

IDK[®] sIgA ELISA

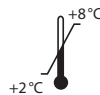
*Zur in-vitro-Bestimmung des sekretorischen IgA
in Speichel und Stuhl*

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

Gültig ab / Valid from 2017-11-28

REF **K 8870**

Σ 96



REF **K 8870.20**

Σ 20 x 96



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

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 | 5 |
| <i>Probenstabilität</i> | 5 |
| <i>Speichelproben</i> | 5 |
| <i>Stuhlprobenextraktion</i> | 5 |
| <i>Stuhlprobenverdünnung</i> | 6 |
| 7. TESTDURCHFÜHRUNG | 7 |
| <i>Testprinzip</i> | 7 |
| <i>Pipettierschema</i> | 7 |
| 8. ERGEBNISSE | 8 |
| 9. EINSCHRÄNKUNGEN | 9 |
| 10. QUALITÄTSKONTROLLE | 9 |
| <i>Referenzwerte</i> | 10 |
| 11. TESTCHARAKTERISTIKA | 10 |
| <i>Wiederfindung in der Verdünnung</i> | 10 |
| <i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i> | 11 |
| <i>Spike-Wiederfindung</i> | 11 |
| <i>Analytische Sensitivität</i> | 12 |
| <i>Spezifität</i> | 12 |
| 12. VORSICHTSMASSNAHMEN | 12 |
| 13. TECHNISCHE MERKMALE | 12 |
| 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 13 |
| 15. LITERATUR | 13 |
| <i>Allgemeine Literatur</i> | 13 |
| <i>Literatur mit Verwendung des Immundiagnostik IDK® slgA ELISAs</i> | 14 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von sekretorischem IgA (slgA) 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 IgA1. 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

| Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge für Art.-Nr. | |
|-------------|--|------------------------|-----------------------------|
| | | K 8870 | K 8870.20 |
| PLATE | Mikrotitermodul, vorbeschichtet | 12 x 8 Vertiefungen | 20 x 12 x 8 Vertiefungen |
| WASHBUF | Waschpufferkonzentrat, 10x | 2 x 100 ml | 40 x 100 ml |
| CONJ | Konjugatkonzentrat, peroxidasemarkiert (Maus-anti-slgA) | 1 x 200 µl | 15 x 200 µl |

| | | | |
|-----------------|---|-------------|--------------|
| STD | Standards, lyophilisiert (0; 22.2; 66.6; 200; 600 ng/ml) | 2 x 5 vials | 25 x 5 vials |
| CTRL1 | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 2 x 1 vial | 25 x 1 vial |
| CTRL2 | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 2 x 1 vial | 25 x 1 vial |
| SUB | Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig | 1 x 15 ml | 20 x 15 ml |
| STOP | Stopplösung, gebrauchsfertig | 1 x 15 ml | 20 x 15 ml |
| IDK Extract® | Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x | 2 x 100 ml | 10 x 100 ml |

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- 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 auf dem Etikett angegeben 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 an-zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASH-BUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **IDK Extract®** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract®*) ist **4 Monate bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **sind bei -20 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar und können bis zu 2-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenstabilität

Die **Probenstabilität** ist wie folgt:

Rohstuhl: 2 Tage bei Raumtemperatur (15–30°C), 2 Tage bei 2–8°C oder 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

Speichelproben: 1 Tag bei 2–8°C, 4 Wochen bei -20°C

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 mithilfe von Salivetten gesammelt. Zur Aufarbeitung werden die Speichelproben 10 min bei 3000 g zentrifugiert.

Für den Test werden die **Speichelüberstände 1:2 000 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: 1:2 000

100 µl der **Verdünnung II** werden im Test pro 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:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*[®]) **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 Stuhlprobenröhrchens (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 pro Vertiefung eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser 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 mithilfe 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 Farbintensität ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8°C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

| | |
|----|--|
| 1. | Die Vertiefungen vor Gebrauch 5x mit je 250µl Waschpuffer waschen . Nach dem letzten Waschschrut Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 2. | Je 100µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die Mikrotiterstreifen pipettieren. |
| 3. | Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln* inkubieren. |

| | |
|-----|--|
| 4. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 5. | 100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren |
| 6. | Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren. |
| 7. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 8. | 100 µl Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren. |
| 9. | 10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren. |
| 10. | 100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen. |
| 11. | Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden. |

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag 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 ermittelten Ergebnisse müssen mit dem Verdünnungsfaktor **2 000** multipliziert werden, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Stuhlproben

Die ermittelten Ergebnisse müssen mit dem Verdünnungsfaktor **12 500** multipliziert werden, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) 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:

Nachweisgrenze × *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

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 |
| B | unverdünnt | 184,9 | 184,9 |
| | 1:2 | 92,5 | 93,7 |
| | 1:4 | 46,2 | 52,1 |
| | 1:8 | 23,1 | 21,9 |

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden 20-mal im *IDK*® 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 *IDK*® slgA ELISA gemessen.

| Probe | slgA [ng/ml] | VK [%] |
|-------|--------------|--------|
| 1 | 102,4 | 8,0 |
| 2 | 1277,4 | 7,4 |

Spike-Wiederfindung

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

| Probe | Ungespikete 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 |

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 auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK*[®] und *IDK Extract*[®] sind Marken der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR











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 IDK® 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.
10. 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.

Verwendete Symbole:

| | | | |
|---|-----------------------|---|--------------------------------------|
|  | Temperaturbegrenzung |  | Bestellnummer |
|  | In-Vitro-Diagnostikum |  | Zu verwenden mit |
|  | Hersteller |  | Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen |
|  | Chargenbezeichnung |  | Verwendbar bis |
|  | Achtung |  | Gebrauchsanweisung beachten |

IDK[®] sIgA ELISA

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

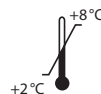
Valid from 2017-11-28

REF K 8870

Σ 96

REF K 8870.20

Σ 20 x 96



IVD



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

| | |
|---|-----------|
| 1. INTENDED USE | 19 |
| 2. INTRODUCTION | 19 |
| 3. MATERIAL SUPPLIED | 19 |
| 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 20 |
| 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS | 20 |
| 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES | 21 |
| <i>Sample stability</i> | 21 |
| <i>Saliva</i> | 21 |
| <i>Extraction of the stool samples</i> | 22 |
| <i>Dilution of stool samples</i> | 23 |
| 7. ASSAY PROCEDURE | 23 |
| <i>Principle of the test</i> | 23 |
| <i>Test procedure</i> | 24 |
| 8. RESULTS | 25 |
| 9. LIMITATIONS | 26 |
| 10. QUALITY CONTROL | 26 |
| <i>Reference range</i> | 26 |
| 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 26 |
| <i>Spiking Recovery</i> | 26 |
| <i>Precision and reproducibility</i> | 27 |
| <i>Dilution recovery</i> | 27 |
| <i>Analytical Sensitivity</i> | 28 |
| <i>Specificity</i> | 28 |
| 12. PRECAUTIONS | 28 |
| 13. TECHNICAL HINTS | 29 |
| 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE | 29 |
| 15. REFERENCES | 29 |
| <i>General literature</i> | 29 |
| <i>Literature using the Immundiagnostik IDK® slgA ELISA</i> | 30 |

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay 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 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 immunised against gastrointestinal infections.

Indications

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

3. MATERIAL SUPPLIED

| Label | Kit components | Quantity for cat. no. | |
|---------|---|-----------------------|----------------------|
| | | K 8870 | K 8870.20 |
| PLATE | Microtiter plate, pre-coated | 12 x 8 wells | 20 x 12 x 8 wells |
| WASHBUF | Wash buffer concentrate, 10x | 2 x 100 ml | 40 x 100 ml |
| CONJ | Conjugate concentrate, peroxidase-labelled (mouse anti-sIgA) | 1 x 200 µl | 15 x 200 µl |
| STD | Standards, lyophilised (0; 22.2; 66.6; 200; 600 ng/ml) | 2 x 5 vials | 25 x 5 vials |
| CTRL1 | Control, lyophilised (see specification for range) | 2 x 1 vial | 25 x 1 vial |
| CTRL2 | Control, lyophilised (see specification for range) | 2 x 1 vial | 25 x 1 vial |

| | | | |
|--------------|---|------------|-------------|
| SUB | Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use | 1 x 15 ml | 20 x 15 ml |
| STOP | Stop solution, ready-to-use | 1 x 15 ml | 20 x 15 ml |
| IDK Extract® | Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract® 2.5x</i> | 2 x 100 ml | 10 x 100 ml |

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.

- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate *IDK Extract***[®] has to be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract*[®] + 150 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at 37 °C in a water bath. The *IDK Extract*[®] is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract*[®]) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 4 months**.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **500 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly to ensure complete reconstitution. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at -20 °C for until the expiry date stated on the label and can be subjected to a maximum of two freeze-thaw cycles**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in **wash buffer** (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate (1:101 diluted CONJ) 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) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample stability

The **sample stability** is as follows:

Raw stool: 2 days at room temperature (15–30 °C), 2 days at 2–8 °C or 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

Saliva: 1 day at 2–8 °C, 4 weeks at -20 °C

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 g for 10 min.

For analysis, the **saliva supernatant** is diluted **1:2 000 in 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

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution II** 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 stool sample tube** with **1.5 ml extraction buffer** (1:2.5 diluted *IDK Extract*[®]) 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 the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place 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: 1:12 500

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This 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 immobilised 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-labelled conjugate (mouse anti-sIgA) is added which recognises 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 colour converts from blue to yellow. The intensity of the yellow colour 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, present 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.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

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.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

| | |
|-----|---|
| 1. | Before use, wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper. |
| 2. | Add each 100 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells. |
| 3. | Cover the strips and incubate for 1 hour on a horizontal shaker* at room temperature (15–30 °C). |
| 4. | Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper. |
| 5. | Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) in each well. |
| 6. | Cover the strips and incubate for 1 hour on a horizontal shaker* at room temperature (15–30 °C). |
| 7. | Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper. |
| 8. | Add 100 µl substrate (SUB) in each well. |
| 9. | Incubate for 10–20 minutes** at room temperature (15–30 °C) in the dark . |
| 10. | Add 100 µl stop solution (STOP) and mix well. |

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

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour 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 **2 000**.

Stool

For the calculation of the stool values, the results from the microplate reader must be multiplied by the dilution factor of **12 500**.

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

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) 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

Spiking Recovery

Two samples were spiked with sIgA 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 |
| 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 |

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik *IDK*[®] 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) was calculated from two normal samples measured on different days and by different persons in the *IDK*[®] slgA ELISA.

| Sample | slgA [ng/ml] | CV [%] |
|--------|--------------|--------|
| 1 | 102.4 | 8.0 |
| 2 | 1277.4 | 7.4 |

Dilution recovery

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

| Sample | Dilution | sIgA expected [ng/ml] | sIgA 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 plasma 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 analysed 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 to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK*[®] and *IDK Extract*[®] are trademarks of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send 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 IDK® sIgA 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.
10. 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.

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 |
|  | Attention |  | Consult instructions for use |