



DCM078-8
Ed. 01/2015

IgA SALIVA ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta della concentrazione di IgA nella saliva.

IVD



Vedere etichetta esterna

LOT

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO078

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di IgA nella saliva.

Il kit IgA Saliva ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Le IgA rappresentano circa 15%-20% delle immunoglobuline nel sangue, si trovano anche nel muco secreto nello stomaco, nei polmoni e nell'intestino. Ciò impedisce ai microbi di legarsi alle cellule epiteliali delle vie respiratorie e del tratto digestivo. Questa immunoglobulina interviene nei processi immunitari verso gli agenti patogeni della pelle, delle vie respiratorie o del tratto gastro-intestinale. Esiste in due forme, IgA1 (90%) e IgA2 (10%) che differiscono nella struttura. IgA1 è presente nel siero ed è secreto dalle cellule B del midollo osseo, IgA2 è secreto dalle cellule B situate nelle mucose ed è stato trovato nel colostro, il latte materno, nelle lacrime e nella saliva. L'IgA secreto presenta una struttura dimerica, collegata da due catene supplementari. Una di queste è la catena J (da join), che è un polipeptide di 1.5 kD, ricco in cisteine e strutturalmente completamente differente dalle altre catene delle immunoglobuline. La forma dimerica di IgA secreta esternamente presenta un polipeptide della stessa massa molecolare (kD 1.5) denominata catena secretiva ed è sintetizzata dalle cellule epiteliali. La diminuzione o assenza di IgA, definita *IgA selective deficiency*, può essere un'immunodeficienza clinicamente significativa.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test IgA saliva ELISA è basato sulla cattura simultanea dell'IgA umana da parte di due anticorpi: uno monoclonale immobilizzato nella micropiastra ed uno policlonale coniugato con la perossidasi di rafano (HRP). Dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Successivamente l'enzima presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato (H₂O₂) ed il TMB-Substrate, sviluppa una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop Solution (H₂SO₄).

L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di IgA presente nel campione.

La concentrazione delle IgA nel campione è calcolata in base ad una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (5 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0

REF DCE002/7806-0

CAL1

REF DCE002/7807-0

CAL2

REF DCE002/7808-0

CAL3

REF DCE002/7809-0

CAL4

REF DCE002/7810-0

2. IgA saliva Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi

REF DCE045/7803-0

3. 5X Conc. IgA Assay Buffer (1 flacone, 40 mL)

Hepes buffer 25 mM pH 7.4; BSA 0,5 g/L

REF DCE049/7849-0

4. 20X Conc. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

Anticorpo anti IgA coniugato con perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/7802-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti IgA adsorbito nella micropiastra

REF DCE002/7803-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0.15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006B-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letture per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit. Evitare di staccare la sheet adesiva dalle strip che non vengono utilizzate nella seduta analitica.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di IgA da 0.5 µg/mL a 400 µg/mL.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o

un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.

- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₄)

I Calibratori ed il Controllo sono pronti all'uso.

I Calibratori hanno le seguenti concentrazioni: 0 - 6.9 - 62 - 132 - 400 ng/mL.

Le concentrazioni dei Calibratori sono 1000 volte inferiori rispetto a quelle del range di riferimento poiché essi vengono dispensati tal quale mentre i campioni subiscono di una diluizione 1:1000.

Per il calcolo, le concentrazioni dei Calibratori da impostare sullo strumento sono:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
µg/mL	0	6,9	62	132	400

Una volta aperti i Calibratori sono stabili per 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione di IgA Assay Buffer

Diluire il "5X Conc. IgA Assay Buffer" con 160 mL di acqua distillata o deionizzata. Per volumi inferiori rispettare il rapporto di diluizione 1:5. Mantenere a 2-8°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone.

6.3. Preparazione del Coniugato diluito

Preparare immediatamente prima dell'uso.

Diluire 50 µL di 20X Conc. Conjugate (reattivo 4) con 950 µL di Assay Buffer (reattivo 3) diluito. La quantità di coniugato da preparare è proporzionale al numero dei test. Agitare delicatamente per 5 minuti con un oscillatore rotante. Stabile per 3 ore a temperatura ambiente (22-28°C).

6.4. Preparazione della Wash Solution

Diluire la 50X Conc. Wash Solution fino a 1000 mL con acqua distillata o deionizzata.

Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.5. Preparazione del campione

Per la raccolta del campione si consiglia l'utilizzo di tubi in vetro da centrifuga e di una cannuccia di plastica.

Far defluire la saliva attraverso la cannuccia nel tubo di vetro e centrifugare il campione per 15 minuti a 3000 rpm.

Non usare tubi di plastica o dispositivi disponibili in commercio poiché alterano il risultato analitico.

Preparare la soluzione A per ciascun campione diluendo 1:20 il liquido sopranatante della saliva in Assay Buffer diluito (es: 50 µL a 1 mL); successivamente agitare delicatamente ogni soluzione A lasciando almeno 5 minuti su agitatore rotante, e diluirla 1:50 con Assay Buffer diluito (es: 20 µL a 1 mL). Diluizione finale del campione ottenuta: 1:1000.

Mescolare delicatamente lasciando almeno 5 minuti su agitatore rotante.

Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20°C.

6.6. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₄), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibrator C ₀ -C ₄	25 µL		
Campione diluito /Controllo		25 µL	
Coniugato diluito	100 µL	100 µL	
Incubare 1 ora a temperatura ambiente (22÷28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di IgA per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Ogni laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) di ciascun punto della curva di calibrazione (C_0 - C_4) e di ogni campione.

8.2. Calcolo dei risultati – metodo automatico

Utilizzare i metodi: 4 parametri logistici (di preferenza) o *smoothed cubic spline* come algoritmo di calcolo.

8.3. Calcolo dei risultati – metodo manuale

Una curva dose-risposta viene utilizzata per determinare le concentrazioni delle IgA in campioni incogniti.

1. Registrare le OD ottenute dalla stampa del lettore di micropiastre.
2. Tracciare su carta millimetrata una curva dose risposta (DRC) utilizzando la OD media per ciascun calibratore in duplicato contro le corrispondenti concentrazioni di IgA in $\mu\text{g/mL}$.
3. Tracciare la curva che passa per i punti.
4. Per determinare la concentrazione di IgA per un campione incognito (diluito), localizzare la OD media dei duplicati dei campioni incogniti corrispondenti sull'asse verticale del grafico, trovare il punto di intersezione sulla curva e leggere la concentrazione (in $\mu\text{g/mL}$) sull'asse orizzontale del grafico (è possibile ricavare la media dei duplicati del campione incognito come indicato).

9. VALORI DI RIFERIMENTO

In base ai dati di letteratura e ai risultati ottenuti con il kit IgA saliva ELISA Diametra, il range di normalità è:

	IgA saliva
Range normalità	40-170 $\mu\text{g/mL}$

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Sensibilità

La concentrazione minima di IgA saliva misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0.5 $\mu\text{g/mL}$ con un limite di confidenza del 95%.

10.2. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

h IgA	100,0 %
h IgA1	124,5 %
h IgA2	145,5 %
h IgG	<0,3 %
h IgM	<0,3 %

10.3. Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit IgA Saliva ELISA Diametra è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 22 campioni.

La curva di regressione è :

$$y = 1,5865x - 7,614$$

$$r = 0,9478 \quad (r^2 = 0,8984)$$

10.4. Effetto "Hook"

In questo metodo non è stato osservato effetto Hook fino a 600 $\mu\text{g/mL}$ di IgA.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Tomasi, T.B. Jr. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. (1976)
- Ben-Aryeh H., et al Archive of Oral Biol. 35, 929-931 (1990)
- Smith D.J., et al J. Dental Research 66, 451-456 (1987)
- Ventura M.T. et al Allergol Immunopath (madr) 19, 183-185 (1991)
- Kugler J., et al J. Clin. Immunol. 12, 45-49 (1992)
- Jemmott III J.B. et al Behavioral Medicine, 15, 63-71 (1989)
- Gregory R.I., et al J. Period. Research, 27, 176-183 (1992)
- Ruan M.S., Chung-Hua-Kou-Chiang-Hsueh-Tsa-Chin, 25, 158-160 (1990)
- Jemmott III J.B., et al J. Personality and Social Psychology 55, 803-810 (1988)
- Kugler J.A review. Psychotherapy, Psychosomatic Medicine and Psychology, 41, 232-242 (1991)
- Shirtcliff E.A., et al Psychoneuroendocrinology, 26, 165-173 (2001)
- Chard T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques

Ed. 01/2015

DCM078-8

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39.02.2139184
Fax +39.02.2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG)
Italy
Tel. +39.0742.24851
Fax +39.0742.316197
E-mail: info@diametra.com



DCM078-8
Ed. 01/2015

IgA SALIVA ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of IgA concentration in saliva.

IVD



LOT

See external label

2°C - 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO078

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of IgA in saliva.

IgA Saliva ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

IgA represents about 15% to 20% of immunoglobulins in the blood, they are also found in the mucus secreted in the stomach, lungs and intestines. This prevents the microbes to bind to epithelial cells of the respiratory and digestive tract. This immunoglobulin helps to fight against pathogens that contact the body surface, are ingested, or are inhaled. It exists in two forms, IgA1 (90%) and IgA2 (10%) that differ in the structure. IgA1 is found in serum and made by bone marrow B cells, however IgA2 is made by B cells located in the mucosae and has been found to secrete into, colostrum, maternal milk, tears and saliva.

The IgA found in secretions have a special form. They are dimeric molecules, linked by two additional chains. One of these is the J chain (from join), which is a polypeptide of molecular mass 1,5 kD, rich with cysteine and structurally completely different from other immunoglobulin chains. The dimeric form of IgA in the outer secretions also has a polypeptide of the same molecular mass (1,5 kD) called the secretory chain and is produced by epithelial cells.

Decreased or absent IgA, termed *selective IgA deficiency*, can be a clinically significant immunodeficiency.

2. PRINCIPLE

IgA saliva ELISA test is based on the simultaneous binding of human IgA to two antibodies, one monoclonal immobilized on microwell plates and the other polyclonal conjugated with horseradish peroxidase (HRP).

After the incubation the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then the enzyme in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added.

The color intensity is proportional to the IgA concentration in the sample.

The IgA concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (5 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/7806-0
CAL1	REF DCE002/7807-0
CAL2	REF DCE002/7808-0
CAL3	REF DCE002/7809-0
CAL4	REF DCE002/7810-0

2. IgA saliva Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/7803-0

3. 5X Conc. IgA Assay Buffer (1 vial, 40 mL)

Hepes buffer 25 mM pH 7.4; BSA 0,5 g/L

REF DCE049/7849-0

4. 20X Conc. Conjugate (1 vial, 1 mL)

Antibody anti IgA conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/7802-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Antibody anti IgA adsorbed on microplate

REF DCE002/7803-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006B-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents between 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it

immediately after use; once opened, it is stable until the expiry date of the kit. Do not remove the adhesive sheets on the strips unutilized.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of IgA from 0.5 µg/mL to 400 µg/mL.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added

in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.

- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₄)

The Calibrators and Control are ready for use.

The Calibrators have the following concentration:

0 - 6.9 - 62 - 132 - 400 ng/mL.

The Calibrators concentration are 1000 times lower than the values reported in the reference range because the samples are diluted 1:1000, while the Calibrators are not diluted.

The Calibrators concentrations to be entered in the instrument for calculations are:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
µg/mL	0	6,9	62	132	400

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2÷8°C.

6.2. Preparation of IgA Assay Buffer

Dilute the content of the "5X Conc. IgA Assay Buffer" with 160 mL of distilled or deionized water in a suitable storage container. To prepare different volumes respect the dilution ratio 1:5. Store at 2÷8°C until the expiry date printed on the label.

6.3. Preparation of Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 50 µL of conjugate (reagent 4) to 950 µL of diluted IgA Assay Buffer (reagent 3). The quantity of diluted conjugate is proportional at the number of tests. Mix gently for 5 minutes, with rotating mixer. Stable for 3 hours at room temperature (22-28°C).

6.4. Preparation of Wash solution

Dilute the contents of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8°C.

6.5. Preparation of the Sample

For sample collection is advised to use a centrifuge glass tube and a plastic straw.

Let the saliva flow down through the straw into the centrifuge glass tube; then centrifuge at 3000 rpm per 15 minutes.

Do not use plastic tube or commercially available devices for the saliva collection to avoid false results.

Prepare the A solution for each sample by diluting supernatant liquid 1:20 with diluted Assay Buffer (ie: 50 µL up to 1 mL);

then mix gently every A solution by leaving it for at least 5 minutes on a rotating shaker and dilute this 1:50 with diluted Assay Buffer (ie: 20 µL up to 1 mL). Final dilution obtained: 1:1000.

Mix gently by leaving it for at least 5 minutes on a rotating shaker.

If the assay is not carried out in the same day of collection store the saliva at -20°C.

6.6. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₄	25 µL		
Diluted Samples/ Control		25 µL	
Diluted Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate 1 hour at room temperature (22±28°C). Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of IgA for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test

procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C₀-C₄) and of each sample.

8.2. Calculation of Results – Automatic method

To use the method: 4 parameter logistic, sigmoid logistic or smoothed cubic spline like calculation algorithm.

8.3. Calculation of Results – Manual method

A dose response curve is used to ascertain the concentration of IgA in unknown specimens.

1. Record the absorbance obtained from the printout of the microplate reader.
2. Plot the absorbance for each duplicate serum reference versus the corresponding IgA concentration in µg/mL on linear graph paper.
3. Connect the point with a best-fit curve.
4. To determine the concentration of IgA for unknown samples, locate the average absorbance of the duplicates for each unknown sample on the vertical axis of the graph, find the intersecting point on the curve, and read the concentration (in µg/mL) from the horizontal axis of the graph (the duplicates of the unknown may be averaged as indicated).

9. REFERENCE VALUES

Based on the literature data and on the results obtained with the IgA saliva ELISA Diametra kit, the range of normality is:

	IgA saliva
Range of normality	40-170 µg/mL

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10.1. Sensitivity

The lowest detectable concentration of IgA saliva that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.5 µg/mL at the 95% confidence limit.

10.2. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

h IgA	100.0 %
h IgA1	124.5 %
h IgA2	145.5 %
h IgG	<0.3 %
h IgM	<0.3 %

10.3. Correlation with RIA

Diametra IgA saliva ELISA kit was compared to another commercially available IgA assay. 22 serum samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated

$$y = 1.5865x - 7.614$$

$$r = 0.9478 \quad (r^2 = 0.8984)$$

10.4. Hook Effect

Diametra IgA saliva ELISA shows no Hook Effect up to 600 µg/mL.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Tomasi, T.B. Jr. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. (1976)
- Ben-Aryeh H., et al Archive of Oral Biol. 35, 929-931 (1990)
- Smith D.J., et al J. Dental Research 66, 451-456 (1987)
- Ventura M.T. et al Allergol Immunopath (madr) 19, 183-185 (1991)
- Kugler J., et al J. Clin. Immunol. 12, 45-49 (1992)
- Jemmott III J.B. et al Behavioral Medicine, 15, 63-71 (1989)
- Gregory R.I., et al J. Period. Research, 27, 176-183 (1992)
- Ruan M.S., Chung-Hua-Kou-Chiang-Hsueh-Tsa-Chin, 25, 158-160 (1990)
- Jemmott III J.B., et al J. Personality and Social Psychology 55, 803-810 (1988)
- Kugler J.A review. Psychotherapy, Psychosomatic Medicine and Psychology, 41, 232-242 (1991)
- Shirtcliff E.A., et al Psychoneuroendocrinology, 26, 165-173 (2001)
- Chard T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39.02.2139184

Fax +39.02.2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG)
Italy

Tel. +39.0742.24851

Fax +39.0742.316197

E-mail: info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

IT
Spiegazione dei simboli











GB
Explanation of symbols

FR
Explication des symboles

ES
Significado de los simbolos

DE
Verwendete Symbole

PT
Explicação dos simbolos

	<p>DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro</p>		<p>DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por</p>
REF	<p>DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo</p>	 yyyy-mm	<p>DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção</p>
 yyyy-mm-dd	<p>DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)</p>		<p>DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico</p>
	<p>DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso</p>		<p>DE Chargenbezeichnung ESCodigo de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote</p>
 $\Sigma = xx$	<p>DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes</p>		<p>DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit</p>
 Max Min	<p>DE Temperaturbereich ES Límitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação</p>		

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intra-assay elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% inter-assay elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation