

IDK[®] sIgA ELISA

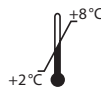
***Zur in-vitro-Bestimmung des sekretorischen IgA
in Speichel und Stuhl***

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

Gültig ab / Valid from 2019-10-08



K 8880



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>Stuhlprobenextraktion</i>	6
<i>Stuhlprobenverdünnung</i>	8
7. TESTDURCHFÜHRUNG	8
<i>Testprinzip</i>	8
<i>Pipettierschema</i>	8
8. ERGEBNISSE	10
9. EINSCHRÄNKUNGEN	10
10. QUALITÄTSKONTROLLE	11
<i>Referenzwerte</i>	11
11. TESTCHARAKTERISTIKA	11
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	11
<i>Analytische Sensitivität</i>	12
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	12
<i>Linearität</i>	13
<i>Analytische Spezifität</i>	13
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	14
13. TECHNISCHE MERKMALE	14
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	15
15. LITERATUR	15
<i>Allgemeine Literatur</i>	15
<i>Literatur mit Verwendung des Immundiagnostik IDK® slgA ELISAs</i>	16

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 propria* 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

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 8880	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 8880	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert (Maus-anti-slgA)	1 x 200 µl
K 8880	CAL	Kalibrator, lyophilisiert (Konzentration der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 8880	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 8880	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5x	2 x 100 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Stuhlprobenaufbereitungssystem wie z.B. Artikel-Nr. K 6998SAS
- 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 4x 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 **Extraktions-puffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract®*) ist **4 Monate bei 2–8 °C** in einem ge-schlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. CAL und CTRL wer-den mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine voll-ständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Mi-nuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Kalibratoren und Kontrollen** (rekonstituierte CAL und CTRL) **sind bei -20 °C bis zum an-gegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar und können bis zu 2-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.**
- Als **BLANK** (Leerwert) werden **100 µl** des Waschpuffers (1:10 verdünntes WASHBUF) pipettiert.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Ge-brauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Kon- jugat** (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

Rohstuhl kann 2 Tage bei Raumtemperatur (15–30 °C), 2 Tage bei 2–8 °C oder 8 Wochen bei -20 °C gelagert werden.

Stuhlextrakt (1:100) kann 1 Tag bei Raumtemperatur (15–30 °C), 7 Tage bei 2–8 °C, oder 7 Tage bei -20 °C gelagert werden. Die Extrakte sollten maximal 2 Einfrier-/Auf-tauzyklen unterzogen werden.

Speichelproben können 1 Tag bei 2–8 °C oder 4 Wochen bei -20 °C gelagert werden.

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 3 000 g zentrifugiert.

Speichelüberstände werden vor dem Einsatz im Test **1:2 000** in Waschpuffer verdünnt, z. B.:

10 µl Speichelüberstand + **990 µl** Waschpuffer, gut mischen = **Verdünnung I** (1:100)

50 µl Verdünnung I + **950 µl** Waschpuffer, gut mischen = **Verdünnung II** (1:20)
Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von 1:2 000.

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

Stuhlprobenextraktion

Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *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 Stuhlröhrchen** 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 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

Stuhlprobenextraktion

Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract®*) wird als **Probenextraktionspuffer** verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlprobenaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

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

SAS mit 1,5 ml Probenextraktionspuffer:

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

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

- g) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- h) Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml Probenextraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) **befüllen**. **Wichtig:** Probenextraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- i) 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.
- j) Das Röhrchen so lange vortexen 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 im Probenextraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- k) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- l) 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

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:125 mit Waschpuffer** weiterverdünnt. Zum Beispiel:

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

200 µl Verdünnung II + **800 µl** Waschpuffer, gut mischen = **1:5 (Verdünnung III)**. Dies entspricht nun einer Gesamtverdünnung von 1:125.

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 Waschschrilles werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes sIgA wird mit Hilfe eines Peroxidase-markierten (Maus-anti-sIgA) Antikörpers detektiert. Dieser erkennt spezifisch das gebundene sekretorische IgA. Über ein Antikörper-Peroxidase/TMB-System wird das sIgA schließlich detektiert. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge proportional. Anhand eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Musterkalibrierkurve 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 Kalibrator/Kontrollen/Leerwert/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung 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 Gege-

benheiten 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 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen . Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	Je 100 µl Kalibrator/Kontrollen/Leerwert/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen 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 jede Vertiefung 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 jede Vertiefung pipettieren.
9.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung 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

Für die Auswertung der Messwerte verwenden Sie bitte ein 4-parametrisches Logit-Log-Modell unter Verwendung der Angaben zum Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators (CAL), welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind.

Abhängig von der verwendeten Software kann der Kalibrationskurvenverlauf sowohl durch die Parameter A, B, C und D als auch durch die Wertepaare aus Konzentration und optischer Dichte der Standards beschrieben werden.

Achtung: Die Parameterwerte müssen genau eingegeben werden, da selbst geringe Abweichungen der Zahlenwerte zu massiven Störungen der Auswertung führen können.

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 werden mit dem Verdünnungsfaktor **2 000** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Stuhlproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem Verdünnungsfaktor **12 500** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

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) können 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 Kalibrierkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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 AG 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

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 20

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [µg/ml]	VK [%]
1	971,0	5,6
2	1136,0	5,8

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 12

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [µg/ml]	VK [%]
1	1279,6	8,2
2	1277,4	7,7

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB)	2,088 ng/ml
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	6,947 ng/ml
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ)	11,965 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20% VK.

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 2 Stuhlproben wurden dafür mit bekannten slgA-Konzentrationen versetzt und gemessen. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ermittelt:

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
112,8	150,0	262,8	278,5	106,0
	75,0	187,8	194,9	103,8
	50,0	162,8	165,3	101,8
	25,0	137,8	149,7	108,6
	150,0	262,8	289,7	110,2
	150,0	262,8	295,0	112,2
	50,0	162,8	164,8	101,2
	50,0	162,8	146,8	106,0
109,3	150,0	259,3	271,2	104,6
	75,0	184,3	212,2	115,2
	50,0	159,3	170,9	107,3
	25,0	134,3	135,9	101,2
	150,0	259,3	250,3	96,6
	50,0	159,3	160,2	100,6

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung von 2 Stuhlproben nachgewiesen.

Für slgA in Stuhl und Speichel wurde Bezug auf die Standardkurve ein lineares Verhalten im Bereich von 26,8 bis 276,8 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:12500	276,0	276,0	100,0
	1:25000	138,0	107,3	77,7
	1:50000	69,0	53,8	78,0
	1:187500	36,8	29,2	79,3
B	1:12500	214,4	214,4	100,0
	1:25000	107,2	96,3	89,8
	1:50000	53,6	57,4	107,0
	1:100000	26,8	28,8	107,4

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration	Gefundene Konzentration [ng/ml]	Fazit
α 1-Antitrypsin	90 μ g/l	< 2,088	< LoB
Albumin	800 μ g/l	< 2,088	< LoB
PMN-Elastase	40 ng/ml	< 2,088	< LoB
Lysozym	30 ng/ml	< 2,088	< LoB
Hämoglobin	1000 μ g/ml	< 2,088	< LoB
Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex	40 mU/l	< 2,088	< LoB
CRP	150 ng/ml	< 2,088	< LoB
Pankreatische Amylase	28333 mU/l	< 2,088	< LoB

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration	Gefundene Konzentration [ng/ml]	Fazit
Chymotrypsin	1000 ng/ml	< 2,088	< LoB
Myeloperoxidase	100 ng/ml	< 2,088	< LoB

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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

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 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.
- *IDK®* und *IDK Extract®* sind Marken der Immundiagnostik AG.
- 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 IDK® sIgA 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.

Verwendete Symbole:

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

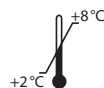
IDK[®] sIgA ELISA

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

Valid from 2019-10-08



K 8880



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	21
2. INTRODUCTION	21
3. MATERIAL SUPPLIED	21
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	22
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	22
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	23
<i>Sample stability</i>	23
<i>Saliva</i>	23
<i>Extraction of the stool samples</i>	24
<i>Dilution of stool samples</i>	25
7. ASSAY PROCEDURE	25
<i>Principle of the test</i>	25
<i>Test procedure</i>	26
8. RESULTS	27
9. LIMITATIONS	28
10. QUALITY CONTROL	28
<i>Reference range</i>	28
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	29
<i>Analytical sensitivity</i>	29
<i>Accuracy – Trueness</i>	29
<i>Accuracy – Precision</i>	30
<i>Analytical specificity</i>	30
<i>Linearity</i>	31
12. PRECAUTIONS	31
13. TECHNICAL HINTS	32
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	32
15. REFERENCES	33
<i>General literature</i>	33
<i>Literature using the Immundiagnostik IDK® sIgA ELISA</i>	33

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG 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

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 8880	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 8880	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled (mouse anti-sIgA)	1 x 200 µl
K 8880	CAL	Calibrator, lyophilised (see specification for concentration)	2 x 1 vial
K 8880	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 8880	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x	2 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

- Ultrapure water*
- Stool sample application system such as cat. no.: K 6998SAS
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Centrifuge, 3000 g
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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 ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure 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**.

- Use **100 µl** of **wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) as **BLANK**.
- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate IDK Extract®** has to be diluted with ultrapure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml ultrapure 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 calibrators (CAL)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the CAL and CTRL have to be reconstituted with **500 µl of ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Calibrators and controls** (reconstituted CAL and CTRL) **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**.
- **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

Raw stool can be stored for 2 days at room temperature (15–30 °C), for 2 days at 2–8 °C or for 8 weeks at -20 °C.

Stool extract (1:100) is stable for one day at room temperature (15–30 °C), 7 days at 2–8 °C or 7 days at -20 °C with maximum 2 freeze-thaw cycles.

Saliva is stable for 1 day at 2–8 °C or 4 weeks at -20 °C.

Saliva

To avoid variation in sIgA content, take saliva samples always at the same time of the day. No food or liquid should be consumed 30 min before sample collection. Collect saliva samples using salivettes and centrifuge at 3000 g for 10 min.

The **saliva supernatant** must be diluted **1:2 000 in wash buffer** before performing the assay, e.g.

10 µl saliva supernatant + **990 µl** wash buffer, mix well = **dilution I** (1:100)

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

This results in a final dilution of **1:2 000**

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

Extraction of the stool samples

Extraction buffer (1:2.5 diluted *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 sample 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 sample extraction buffer** (1:2.5 diluted *IDK Extract*®) before using it with the sample. **Important:** Allow the sample 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 sample extraction 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 supernatant (dilution I) + **960 µl** wash buffer, mix well = **1:25 (dilution II)**
200 µl dilution II + **800 µl** wash buffer, mix well = **1:5 (dilution III)**

This results in a final dilution of **1:125**.

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed 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. The concentration of secretory IgA can be quantified by referring the optical density of the calibrator to a lot-dependent master calibration curve.

Test procedure

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

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

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging 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, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl calibrator/controls/diluted samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well 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

For result evaluation, please use a four parametric logit-log model based on the standard curve of the respective kit lot and the calibrator value (CAL). All essential information on the standard curve is provided on the QC data sheet of the respective product lot.

The calibration curve can be expressed either by the concentration of each standard with its corresponding optical density or by the four parameters A,B,C and D. In both cases the optical density of the calibrator (CAL) is essential. Depending on your evaluation software program, either the one or the other kind of data described above should be entered.

Caution: Please make sure that all parameters and values are transferred accurately into your software as minor deviations can cause severe errors during evaluation.

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

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 2 000** to get the actual concentrations.

Stool

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 12 500** to get the actual concentrations.

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) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher 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:

LoB × sample dilution factor to be used

LoB see chapter "Performance characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG 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

Analytical sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB 2.088 ng/ml

Limit of detection, LoD 6.947 ng/ml

Limit of quantitation, LoQ 11.965 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20% CV.

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, sIgA spikes with known concentrations were added to 2 different stool samples. The results below were obtained without consideration of the sample dilution factor.

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
112.8	150.0	262.8	278.5	106.0
	75.0	187.8	194.9	103.8
	50.0	162.8	165.3	101.8
	25.0	137.8	149.7	108.6
	150.0	262.8	289.7	110.2
	150.0	262.8	295.0	112.2
	50.0	162.8	164.8	101.2
	50.0	162.8	146.8	106.0
109.3	150.0	259.3	271.2	104.6
	75.0	184.3	212.2	115.2
	50.0	159.3	170.9	107.3
	25.0	134.3	135.9	101.2
	150.0	259.3	250.3	96.6
	50.0	159.3	160.2	100.6

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 20

The repeatability was assessed with 2 stool samples under **constant** parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [µg/ml]	CV [%]
1	971.0	5.6
2	1136.0	5.8

Reproducibility (Inter-Assay); n = 12

The reproducibility was assessed with 2 stool samples under **varying** parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [µg/ml]	CV [%]
1	1279.6	8.2
2	1277.4	7.7

Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to sIgA. There was no cross-reactivity observed.

Substance tested	Concentration added	Concentration obtained [ng/ml]	Conclusion
α1-antitrypsin	90 µg/l	< 2.088	< LoB
Albumin	800 µg/l	< 2.088	< LoB
PMN elastase	40 ng/ml	< 2.088	< LoB
Lysozyme	30 ng/ml	< 2.088	< LoB
Hemoglobin	1000 µg/ml	< 2.088	< LoB
Hemoglobin-hapto-globin complex	40 mU/l	< 2.088	< LoB
CRP	150 ng/ml	< 2.088	< LoB
Pancreatic amylase	28333 mU/l	< 2.088	< LoB
Chymotrypsin	1000 ng/ml	< 2.088	< LoB
Myeloperoxidase	100 ng/ml	< 2.088	< LoB

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP6-A with a serial dilution of 2 different stool samples.

For secretory IgA in stool and saliva, the method has been demonstrated to be linear from 26.8 to 276.8 ng/ml based on the standard curve without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
A	1:12500	276.0	276.0	100.0
	1:25000	138.0	107.3	77.7
	1:50000	69.0	53.8	78.0
	1:187500	36.8	29.2	79.3
B	1:12500	214.4	214.4	100.0
	1:25000	107.2	96.3	89.8
	1:50000	53.6	57.4	107.0
	1:100000	26.8	28.8	107.4

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 colour 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.

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
	Consult specification data sheet		