concentration. The dilution factor depends on the weight of the faeces.

## 11. LIMITATIONS

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

## 12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercial control samples for internal quality control.

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

### *Expected values*

Secretory IgA (saliva) 102-471 µg/ml  
(Age >16 years)

Secretory IgA (faeces): 510-2040 µg/ml

### 13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

#### *Precision and reproducibility*

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

Intra-Assay CV n= 20

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

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.

Inter-Assay CV n= 20

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

### Recovery

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

Recovery n=2

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	slgA Expected [ng/ml]	slgA 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	slgA 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**

1. Brandtzaeg, P.: 1981; Clin. Exp. Immunol. 44, 221
2. Schütz, B.: 1998; Biol. Med. 27 (1), 31
3. Sonnenschein et al.: 1997; Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren. 38, 2

## 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.
- The test components which are made of human serum are tested for Australia antigen and HIV and found to be negative. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. The normal precautions for laboratory working should be observed.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for in-vitro diagnostics only.
- The reagents should not be used after the date of expiry (see label on the test package).
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.

10.10.2005 slgA\_10.10.2005.DOC