

# RIDASCREEN<sup>®</sup> sIgA

Art. N°: G09035



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany  
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Área de aplicação

Para diagnóstico *in vitro*. O teste RIDASCREEN® sIgA é um teste imunoenzimático para determinação quantitativa de IgA secretora humana (sIgA) em amostras de fezes.

## 2. Resumo e explicação do teste

A IgA é a mais heterogênea de todas as imunoglobulinas humanas. Os anticorpos IgA estão presentes nas secreções externas onde formam uma barreira de defesa importante contra agentes patogênicos.

Através da concentração de sIgA nas fezes pode-se tirar conclusões sobre as defesas da mucosa intestinal.

IgA ocorre nas formas monomérica (mIgA), polimérica (pIgA) e secretora dimérica (sIgA). A formação de IgAs secretoras é independente da síntese de IgA no soro. IgA secretora consiste de duas moléculas IgA (monoméricas) da cadeia J bem como do componente secretor (cadeia SC), um polipeptídeo com um peso molecular de 70 kDa. O componente secretor é sintetizado pelas células epiteliais das mucosas dos tratos gastrointestinal, respiratório e urogenital bem como pelas glândulas salivares, lacrimais e mamárias. As células de plasma no espaço subendotelial das mucosas segregam um complexo de duas moléculas IgA que estão unidas através da proteína J. Em seguida, este complexo liga-se ao componente secretor que se encontra na superfície da célula epitelial. Depois desta ligação, a sIgA é transportada seletivamente pela célula epitelial mediante a ajuda de receptores epiteliais e é segregada na superfície por exocitose. Deste modo, é conduzida IgA secretora (sIgA) em grandes quantidades, por exemplo, para a superfície da mucosa intestinal. Mas também outras secreções como o leite, saliva, lágrimas e expectoração nasal ou traqueobrônquica entre outras contêm sIgA.

A determinação da concentração de sIgA nas fezes permite tirar conclusões sobre o estado de funcionamento do sistema imunológico associado ao intestino (GALT) apurando-se o grau de secreções bem como a estimulação das células do plasma na submucosa do intestino.

Enquanto que a deficiência de sIgA indica uma atividade reduzida das defesas imunológicas, os valores de sIgA aumentada indicam uma atividade intensificada do sistema imunológico intestinal.

Devido às fortes propriedades anti-inflamatórias da IgA, valores de sIgA aumentada nas fezes indicam também uma possível resposta inflamatória local na mucosa do intestino.

RIDASCREEN® sIgA para detecção rápida e fiável do seguinte:

- Estado de funcionamento do tecido linfático associado ao intestino (GALT)
  - Nível de sIgA reduzida: atividade reduzida do sistema imunológico associado ao intestino
  - Nível de sIgA aumentada: atividade aumentada do sistema imunológico associado ao intestino
- Barreira imunológica afetada na mucosa do intestino (suscetibilidade aumentada para infeções, doença alérgica)
- Infeções locais na mucosa do intestino
- Doenças autoimunes

### 3. Princípio do teste

No teste RIDASCREEN® sIgA são aplicados anticorpos específicos em um método sanduíche. A superfície do poço da microplaca está revestida com um anticorpo específico contra epítomos da IgA humana. Uma suspensão da amostra fecal a analisar é pipetada no poço da microplaca e incubada. Depois disso, segue-se uma lavagem e uma segunda incubação com um anticorpo monoclonal que está conjugado com peroxidase de raiz-forte. Existindo sIgA na amostra, forma-se um complexo tipo sanduíche constituído pelo anticorpo imobilizado, pelo antígeno sIgA e pelo anticorpo conjugado. Os anticorpos marcados com enzimas não-ligados são removidos em uma lavagem seguinte. Depois da adição de substrato, a enzima ligada em amostras positivas transforma a solução incolor nos poços da microplaca em uma solução azul. Mediante adição do reagente de parada, esta cor muda de azul para amarelo. A extinção medida é proporcional à concentração de sIgA existente na amostra.

#### 4. Conteúdo da embalagem

Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 96 testes

<b>Plate</b>	96 testes	Microplaca; 12 tiras (divisíveis) no suporte; revestidas com anticorpos policlonais (coelho) contra sIgA humana
<b>Extract 10x</b>	100 ml	Tampão de extração e diluição (10x concentr.); para extração e diluição primária de fezes; solução de NaCl tamponada com fosfato; contém 0,1% Tween e 0,1% NaN <sub>3</sub>
<b>Diluent   3</b>	100 ml	Tampão de diluição de amostras; solução de NaCl tamponada com proteína; contém 0,1% NaN <sub>3</sub> ; pronto para uso; coloração vermelha
<b>Wash 10x</b>	100 ml	Tampão de lavagem (10x concentr.); solução de NaCl tamponada com fosfato; contém 0,1% Thimerosal, 0,1% detergente
<b>Calibrator</b> <i>tampa transparente</i>	1 ml	Calibrador (para calibração padrão); contém 0,1% NaN <sub>3</sub> ; pronto para uso
<b>High control   +</b> <i>tampa vermelha</i>	1 ml	Controle "High"; contém 0,1% NaN <sub>3</sub> ; pronto para uso
<b>Low control   +</b> <i>tampa verde</i>	1 ml	Controle "Low"; contém 0,1% NaN <sub>3</sub> ; pronto para uso
<b>Conjugate</b>	12 ml	Anticorpo monoclonal (rato) contra sIgA humana conjugado com peroxidase em solução proteica estabilizadora; pronto para uso
<b>SeroSC</b>	12 ml	Substrato; peróxido de hidrogênio / tetrametilbenzidina (TMB); pronto para uso
<b>Stop</b>	12 ml	Reagente de parada; 1 N ácido sulfúrico; pronto para uso

Detalhes sobre substâncias perigosas de acordo com as obrigações de rotulagem. Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 5. Reagentes e seu armazenamento

Os reagentes devem ser armazenados entre 2 – 8 °C e podem ser utilizados até a expiração da data de validade impressa na respectiva etiqueta. Os tampões de lavagem ou de extração diluídos podem ser utilizados 4 semanas quando armazenados entre 2 – 8 °C. Evitar a contaminação com micróbios! Após expiração da data de validade a qualidade não é garantida. Abrir a embalagem de alumínio das tiras de microtitulação com uma tesoura de modo a não cortar o fecho. As tiras de microtitulação que não são necessárias devem voltar a ser guardadas imediatamente na embalagem de alumínio entre 2 - 8 °C. Evitar a incidência de luz direta sobre o substrato incolor para prevenir a degradação ou o azulamento devido a auto-oxidação. Quando o substrato apresentar uma cor azulada, já não deve ser utilizado.

## 6. Reagentes adicionais necessários e equipamento acessório

### 6.1. Reagentes

- Água destilada ou desionizada

### 6.2. Equipamento acessório

- Balança de precisão ou tubo de preparação de amostras Roche
- Mixer Vortex (opcional, ver 9.4.)
- Micropipeta para volumes de 50 - 100 µl e 1 ml
- Proveta (1000 ml)
- Cronômetro
- Lavadora para microplacas ou pipetas multicanais (300 µl)
- Fotômetro para microplacas (450 nm; filtro de referência ≥ 620 nm)
- Papel filtro (panos de laboratório)
- Recipiente para lixo com uma solução de 0,5 % de hipoclorito

## 7. Medidas de precaução

Somente para diagnóstico *in vitro*.

Este ensaio só deve ser realizado por profissionais de laboratório treinados. As diretrizes para trabalhar em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções relativo ao procedimento de ensaio deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com a pele ferida ou membranas mucosas. Ao manusear reagentes ou amostras, use roupas de segurança adequadas (luvas apropriadas, jaleco,

óculos de segurança) e lave suas mãos após o término do procedimento de ensaio. Não fume, coma ou beba nas áreas onde estão sendo usadas amostras ou reagentes. Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

As amostras fecais devem ser tratadas como potencialmente infecciosas nos termos dos regulamentos de segurança nacionais.

O tampão de lavagem contém 0,1 % de Thimerosal como conservante. O contato com a pele ou com as mucosas deve ser evitado.

O calibrador, o controle "High", o controle "Low" e o tampão de extração e diluição de amostras contêm 0,1 %  $\text{NaN}_3$  como conservante. O contato com a pele ou com as mucosas deve ser evitado.

Peróxido de hidrogênio (substrato) pode causar corrosão. Manuseá-lo com cuidado!

O reagente de parada contém 1 N ácido sulfúrico. Evitar o contato com a pele e com o vestuário! No caso de contato com a pele, lavá-la com água.

Todos os reagentes e materiais que entrarem em contato com amostras potencialmente infecciosas, têm de ser tratados com desinfetantes adequados ou então autoclavados a 121 °C durante pelo menos uma hora. CUIDADO: para evitar a formação de gases tóxicos, o dejetos líquido que incluir reagente de parada tem de ser neutralizado antes de ser colocado em uma solução de hipoclorito.

Todos os reagentes e materiais utilizados devem ser descartados corretamente após o uso. Consulte os regulamentos nacionais relevantes para a eliminação.

## **8. Coleta e armazenamento das amostras**

As amostras fecais devem ser transportadas refrigeradas sempre que possível e guardadas entre 2 - 8 °C até o começo do teste. Recomendamos que a amostra seja armazenada a - 20 °C até à preparação. O congelamento e descongelamento repetidos da amostra devem ser evitados. Amostras fecais não devem ser guardadas em recipientes de transporte que contenham fluidos de transporte com conservantes, soros animais, íons de metal nem agentes ou detergentes oxidantes uma vez que estas substâncias podem interferir no teste RIDASCREEN® sIgA.

## 9. Realização do teste

### 9.1. Generalidades

Antes de serem utilizados, todos os reagentes e a microplaca **Plate** têm de estar a temperatura ambiente (20 – 25 °C). As tiras de microtitulação não devem ser retiradas da embalagem de alumínio antes de atingirem a temperatura ambiente. Os reagentes devem ser bem misturados no momento que vão ser utilizados. As tiras de microtitulação que não são necessárias devem ser guardadas novamente (na embalagem fechada) com os reagentes entre 2 – 8 °C. As tiras de microtitulação usadas uma vez não devem voltar a ser utilizadas. Os reagentes e as tiras de microtitulação não devem ser utilizados quando a embalagem estiver danificada ou os frascos apresentarem derrames. Evitar o contato direto das amostras com os componentes do kit para excluir a contaminação cruzada. Evitar a incidência de luz solar direta durante a realização do teste. Recomendamos cobrir a microplaca ou vedá-la com fita adesiva para evitar perdas por evaporação.

### 9.2. Preparação do tampão de lavagem

1 parte do tampão de lavagem **Wash 10x** é misturada com 9 partes de água destilada (1:10). Para isso, verte-se 100 ml de concentrado em uma proveta de 1000 ml e adiciona-se água destilada até se atingir os 1000 ml. Os cristais eventualmente existentes no concentrado devem ser dissolvidos previamente mediante aquecimento (em banho-maria a 37 °C).

### 9.3. Preparação do tampão de extração

1 parte do tampão de extração concentrado **Extract 10x** é misturada com 9 partes de água destilada (1:10). Para isso, verte-se 100 ml de concentrado em uma proveta de 1000 ml e adiciona-se água destilada até se atingir os 1000 ml. Os cristais eventualmente existentes no concentrado devem ser dissolvidos previamente mediante aquecimento (em banho-maria a 37 °C).

### 9.4. Preparação das amostras

#### 9.4.1. Pesagem e suspensão da amostra

Recomendamos que a amostra seja armazenada a – 20 °C até à preparação. Amostras congeladas devem atingir lentamente a temperatura ambiente.

Pesar 100 mg de amostra fecal em um tubo de teste devidamente marcado e em seguida adicionar-lhe com a pipeta 5 ml de tampão de extração diluído ( diluição 1:50).

Opcionalmente pode-se pesar 80 - 130 mg de amostra fecal e para garantir uma proporção de diluição constante (1:50) aplicar o volume de tampão de extração adequado em função do peso da amostra fecal em questão (ver tab. 1).

Tab.1: Volume do tampão de extração diluído que é necessário em função do peso da amostra fecal (fator constante de diluição 1:50)

Peso [ mg ]	Volume [ ml ]
80	4,00
85	4,25
90	4,50
95	4,75
100	5,00
105	5,25
110	5,50
115	5,75
120	6,00
125	6,25
130	6,50

No caso de ressuspensão em um volume de tampão de extração constante de 5 ml, há que considerar o respectivo fator de diluição quando da avaliação (ver tab. 2).

Tab.2: Fator de diluição quando de adição constante de tampão de extração diluído (5 ml) em função do respectivo peso da amostra

Peso [ mg ]	Fator de diluição [ ml ]
80	62,50
85	58,82
90	55,55
95	52,63
100	50,00
105	47,62
110	45,45
115	43,45
120	41,66
125	40,05
130	38,46

Independentemente do método de pesagem, a homogeneização da suspensão das fezes é efetuada mediante mistura minuciosa em um misturador Vortex. Quando de fezes líquidas, são aspirados exatamente 100 µl das mesmas com uma pipeta e pipetados em exatamente 5 ml de tampão de extração diluído.

Em seguida, este homogeneizado tem de ser centrifugado durante 10 minutos a pelo menos 3000 g para sedimentação das partículas fecais maiores. O sobrenadante do extrato tem de ser diluído novamente para aplicação imediata no teste. Recomendamos



que a armazenagem do sobrenadante seja realizada de forma separada em alíquotas, no mínimo a – 20 °C.

#### 9.4.2. Diluição manual da amostra

50 µl do sobrenadante clarificado (de 9.4.1) são diluídos com 950 µl de tampão de extração diluído (1:20) e misturados no Vortex. Depois disto, efetua-se uma nova diluição misturando 100 µl da primeira diluição com 900 µl de tampão de diluição de amostras RIDASCREEN® **Diluent | 3** (1:10) e agitando-os no Vortex. Esta diluição final da amostra fecal (diluição final 1:10000) é utilizada em seguida para o teste.

Em vez da preparação e homogeneização da amostra anteriormente descritas, pode-se utilizar o sistema de preparação de amostras da empresa Roche Diagnostics, Mannheim (art. nº: 745804). As instruções especiais para este sistema são disponibilizadas pela R-Biopharm AG a pedido.

#### 9.4.3. Diluição automática da amostra

Se o teste for realizado com o sistema DSX-ELISA da marca Dynex, o respectivo protocolo de medição necessário pode ser obtido na R-Biopharm AG e aplicado no aparelho. Este aparelho executa a diluição da amostra automaticamente como se descreve abaixo.

25 µl do sobrenadante clarificado são pipetados pelo sistema automático ELISA em uma placa Deepwell e diluídos com 975 µl de tampão de extração diluído (1:40). Seguem-se dois ciclos de mistura.

Depois coloca-se no suporte da microplaca **Plate** RIDASCREEN® sIgA a quantidade de tiras de microtitulação que são necessárias.

Alíquotas de 20 µl de amostra diluída são transferidas da placa Deepwell para a microplaca **Plate** RIDASCREEN® sIgA e novamente diluídas com 80 µl de tampão de diluição de amostras RIDASCREEN® **Diluent | 3** (1:5; diluição final 1:10000).

Para realização do teste com outros sistemas automáticos de pipetagem ELISA, contate a R-Biopharm AG para obter instruções.

#### 9.5. Primeira incubação

Depois de se encaixar uma quantidade de tiras/poços suficientes no suporte, adiciona-se aos respectivos poços 100 µl cada de calibrador **Calibrator** (duplamente), de tampão de diluição de amostras RIDASCREEN® **Diluent | 3** (= controle negativo), de controle "High" **High control | +** bem como da amostra fecal diluída a analisar. Utilizando-se o controle "Low" **Low control | +** adiciona-se também 100 µl do mesmo. Em seguida, incubar a placa uma hora a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

## 9.6. Primeira lavagem

A lavagem cuidadosa é importante para se conseguir resultados corretos pelo que deve ser realizada seguindo-se as instruções rigorosamente. A solução da incubação que se encontra nos poços deve ser esvaziada primeiro para um recipiente de lixo contendo solução de hipoclorito para desinfecção. Depois disso, bate-se na placa sobre papel absorvente para remover o resto da umidade. Em seguida, lava-se a placa 5 vezes com 300 µl de tampão de lavagem de cada vez (ver ponto 9.2.). Assegurar que ela é esvaziada completamente batendo-lhe depois de cada uma das lavagens sobre uma parte do papel ainda seca e por usar.

Utilizando-se uma lavadora de microplacas deve-se verificar se ela está corretamente programada para o tipo de microplaca em questão. Além disso, as suspensões de fezes que não estiverem completamente livres de partículas devem ser removidas dos poços manualmente antes da primeira lavagem para evitar o entupimento das agulhas de lavagem. Durante os passos de lavagem, é importante assegurar que o líquido é aspirado completamente. Depois da lavagem final, deve-se bater na placa cuidadosamente sobre papel ou toalhas de laboratório para remover restos de umidade.

## 9.7. Segunda incubação

Adicionar 100 µl de conjugado **Conjugate** em todos os poços. Em seguida, incubar a placa uma hora a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

## 9.8. Segunda lavagem

Depois do período de incubação ter decorrido, o conjugado que se encontra nos poços deve ser esvaziado para um recipiente de lixo com solução de hipoclorito para desinfecção. Depois disso, bate-se na placa sobre papel absorvente para remover o resto da umidade. Em seguida, lava-se a placa 5 vezes com 300 µl de tampão de lavagem de cada vez. Assegurar que ela é esvaziada completamente batendo-lhe depois de cada uma das lavagens sobre uma parte do papel ainda seca e por usar.

## 9.9. Terceira incubação

Adicionar 100 µl de substrato **SeroSC** em todos os poços. Em seguida, incubar a placa 15 minutos ao escuro a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Depois disto, adicionar 50 µl de reagente de parada **Stop** em todos os poços para terminar a reação. Depois de misturá-lo cuidadosamente (batendo-se suavemente na beira da placa), medir a extinção a 450 nm e um comprimento de onda de referência de 620 nm.

Nota: Amostras de pacientes fortemente positivas podem causar precipitados de substrato pretos. Tais amostras devem ser diluídas na proporção 1:10 e novamente analisadas (ver ponto 9.5.) (diluição final da amostra de fezes: 1:100000).

## 10. Controle de qualidade - Sinais de caducidade do reagente

Para fins de controle da qualidade, devem ser utilizados em cada realização do teste o calibrador **Calibrator** (duplamente), o tampão de diluição de amostras RIDASCREEN® **Diluent | 3** como controle negativo e o controle "High" **High control | +** para garantir a estabilidade dos reagentes e a realização correta do teste. A aplicação do controle "Low" é opcional.

O teste foi realizado corretamente quando o valor de extinção (OD) do controle negativo a 450 nm / 620 nm for menor do que 0,05 e o mediano do valor de extinção (OD) do calibrador estiver dentro da gama mencionada na folha de dados específica do lote. O controle "High" tem de estar dentro da gama de concentração específica do lote mencionada na folha de dados.

Ao realizar o teste RIDASCREEN® sIgA em sistemas automáticos ELISA abertos, o valor de extinção OD apurado do calibrador **Calibrator** pode divergir da gama mencionada no certificado específico do lote em função do sistema utilizado. Também nos sistemas ELISA automáticos, o controle "High" **High control | +** é decisivo para a validação dos resultados do teste e deve ser sempre aplicado. A aplicação do controle "Low" **Low control | +** não é mandatória.

Se os valores divergirem dos requeridos ou se os reagentes estiverem turvos ou o substrato incolor estiver azulado antes de serem adicionados nos poços, pode ser sinal de que os reagentes já caducaram. Se os valores estipulados não forem atingidos, há que verificar os pontos seguintes antes da repetição do teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento utilizado (calibração, por exemplo)
- Realização correta do teste
- Controle visual dos componentes do kit quanto a contaminação ou má vedação; uma solução de substrato com coloração azulada já não deve ser utilizada.

Se as condições após repetição do teste ainda não forem satisfatórias, contate o fabricante ou o seu distribuidor R-Biopharm local.

## 11. Avaliação e interpretação

### 11.1. Quantificação de um ponto mediante o modelo logistic-log de 4 parâmetros

O teste RIDASCREEN® sIgA utiliza o modelo logistic-log de 4 parâmetros (4PL) para determinar a concentração de sIgA nas fezes em unidades de µg/g.

Para apuramento dos resultados, é necessário o software de avaliação RIDA®SOFT Win.net. Este software RIDA®SOFT Win.net ou sua atualização podem ser obtidos na R-Biopharm AG ou através do distribuidor R-Biopharm local.

Os parâmetros (A - D) da curva padrão bem como os valores teóricos para o calibrador, controle "High" e controle "Low" que são necessários para o cálculo 4PL estão indicados na folha de dados específica do lote que acompanha o kit e têm de ser comparados com os respectivos valores no software de avaliação antes de cada medição.

No controle final de qualidade, a R-Biopharm AG apura para cada lote de kits em condições de teste ideais a curva padrão (inclusive os parâmetros A - D) bem como um valor teórico e uma gama de desvio padrão admissível para o calibrador, controle "High" e controle "Low".

O calibrador é aplicado para compensar flutuações do teste e para verificar a qualidade do processo. O controle "High" é decisivo para a validação do teste.

Do valor médio da determinação dupla do calibrador e seu valor teórico, o software RIDA®SOFT Win.net calcula internamente um fator de correção F e compensa-o com as extinções das amostras fecais. A avaliação segura e fiável dos resultados do teste é possível dentro dos limites da curva padrão.

Em vez do software RIDA®SOFT Win.net é possível utilizar outro software de avaliação que disponibilize o modelo logistic-log de 4 parâmetros.

## 11.2. Resultado do teste

A gama normal apurada para sIgA situa-se entre 100 – 1200 µg sIgA/g de fezes. Se os valores medidos forem inferiores a 100 µg sIgA/g de fezes, os pacientes têm insuficiência de sIgA. Quando de valores superiores a 1200 µg sIgA/g de fezes, os pacientes apresentam valores de sIgA aumentada.

Recomendamos a cada laboratório que estabeleça uma gama de valores padrão própria.

## 12. Limites do método

O teste RIDASCREEN® sIgA detecta epítomos de sIgA humana em amostras fecais. Dos testes não se pode concluir uma relação entre um valor de extinção apurado e a gravidade de sintomas clínicos. Os resultados apurados devem ser sempre interpretados em associação com o quadro clínico.

### 13. Características de desempenho

#### 13.1. Limite da detecção

O limite de detecção do teste RIDASCREEN® sIgA foi calculado da soma do valor  $B_0$  e do dobro do desvio padrão de  $B_0$ . O valor  $B_0$  em si é o valor médio de determinações múltiplas (n=84) do controle negativo (=Diluent | 3).

Daqui resulta um limite de detecção para sIgA de 171 µg/g (ou 17,1 ng/ml) de fezes.

#### 13.2. Precisão

A reprodutibilidade Intra-teste e inter-teste do RIDASCREEN® sIgA foi apurada em determinações múltiplas realizadas em dias diferentes e sob condições de teste ideais. Dos resultados obtidos, calculou-se o valor médio (MW), o desvio padrão (SD) bem como o coeficiente de variação (VK). Os resultados estão representados nas tabelas 3 e 4.

Tab.3: Reprodutibilidade intra-teste (n=16)

Intra-teste	RIDASCREEN® sIgA	
	1ª Concentração [660 µg/g]	2ª Concentração [1500 µg/g]
MW (OD)	674	1380
SD	45,6	55,80
VK %	6,8	4,0

Tab.4: Reprodutibilidade inter-teste (n=8)

Inter-teste	RIDASCREEN® sIgA	
	1ª Concentração [660 µg/g]	2ª Concentração [1500 µg/g]
MW (OD)	677	1461
SD	79,7	85,5
VK %	11,8	5,9

#### 13.3. Linearidade dos resultados do teste

Para verificar a linearidade dos resultados do teste RIDASCREEN® sIgA, foram elaboradas séries de diluição de várias amostras fecais com sIgA. A pesagem e a suspensão das amostras bem como o primeiro passo da diluição foram realizados de acordo com as instruções contidas neste manual (ver ponto 9.4.). Os passos de diluição seriais foram efetuados em seguida com tampão de diluição de amostras RIDASCREEN® Diluent | 3 .

Foram calculadas as concentrações apuradas no teste em comparação com as esperadas.

Na tabela 5 estão representados os resultados das séries de diluição de três amostras com diferentes concentrações de slgA.

Tab.5.: Determinação da linearidade dos resultados do teste

Amostra	Diluição	Concentração apurada (µg/g)	Concentração esperada (µg/g)	Concentração apurada / Concentração esperada
1	1:10.000	807,00		
	1:20.000	406,00	403,50	101%
	1:40.000	207,50	201,75	103%
	1:80.000	104,25	100,88	103%
	1:160.000	57,69	50,44	114%
	MW			105%
2	1:10.000	1175,00		
	1:20.000	576,50	587,50	98%
	1:40.000	280,25	293,75	95%
	1:80.000	146,38	146,88	100%
	1:160.000	74,69	73,44	102%
	MW			99%
3	1:10.000	378,00		
	1:20.000	202,50	189,00	107%
	1:40.000	107,25	94,50	113%
	1:80.000	58,75	47,25	124%
	1:160.000	-	23,63	-
	MW			115%
	MW (total)			106%

#### 14. Literatura

1. Brand S, Gerritzen A. Evaluation eines neuen Enzym-Immuno-Assays zum Nachweis von sekretorischem IgA im Stuhl. Poster DGKL 2010.
2. Brandtzaeg P. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. *Current Opinion in Gastroenterology* 2010, 26: 554–563.
3. Goldblum RM. The role of IgA in local immune protection. *J Clin Immun* 1990; 10(6): 64S-71S.
4. Mestecky Y et al. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut* 1999; 44: 2-5.
5. Motegi Y et al. Role of secretory component, and eosinophils in mucosal inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122(suppl 1): 25–27.
6. Rüssmann H et al. IgA/IgM and secretory immunity. *Sepsis* 1999; 3: 219-234.
7. Russel MW et al. Molecular heterogeneity of human IgA antibodies during an immune response. *Clin Exp Immunol* 1992; 87: 1-6.