

DRABKIN SOLUTION

IVD For In-Vitro diagnostic and professional use only

Store at 2°-8°C

Concentrated 40x

Preparation of Working Solution:

- The working solution is prepared by diluting 1 part of Drabkin's reagent (40x) with 39 parts of distilled water (i.e. 5 ml of Drabkin's reagent (40x) is to be diluted with 195 ml distilled water).
- Protect from light and heat.
- Ready to use solution has a shelf life of 7 days.

Hemoglobin Determination

1. 0.02ml of the test sample/standard is added to 4.0ml of Drabkin's solution.
2. The diluted sample/standard is allowed to stand for 20 minutes and then transferred to a cuvette and the optical density is determined at 540nm against a blank of Drabkin's solution.
3. The optical densities of the standards are then plotted against the Hemoglobin values in g/dl.
4. The value of the sample is determined by interpolation from the graph.

ATLAS MEDICAL

William James House, Cowley Road,
Cambridge, CB4 0WX, UK

Tel: ++44 (0) 1223 858 910,

Fax: ++44 (0) 1223 858 524

PPI074A01

Rev C (2.12.2012)

REF	Catalogue Number		Store at
IVD	For In-Vitro Diagnostic use		Caution
	Number of tests in the pack		Read product insert before use
LOT	Lot (batch) number		Manufacturer
	Fragile, handle with care		Expiry date
	Manufacturer fax number		Do not use if package is damaged
	Manufacturer telephone number		



Signature

ATLAS C-REACTIVE PROTEIN (CRP) LATEX KIT

For the qualitative and semi-quantitative measurement of C-reactive protein (CRP) in human serum.

IVD For in-vitro diagnostic and professional use only

Store at 2-8°C

INTENDED USE

Atlas C-Reactive Protein (CRP) is used to measure the CRP in human serum qualitatively and semi-quantitatively.

INTRODUCTION

C-reactive protein (CRP), the classic acute-phase of human serum, is synthesized by hepatocytes. Normally, it is present only in trace amounts in serum, but it can increase as much as 1,000-fold in response to injury or infection. The clinical measurement of CRP in serum therefore appears to be a valuable screening test for organic disease and a sensitive index of disease activity in inflammatory, infective and ischemic conditions. MacLeod and Avery found that antibody produced against purified CRP provided a more sensitive test than the C-polysaccharide assay. Since that time a number of immunological assays have been devised to measure CRP such as capillary precipitation, double immunodiffusion and radial immunodiffusion.

The CRP reagent kit is based on the principle of the latex agglutination assay described by Singer and Plotz. The major advantage of this method is the rapid two (2) minute reaction time.

PRINCIPLE

The CRP reagent kit is based on an immunological reaction between CRP Antisera bound to biologically inert latex particles and CRP in the test specimen. When serum containing greater than 6 mg/L CRP is mixed with the latex reagent, visible agglutination occurs.

MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CRP Latex Reagent: Latex particles coated with goat IgG anti-human CRP, pH 8.2 **MIX WELL BEFORE USE.**

- CRP Positive Control Serum: A stabilized pre-diluted human serum containing >20mg/L CRP.
- CRP Negative Control Serum: A stabilized pre-diluted animal serum.
- Glass Slides.
- Stirring Sticks.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Mechanical rotator with adjustable speed at 80-100 r.p.m.
- Vortex mixer.
- Pipettes 50 μ L.
- Glycine Buffer (20x): add one part to nineteen parts of distilled water before use.

PRECAUTIONS

- Reagents containing sodium azide may be combined with copper and lead plumbing to form highly explosive metal azides. Dispose of reagents by flushing with large amounts of water to prevent azide buildup.
- For In Vitro diagnostic use.
- Positive and negative controls prepared using human serum found negative for hepatitis B surface antigen (HBsAg) by FDA required test; however, handle controls as if potentially infectious.
- Accuracy of the test depends on the drop size of the latex reagent (40µl). Use only the dropper provided with the latex and hold perpendicularly when dispensing.
- Glass slides should be thoroughly rinsed with water and wiped with lint-free tissue after each use.

STORAGE AND STABILITY

- Reagents are stable until specified expiry date on bottle label when stored refrigerated (2 - 8°C).

DO NOT FREEZE.

- The CRP latex reagent, once shaken must be uniform without visible clumping. When stored refrigerated, a slight sedimentation may occur and should be considered normal.
- Do not use the latex reagent or controls if they become contaminated.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- Use fresh serum collected by centrifuging clotted blood.

- If the test cannot be carried out on the same day, store the specimen for 7 days at 2-8°C and for 3 months at -20°C.
- For longer periods the sample must be frozen.
- As in all serological tests, hemolytic or contaminated serum must not be used.
- Do not use plasma.

PROCEDURE

A. QUALITATIVE TEST:

1. Allow the reagents and samples to reach room temperature. The sensitivity of the test may be reduced at low temperatures.
2. Place 40 μL of the sample and one drop of each Positive and Negative controls into separate circles on the slide test.
3. Mix the CRP-latex reagent vigorously or on a vortex mixer before using and add one drop (40 μL) next to the samples to be tested.
4. Mix the drops with a stirrer, spreading them over the entire surface of the circle. Use different stirrers for each sample.
5. Place the slide on a mechanical rotator at 80-100 r.p.m. for 2 minutes. False positive results could appear if the test is read later than two minutes.

B. SEMI-QUANTITATIVE TEST:

1. Make serial two fold dilutions of the sample in 9 g/L saline solution.
2. Proceed for each dilution as in the qualitative method.

QUALITY CONTROL

Positive and Negative controls are recommended to monitor the performance of the procedure, as well as a comparative pattern for a better result interpretation.

All result different from the negative control result, will be considered as a positive.

INTERPRETATION OF RESULTS

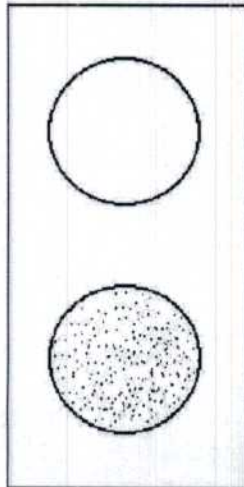
A. QUALITATIVE TEST:

A negative reaction is indicated by a uniform milky suspension with no agglutination as observed with the CRP Negative Control.

A positive reaction is indicated by any observable agglutination in the reaction mixture. The specimen reaction should be compared to the CRP Negative Control (Fig. 1).



Alaoreen!



Positive Negative

Figure 1

B. Semi-QUANTITATIVE TEST:

The approximate CRP concentration in the patient sample is calculated as follow:

6xCRP titer = ---- mg/L

INTERFERENCES

NONE INTERFERING SUBSTANCES:

- Hemoglobin (10g/dl)
- Bilirubin(20mg/dl)
- Lipemia(10g/dl)
- Other substances interfere, such as RF (100IU/ml).

NOTE

- High CRP concentration samples may give negative results .Retest the sample again using a drop of 20µl.
- The strength of agglutination is not indicative of the CRP concentration in the samples tested.
- Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

LIMITATIONS

1. Reaction time is critical. If reaction time exceeds two (2) minutes, drying of the reaction mixture may cause false positive results.
2. Freezing the CRP Latex Reagent will result in spontaneous agglutination.
3. Intensity of agglutination is not necessarily indicative of relative CRP concentration; therefore, screening reactions should not be graded.
4. A false negative can be attributed to a prozone phenomenon (antigen excess). It is recommended, therefore, to check all negative sera by retesting at a 1:10 dilution with glycine buffer.

REFERENCE VALUES

Up to 6 mg/L. Each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- Sensitivity: 6(5-10) mg/L
- Prozone effect: No prozone effect was detected up to 1600 mg/L
- Diagnostic sensitivity: 95.6 %.
- Diagnostic specificity: 96.2 %.

REFERENCES

1. Pepys, M.B.. Lancet 1:653 (1981).
2. Werner, M.. Clin.Chem. Acta 25:299 (1969).
3. MacLeod, C.M., et. al.. J. Exp. Med 73:191 (1941).
4. Wood, HF., et. al.. J. Clin. Invest. 30: 616 (1951).
5. Mancini, G., et. al. Immunochemistry 2:235 (1965).
6. Singer, J.M., et. al.. Am. J. Med 21: 888 (1956).
7. Fischer, C.L., Gill, C.W.. In Serum Protein Abnormalities. Boston, Little, Brown and Co., (1975).

ATLAS MEDICAL

William James House,
Cowley Road, Cambridge,
CB4 0WX, UK

Tel: +44 (0) 1223 858 910

Fax: +44 (0) 1223 858 524

PP1005A01

Rev H (06.06.2017)

REF	Catalogue Number	Store at
IVD	For In-Vitro Diagnostic use	Caution
Σ	Number of tests in the pack	Read product insert before use
LOT	Lot (batch) number	Manufacturer
⚠	Fragile, handle with care	Expiry date
📄	Manufacturer fax number	Do not use if package is damaged
📞	Manufacturer telephone number	



Il Coroneanu

ATLAS RHEUMATOID FACTOR (RF) LATEX KIT

latex slide test for the qualitative and semi-quantitative measurement of RF in human serum.

[IVD] For In-Vitro diagnostic and professional use only

20°C Store at 2-8°C

INTENDED USE

A latex slide test for the qualitative and semi-quantitative measurement of RF in human serum.

INTRODUCTION

Rheumatoid factors (RF) are antibodies directed against antigenic sites in the Fc fragment of human and animal IgG. Their frequent occurrence in rheumatoid arthritis makes them useful for diagnosis and monitoring of the disease.

One method used for rheumatoid factor detection is based on the ability of rheumatoid arthritis sera to agglutinate sensitized sheep red cells, as observed by Waaler and Rose. A more sensitive reagent consisting of biologically inert latex beads coated with human gamma globulin was later described by Singer and Plotz. The RF kit is based on the principle of the latex agglutination assay of Singer and Plotz. The major advantage of this method is rapid performance (2 minute reaction time) and lack of heterophile antibody interference.

PRINCIPLE

The RF reagent is based on an immunological reaction between human IgG bound to biologically inert latex particles and rheumatoid factors in the test specimen. When serum containing rheumatoid factors is mixed with the latex reagent, visible agglutination occurs.

MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- RF Latex Reagent: Latex particles coated with human gamma-globulin, pH, 8.2. Preservative. Contains N, N-dimethylformamide.
- RF Positive Control Serum: Human serum with a RF concentration > 30 IU/mL.Preservative.

- RF Negative Control Serum:Animal serum.
- Preservative.
- Reaction Slide
- Stirring sticks

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Timer
- Test Tubes (for dilution)
- Serological pipettes (for sample addition and for dilution)
- Rotator (optional)
- Glycine Buffer (20x): add one part to nineteen parts of distilled water before use.

PRECAUTIONS

- All reagents contain 0.1 % (w/v) sodium azide as a preservative.
- Reagents containing sodium azide may be combined with copper and lead plumbing to form highly explosive metal azides. Dispose of reagents by flushing with large amounts of water to prevent azide buildup.
- For In Vitro diagnostic use.
- Positive and negative controls prepared using human serum found negative for hepatitis B surface antigen (HBsAg) by FDA required test; however, handle controls as if potentially infectious.
- Accuracy of the test depends on the drop size of the latex reagent (40µl). Use only the dropper supplied with latex and hold it perpendicularly when dispensing.
- Use a clean pipette tip and stirring stick for each specimen, and glass slides should be thoroughly rinsed with water and wiped with lint-free tissue after each use.
- Check reactivity of the reagent using the controls provided.

STORAGE AND STABILITY

- Reagents are stable until specified expiry date on bottle label when stored refrigerated (2-8°C).
- Do not freeze.
- The RF latex reagent, once shaken must be uniform without visible clumping. When stored refrigerated, a slight sedimentation may occur and should be considered normal.
- Do not use the latex reagent or controls if they become contaminated.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- Use fresh serum collected by centrifuging clotted blood.
- If the test cannot be carried out on the same day, store the specimen for 7 days at 2-8°C and for 3 months at -20°C.
- As in all serological tests, hemolytic or contaminated serum must not be used.
- Do not use PLASMA.

PROCEDURE

Qualitative method

- Allow the reagents and samples to reach room temperature. The sensitivity of the test may be reduced at low temperatures.
- Place 50 µL of the sample and one drop of each Positive and Negative controls into separate circles on the slide test.
- Mix the RF-latex reagent rigorously or on a vortex mixer before using and add one drop (50 µL) next to the sample to be tested.
- Mix the drops with a stirrer, spreading them over the entire surface of the circle. Use different stirrers for each sample.
- Place the slide on a mechanical rotator at 80-100 r.p.m. for 2 minutes. False positive results could appear if the test is read later than two minutes.

Semi-quantitative method

- Make serial two fold dilutions of the sample in 9 g/L saline solution.
- Proceed for each dilution as in the qualitative method.

READING AND INTERPRETATION

Examine macroscopically the presence or absence of visible agglutination immediately after removing the slide from the rotator. The presence of agglutination indicates a RF concentration equal or greater than 8 IU/mL (Note 1). The titer, in the semi-quantitative method, is defined as the highest dilution showing a positive result.

CALCULATIONS

The approximate RF concentration in the patient sample is calculated as follows:



Signature

INTERFERENCES

NON INTERFERING SUBSTANCES:

- Hemoglobin (10g/dl)
- Bilirubin(20mg/dl)
- Lipemia(10g/dl)

Other substances may interfere.

QUALITY CONTROL

1. RF Positive and Negative Control should be included in each test batch.
2. Acceptable performance is indicated when a uniform milky suspension with no agglutination is observed with the RF Negative Control and agglutination with large aggregates is observed with the RF Positive Control.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity

8(6-16) IU/ml, under the described assay conditions.

PROZONE EFFECT

No prozone effect was detected up to 1500 IU/ml.

DIAGNOSTIC SENSITIVITY

100%.

DIAGNOSTIC SPECIFICITY

100%.

The diagnostic sensitivity and specificity have been obtained using 118 samples compared with the same method of a computer.

LIMITATIONS

- Reaction time is critical. If reaction time exceeds 2 minutes, drying of the reaction mixture may cause false positive result.
- Freezing the RF Latex Reagent will result in spontaneous agglutination.
- Intensity of agglutination is not necessarily indicative of relative RF concentration; therefore, screening reactions should not be graded.
- Increased levels of RF may be found in some diseases other than rheumatoid arthritis such as infectious mononucleosis, sarcoidosis, lupus erythematosus, Sjogren's syndrome.
- Certain patients with rheumatoid arthritis will not have the RF present in their serum.

- The incidence of false positive results is about 3-5 %.
- Individuals suffering from infectious mononucleosis, hepatitis, syphilis as well as elderly people may give positive results.
- Diagnosis should not be solely based on the results of latex method but also should be complemented with a Waaler Rose test along with the clinical examination.

REFERENCE VALUES

Up to 8 IU/mL. Each laboratory should establish its own reference range.

NOTES

1. Results obtained with a latex method do not compare with those obtained with Waaler Rose test. Differences in the results between methods do not reflect differences in the ability to detect rheumatoid factors.

REFERENCES

1. Robert W Dörner et al. Clinica Chimica Acta 1987; 167: 1 – 21.
2. Frederick Wolfe et al. Arthritis and Rheumatism 1991; 34: 951- 960.
3. Robert H Shmerling et al. The American Journal of Medicine 1991; 91: 528 –534.
4. Adalbert F. Schubart et al. The New England Journal of Medicine 1959; 261: 363 – 368.
5. Charles M. Plotz 1956; American Journal of Medicine; 21:893 – 896.
6. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4th ed. AACC Press, 1995.



ATLAS MEDICAL
William James Hous Cowley Road,
Cambridge, CB4 0WX, UK.
Tel: +44 (0) 1223 858 910
Fax: +44 (0) 1223 858 524
PPI008A01, Rev H (17.06.2017)

REF	Catalogue Number		Store at
IVD	For In-Vitro Diagnostic use	Caution	
	Number of tests in the pack	Read product insert before use	
LOT	Lot (batch) number	Manufacturer	
	Fragile, handle with care	Expiry date	
	Manufacturer fax number	Do not use if package is damaged	
	Manufacturer telephone number		



Handwritten signature



Техпластин-тест

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для определения протромбинового времени
на автоматизированных коагулометрах
(с жидким реагентом на 1000-2000 анал.)

НАЗНАЧЕНИЕ

Техпластин-тест предназначен для оценки протромбинового времени свертывания на автоматизированных коагулометрах. Набор также можно использовать и на полуавтоматических коагулометрах. Определение протромбинового времени используется для тестирования фактора протромбинового комплекса (II - протромбин, V, VII, X) и контроля лечения антикоагулянтами непрямого действия.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода. Протромбин (фактор II, тромбонин) превращает протромбин плазмы крови в присутствии ионов кальция в активный фермент тромбин, трансформирующий фибриноген плазмы крови в нерастворимый фибрин. Измеряется протромбиновое время - время образования фибрина в плазме крови в присутствии ионов кальция и тромбина (экстракта из мозга животных).

Состав набора:

Толпластин (протромбин) - калциевый слес из кроличьего мозга), суспензия 10 мл - 10 фл.

Международный индекс чувствительности (МИЧ) унаследован в паспорте набора. Состав набора данной концентрации МИЧ не зависит. Для получения контрольных значений протромбинового времени свертывания следует использовать ту же партию толпластина плазмы, полученной от 3-5 практических здоровых людей.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Коэффициент вариации результатов определения протромбинового времени не превышает 10 %. Допустимый разброс результатов определения протромбинового времени при работе с образцами крови разных наборов одной серии не превышает 10 %.

МЕРЫ

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора - класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

Все реагенты, входящие в набор, используются только для применения *in vitro*.

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны. Компоненты набора проверены на содержание инактивированного ВИЧ.

Полученный набором материал не имеет опасных для здоровья или пластических свойств, так как образцы плазмы крови человека следует рассасывать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями МУ-287-113.

ОБОРУДОВАНИЕ,

МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ

- Автоматический или полуавтоматический коагулометр;
- дистиллированная вода;
- физиологический (0,9 %) раствор натрия хлорида;
- перчатки резиновые хирургические.

Каталогный номер набора: **735**

ООО фирма "Технология-Стандарт"

440027, Самара, ул. 1381, тел.: Факс: (8482) 22 99 37, 22 99 38, 22 97 12, 27 12 08

ПРИГОТОВЛЕНИЕ

АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Кровь для исследования забирать из локтевой вены в пластиковую или силиконовую пробирку, содержащую 3,8 % раствор натрия лимонноксидного трисеквенного (цитрата натрия), соотношение объема крови и цитрата натрия - 9:1. Кровь центрифугировать при 3000-4000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. В результате получают бедную тромбоцитами плазму, которую переносят в другую пробирку, где хранят до проведения исследования.

Центрифугирование должно проводиться непосредственно после заливки крови, а отбор плазмы на исследование - сразу же после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы, имеющей осадок, гемолиз, коагулат, коагулат цитрата натрия и полученной более 2 ч назад, а также замороженной плазмы крови.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

Толпластин входит в комплект набора (готовый к применению и не требует каких-либо разведений).

Получение контрольной плазмы:

Вариант 1: Бедная тромбоцитами плазма, полученная по описанному методу (см. выше раздел «Приготовление анализируемых образцов») от 3-5 практических здоровых доноров, смешивается в равной пропорции.

Вариант 2: Может быть также использована коммерческая контрольная нормальная плазма, аттестованная по данному показателю.

Контрольную плазму следует использовать для получения нормальных данных и контроля активности Толпластина.

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Информацию об особенностях проведения анализа для определенной модели автоматического коагулометра можно получить в протоколе адаптации, который опубликован на сайте www.technology-standard.ru (в разделе «Протоколы адаптации»). Число определений может отличаться для разных конструкций автоматических коагулометров.

Оформление контрольных (нормальных) показателей на полуавтоматических коагулометрах:

1. В коалету полуавтоматического коагулометра ввести 0,05 мл контрольной плазмы.

2. Инкубировать при температуре +37 °C в течение 1 мин.

3. Добавить 0,1 мл Толпластина, инкубировать при температуре +37 °C, и начать отсчет времени свертывания до образования фибрина.

Аналогично определить протромбиновое время на полуавтоматическом коагулометре в образцах плазмы больных.

Чтение результатов. Результат выражают по одному из следующих вариантов:

1. Подготавливаемое время (**ПВ**) в секундах у больного с указанным значением, полученным при исследовании контрольной плазмы.

В норме протромбиновое время, измеренное на коагулометре, составляет **12-18 с**, при ручной оценке - **15-19 с**.

2. Протромбиновое отношение (ПО)

В норме ПО составляет **0,9-1,3**.

3. Автоматический коагулометр способен вычислить протромбиновое отношение по Канни.

В норме показатель по Канни при использовании Толпластина более **60 %**.

4. Межлабораторное нормализованное отношение (МНО) автоматического коагулометра вычисляет на основе значений ПО и межлабораторного индекса чувствительности (МИЧ), который указан в Паспорте к набору.

Нормальное МНО близко к **1,0**. При лечении антикоагулянтами непрямого действия обычно доводят МНО до **2,0-3,5**, в зависимости от клинических показаний. Чем выше МНО, тем значительнее гипокреуляция и тем чаще и опаснее геморрагические осложнения.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор рассчитан на исследование **1000** образцов плазмы при использовании большинства автоматических и полуавтоматических коагулометров. При использовании некоторых коагулометров (при расходе жидкого Толпластина по 0,05 мл на 1 анализ) число определений увеличивается до **2000**.

Хранение набора должно проводиться при температуре +2... +8 °C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается транспортировка при температуре до +25 °C в течение 30 сут, а также однократное замораживание.

После вскрытия флакона жидкий Толпластин можно использовать при температуре +37 °C не более суток, остаточный

температура +18... +25 °C - не более одной недели или не более 30 дней - при температуре +2... +8 °C.

ЛИТЕРАТУРА

- Бараган З.С., Мошет А.П. Диагностика и контроль рутинных нарушений гемостаза. - М.: "Нисадиамед-АО", 2008. - 292 с.
- Бараган З.С., Мошет А.П., Тараненко И.А., Шибет В.Н. Оценка протромбиновой функции в состоянии гемостатического дисбаланса (показатель протромбинового времени). - М.: "Нисадиамед-АО", 2003. - 48 с.
- Гаранин Е.Н., Андреев Н.А. Стандартизация и контроль качества исследования протромбинового времени (обзор литературы) // Клиник. лаборат. диагностика. - 1994. - № 6. - С. 23-25.
- Мошет А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. - СПб.: Формат, 2006. - 208 с.
- Eberhard F. Maitzel. Мониторинг терапии пероральными антикоагулянтами // Лаборатория. - 1997. - № 7. - С. 10-12.
- Сайт компании www.technology-standard.ru.



Handwritten signature: L. Gorcea



Инструкция по применению набора реагентов для определения концентрации фибриногена в плазме крови (на 100-200 опр.)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для быстрого количественного определения содержания фибриногена в плазме крови (хронометрический метод по Claus) на коагулометре.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода. Заключается в определении времени свертывания плазмы, содержащей фибриноген, тромбина. Время свертывания при этом пропорционально концентрации фибриногена, которую определяют по калибровочной графической.

Состав набора:

1. *Дисперсия* (микрофильно высушенный реагент, 500 ед. NH) - 2 фл.
2. *Растворитель для тромбина*, 10,5 мл - 1 фл.
3. *Калибровочная плазма* с известным содержанием фибриногена (микрофильно высушенная), на 1 мл - 1 фл.
4. *Буфер* *Трис-НСЛ* (концентрированный - 20:1 раствор, 1 M), 10 мл - 1 фл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность определения от 1,0 до 6,0 г/л (без дополнительных разведений плазмы).
Коэффициент вариации результатов определения концентрации фибриногена не превышает 5 %.
Допустимый разброс результатов определения концентрации фибриногена в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10 %.

МЕРЫ

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора - класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000).
Все реагенты, входящие в набор, используются только для применения *in vitro*.
Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны.
При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительно время сохранять и передавать возбудителей инфекционных заболеваний.
Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями МУ-287-113.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ

- Центрифуга лабораторная;
- коагулометр;
- дозаторы пипеточные на 0,05-0,2, 0,2-1,0 и 5,0 мл;
- пробирки стеклянные;
- цилиндр мерный вместимостью 200 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ

АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконизированную пробирку, содержащую 3,8 % раствор натрия лимоннокислого трисеквенного (цитрата натрия), соотношение объема крови и цитрата натрия - 9:1. Кровь центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. В результате получают бесцветную тромбоцитную плазму, которую переносят в другую пробирку, где хранят до проведения исследования.

Каталожный номер набора: **094**

ООО фирма "Технология-Стандарт"

440057, Казань, в/п 1261, "Тех-Фибро" (5882) 22-44-27, 22-44-38, 22-44-38, 22-44-38

Центрифугирование должно проводиться непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы на исследование - сразу же после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы, имеющей сгустки, гемолит, избыток цитрата натрия и полужидкой более 2 ч назад, а также замороженной плазмы крови. Параллельно анализу плазмы разводится рабочая дистиллированная вода в 10 раз (0,2 мл плазмы + 1,8 мл дистиллированной воды).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

1.1. Разведение концентрированного буфера
Содержимое одного флакона с концентрированным буфером трис-НСЛ перенести в мерный цилиндр и довести объем дистиллированной водой до 200,0 мл. В результате получают рабочий раствор буфера.

1.2. Разведение тромбина

В один флакон с тромбином внести 5,0 мл рабочего раствора для тромбина и растворить содержимое при комнатной температуре (+18... +25 °C) и энергичном помешивании в течение 2 мин. В результате получают рабочий раствор тромбина. Тромбин во втором флаконе разводят по необходимости.

1.3. Разведение контрольных плазм

В 80 флакон с контрольной плазмой внести 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре и энергичном помешивании в течение 3 мин. В результате получают контрольную плазму с указанной в *Паспорте к набору* концентрацией фибриногена.

Разведенную контрольную плазму используют для двух равных частей, одну из которых замораживают при температуре -16... -20 °C (для возможного повторного приготовления калибровочных растворов), а вторую разводят в соответствии с приведенной в *Паспорте к набору* схемы.

2. ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

2.1. В коагулометр внести 0,2 мл раствора №1 (см. *Паспорт к набору*).

2.2. Инкубировать при температуре +37 °C в течение 1 мин.

2.3. В ту же коагулометр добавить 0,1 мл рабочего раствора тромбина, имеющего комнатную температуру и начать отсчет времени свертывания.

2.4. Аналогично определить время свертывания с калибровочными растворами №2, №3 и №4.

2.5. По полученным данным построить калибровочную кривую (см. рисунок), где по оси ординат отсчитывают время свертывания (с), а по оси абсцисс - концентрацию фибриногена (г/л) в соответствии с приведенными разведениями.

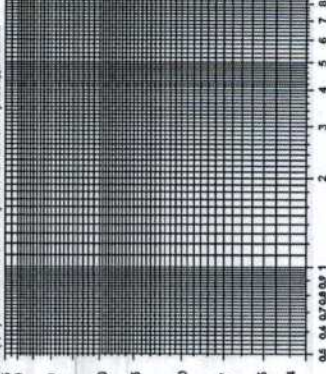


Рис. Калибровочная кривая для построения калибровочной кривой.

3. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

3.1. В коагулометр внести 0,2 мл разведенной (см. раздел "Приготовление анализируемых образцов") исследуемой плазмы.

3.2. Инкубировать при температуре +37 °C в течение 1 мин.

3.3. В ту же коагулометр добавить 0,1 мл рабочего раствора

Инкубацию проводят в термостате коагулометра

тромбина, имеющего комнатную температуру (+18... +25 °C) и начать отсчет времени свертывания.

4. ЧТЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Объемы времени свертывания разведенной исследуемой плазмы составляют 4-40 с. По калибровочной кривой находят концентрацию фибриногена в исследуемом образце (в диапазоне 0,8-6,0 г/л) и умножают на коэффициент разведения для коагулометра, работающего на измеренном расстоянии.

Для коагулометра GCL 2110 фирмы COPIAR (Бразилия) диапазон измеренных концентраций фибриногена, в связи с конструктивными особенностями прибора, составляет 1,2-5,0 г/л.

При определении концентрации фибриногена (в разведенной плазме 1+9), близкой к крайним значениям измеренного диапазона (более 6,0 г/л или менее 0,9 г/л), рекомендуется повторить анализ с другим разведением исследуемого образца плазмы (соответственно 1+19 или 1+4). Далее, полученный по калибровочной кривой результат соответственно уменьшают или увеличивают в 2 раза.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор рассчитан на выполнение 100-200 анализов при расходе раствора тромбина по 0,1-0,05 мл на 1 определение содержания фибриногена.

Хранение набора должно проводиться при температуре +2... +8 °C в течение всего срока годности набора (24 мес). Допускается транспортировка при температуре до +25 °C в течение 30 сут. Запечатывание не допускается.

Время использования набора не должно превышать 1 неделю с момента вскрытия его компонентов.

Раствор тромбина можно хранить при температуре +2... +8 °C не более 3 дней; не замораживать.

Растворитель для тромбина после вскрытия флакона можно хранить при температуре +2... +8 °C не более 1 недели; не замораживать.

Контрольную плазму после разведения можно хранить при комнатной температуре не более 3 ч или не более 1 недели при температуре -16... -20 °C.

Рабочий раствор буфера можно хранить при температуре +2... +8 °C не более 1 мес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Моно А.П. Диагностика и контроль речной терапии нарушений гемостаза. - М.: "Научная мысль", 2008. - 292 с.
2. Моно А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. - СПб.: Форум, 2006. - 208 с.



С. Баркаган



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для
определения активированного парциального
тромбопластинового времени
(жидкий АПТВ-Эл-реагент, на 100-200 опр.)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор АПТВ-Эл-тест предназначен для выполнения базовой методики исследования системы гемостаза - определения активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ или АЧТВ). Определение АПТВ используется для выявления гипер- и гипокоагуляционного сдвига, контроля за гепаринотерапией при тромбозах, тромбоэмболиях и ДВС-синдромах различной этиологии, для диагностики гемофилии (дефицит факторов VIII, IX, XI), болезни Виллебранда.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода. Определяется время свертывания плазмы крови в условиях стандартизированной контактной (эллаговой кислотой) и фосфолипидами (кефалином) активации процесса коагуляции в присутствии ионов кальция.

Состав набора:

1. АПТВ-Эл-реагент (раствор, содержащий фосфолипиды мозга кролика, эллаговую кислоту, буфер и стабилизаторы), 5 мл - 2 фл.
2. Кальция хлорид (0,277 % раствор), 10 мл - 2 фл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность определения - в диапазоне от 20 до 250 с.
Коэффициент вариации результатов определения АПТВ не превышает 10 %.

Допустимый разброс результатов определения АПТВ в одной пробе плазмы крови разными наборами одной серии не превышает 10 %.

Тест чувствителен к присутствию в крови антикоагулянтов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора - класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000).

Все реагенты, входящие в набор, используются только для применения *in vitro*.

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны.

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями МУ-287-113.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ

- Коагулометр (при отсутствии коагулометра - секундомер, водяная баня на +37 °C);
- центрифуга лабораторная;
- пипетки вместимостью 0,1 мл;
- пробирки стеклянные;
- перчатки резиновые хирургические.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконизированную пробирку, содержащую 3,8 % раствор натрия лимоннокислого трёхзамещенного (цитрата натрия), соотношение объемов крови и цитрата натрия - 9:1. Кровь центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. В результате получают бедную тромбоцитами плазму, которую переносят в другую пробирку, где хранят до

Каталожный номер набора: **652**

ООО фирма "Технология-Стандарт"

456037, Барнаул, п/я 1351, тел./факс (3852) 22-99-37, 22-99-38, 22-99-39, 27-13-00

проведения исследования. Центрифугирование должно проводиться непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы на исследование - сразу же после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы крови, имеющей сгустки, гемолиз и полученной более 2 ч назад, а также замороженной плазмы крови.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

АПТВ-Эл-реагент и раствор кальция хлорида входят в комплект набора готовыми к применению и не требуют каких-либо разведений.

Перед проведением исследования один из флаконов с АПТВ-Эл-реагентом необходимо встряхнуть (затем оставить при комнатной температуре (+18... +25 °C)), а необходимый для работы объем кальция хлорида следует отлить в отдельный флакон и прогреть на водяной бане или в термостате коагулометра при температуре +37 °C в течение, как минимум, 10 мин.

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Коагулометрический вариант:

1. В кювету коагулометра внести 0,1 мл исследуемой плазмы и прогреть ее при +37 °C в течение 1 мин.
2. В кювету добавить 0,1 мл АПТВ-Эл-реагента, имеющего комнатную температуру.
3. Через 3 мин к смеси добавить 0,1 мл раствора кальция хлорида (имеющего температуру +37 °C) и зарегистрировать время свертывания (см. также Инструкцию к коагулометру).

Мануальный вариант:

1. К 0,1 мл исследуемой плазмы, взятой в пробирку, добавить 0,1 мл АПТВ-Эл-реагента.
2. Пробирку встряхнуть и поместить на водяную баню при температуре +37 °C.
3. Через 3 мин к смеси добавить 0,1 мл раствора кальция хлорида (имеющего температуру +37 °C) и включить секундомер.
4. Достать пробирку из бани и отметить время свертывания (образования фибрина) при периодическом покачивании пробирки.

Нормативные показатели АПТВ зависят от техники определения. При мануальном тестировании АПТВ в нормальной плазме составляет **23-34 с**, при коагулометрическом - **22-33 с**, в зависимости от типа коагулометра.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор рассчитан на проведение **100-200 определений** при расходе растворов реагентов по 0,1-0,05 мл на 1 анализ.

Хранение набора должно проводиться при температуре +2... +8 °C в течение всего срока годности набора (**18 мес**). Допускается транспортировка при температуре до +25 °C в течение 30 сут. Замораживание не допускается.

АПТВ-Эл-реагент выглядит как гомогенная, слабо опалесцирующая смесь желто-зеленого цвета. При длительном хранении на дне флакона с АПТВ-Эл-реагентом возможно образование тонкого слоя осадка бурого или буро-зеленого цвета, что не изменяет свойств реагента, после легкого взбалтывания реагент выглядит как прежде, т.е. гомогенная, слабо опалесцирующая смесь желто-зеленого цвета.

Во вскрытом флаконе АПТВ-Эл-реагент должен находиться в течение рабочего дня при комнатной температуре, по окончании которого этот реагент следует хранить при температуре +2... +8 °C. Такое чередование температурного режима допускается до полного расходования объема АПТВ-Эл-реагента в одном из флаконов на протяжении 30 дней.

Во вскрытом (но герметично закрываемом) флаконе раствор кальция хлорида следует хранить при температуре +2... +8 °C до полного расходования на протяжении 30 дней. Необходимый (для выполнения исследований на протяжении рабочего дня) объем раствора кальция хлорида необходимо перенести в отдельную пробирку или флакон, где этот раствор хранят при температуре +37 °C в течение 4 ч или при комнатной температуре не более 1 дня. Не допускается сливание остатков этого раствора (после прогревания) во флакон с кальцием хлоридом, хранящимся при температуре +2... +8 °C.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контроль проводимой терапии нарушений гемостаза. - М.: "НьюДиамед-АО", 2008. - 292 с.
2. Момот А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клиничко-лабораторной диагностики. - СПб.: "ФОРМАТ", 2006. - 208 с.



Foresight®

HBsAg EIA Test Kit

Package Insert

REF 1231-1021 English
An enzyme immunoassay (EIA) for the qualitative detection of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) in human serum or plasma.
For professional *in vitro* diagnostic use only.

INTENDED USE

The HBsAg EIA Test Kit is a one step enzyme immunoassay for the qualitative detection of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) in human serum or plasma. It is intended for screening and as an aid in the diagnosis of possible Hepatitis B infection.

SUMMARY

HBsAg is one of the earliest markers that appear in the blood following infection with Hepatitis B virus (HBV). This infection of the liver is transmitted through sexual contact, blood borne exposure, transmission from mother to child during delivery, sharing of objects that pierce the skin, child-to-child and household contact. The four major HBsAg subtypes include adw, adr, ayw, and ayr, all sharing the common determinant 'a'. The HBV infection causes a wide variety of liver damage such as acute self-limiting infection, fulminating hepatitis, chronic hepatitis with progression to cirrhosis and liver failure, and asymptomatic chronic carrier state. In HBV infected people, the virus persists for the rest of their lives and can be passed on to others. Therefore, Hepatitis B has become a global public health problem. Infection with HBV results in the appearance of a number of serological markers and one of the first of such markers is Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). HBsAg appears 1-10 weeks after exposure and before biochemical evidence of liver disease or jaundice.^{1,3} Three weeks after the onset of acute hepatitis almost half of the patients will still be positive for HBsAg. In the chronic carrier state, HBsAg persists for 6-12 months with no seroconversion to the corresponding antibodies. Therefore, screening for HBsAg is highly recommended for all donors, pregnant women and people in high-risk groups.

The HBsAg EIA Test Kit is a third generation immunoassay for the qualitative detection of the presence of Hepatitis B Surface Antigen in serum or plasma specimen. The test utilizes monoclonal antibodies to selectively detect various subtypes of HBsAg in serum or plasma.

PRINCIPLE

The HBsAg EIA Test Kit is a solid phase qualitative enzyme immunoassay based on a sandwich principle for the detection of HBsAg in human serum or plasma. The microwell plate is coated with monoclonal antibodies specific to various subtypes of HBsAg. During testing, the specimen and the enzyme-conjugated HBsAg antibodies are added to the antibody coated microwell plate and incubated. If the specimen contains HBsAg, it will bind to the antibodies coated on the microwell plate and simultaneously bind to the conjugate to form immobilized antibody-HBsAg-conjugate complexes. If the specimen does not contain HBsAg, the complexes will not be formed. After initial incubation, the microwell plate is washed to remove unbound materials. Substrate A and substrate B are added and then incubated to produce a blue color, indicating the amount of HBsAg present in the specimen. Sulfuric acid solution is added to the microwell plate to stop the reaction which produces a color change from blue to yellow. The color intensity, which corresponds to the amount of HBsAg present in the specimen, is measured with a microplate reader at 450/630-700 nm or 450 nm.

PRECAUTIONS

- For professional *in vitro* diagnostic use only. Do not use after expiration date.
- Do not mix reagents from other kits with different lot numbers.
- Avoid cross contamination between reagents to ensure valid test results.
- Follow the wash procedure to ensure optimum assay performance.
- Use Plate Sealer to cover microwell plate during incubation to minimize evaporation.
- Use a new pipet tip for each specimen assayed.
- Ensure that the bottom of the plate is clean and dry and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate. Do not allow wells to dry out during the assay procedure.
- Do not touch the bottom of the wells with pipette tips. Do not touch the bottom of the microwell plate with fingers.
- Do not allow sodium hypochlorite fumes from chlorine bleach or other sources to contact the microwell plate during the assay as the color reaction may be inhibited.
- All equipment should be used with care, calibrated regularly and maintained following the equipment manufacturer's instructions.

HEALTH AND SAFETY INFORMATION

- Some components of this kit contain human blood derivatives. No known test method can offer complete assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents. Therefore, all blood derivatives should be considered potentially infectious. It is recommended that these reagents and human specimens be handled using established good laboratory working practices.
- Wear disposable gloves and other protective clothing such as laboratory coats and eye protection while handling kit reagents and specimens. Wash hands thoroughly when finished.
- ProCin™ 300 is included as a preservative in the Conjugate, Concentrated Wash Buffer, Substrate and Controls. Avoid any contact with skin or eyes.

- Do not eat, drink or smoke in the area where the specimens or kits are handled. Do not pipette by mouth.
- Avoid any contact of the Substrate A, Substrate B, and Stop Solution with skin or mucosa. The Stop Solution contains 0.5M sulfuric acid which is a strong acid. If spills occur, wipe immediately with large amounts of water. If the acid contacts the skin or eyes, flush with large amounts of water and seek medical attention.
- Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for one hour at 121°C. Disposables should be autoclaved or incinerated. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.
- Handle and dispose all specimens and materials used to perform the test as if they contained infectious agents. Observe established precautions against microbiological hazards throughout all the procedures and follow the standard procedures for proper disposal of specimens.
- Observe Good Laboratory Practices when handling chemicals and potentially infectious material. Discard all contaminated material, specimens and reagents of human origin after proper decontamination and by following local, state and federal regulations.
- Neutralized acids and other liquids should be decontaminated by adding sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to a 1.0% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.

STORAGE AND STABILITY

- Unopened test kits should be stored at 2-8°C upon receipt. All unopened reagents are stable through the expiration date printed on the box if stored between 2-8°C. Once opened, all reagents are stable for up to 3 months after the first opening date if stored between 2-8°C. Return reagents to 2-8°C immediately after use.
- Allow the sealed pouch to reach room temperature before opening the pouch and remove the required number of strips to prevent condensation of the microwell plate. The remaining unused strips should be stored in the original resealable pouch with desiccant supplied at 2-8°C and can be used within 3 months of the opening date. Return the remaining unused strips and supplied desiccant to the original resealable pouch, firmly press the seal closure to seal the pouch completely and immediately store at 2-8°C.
- Concentrated Wash Buffer may be stored at room temperature to avoid crystallization. If crystals are present, warm up the solution at 37°C. Working Wash Buffer is stable for 2 weeks at room temperature. Do not expose reagents especially the Substrate to strong light or hypochlorite fumes during storage or incubation steps.
- Do not store Stop Solution in a shallow dish or return it to the original bottle after use.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- The HBsAg EIA Test Kit can be performed using only human serum or plasma collected from venipuncture whole blood.
- EDTA, sodium heparin, and ACD collection tubes may be used to collect venipuncture whole blood and plasma specimens. The preservative sodium azide inactivates horseradish peroxidase and may lead to erroneous results.
- Separate serum or plasma from blood as soon as possible to avoid hemolysis. Grossly hemolytic, lipidic or turbid samples should not be used. Specimen with extensive particulate should be clarified by centrifugation prior to use. Do not use specimens with fibrin particles or contaminated with microbial growth.
- Serum and plasma specimens may be stored at 2-8°C for up to 7 days prior to assaying. For long term storage, specimens should be kept frozen below -20°C.
- Bring specimens to room temperature prior to testing. Frozen specimens must be completely thawed and mixed well prior to testing. Specimens should not be frozen and thawed repeatedly.
- If specimens are to be shipped, they should be packed in compliance with local regulations covering the transportation of etiologic agents.

REAGENTS AND COMPONENTS

Materials Provided

No.	Reagent	Component Description	Quantity
	HBsAg Microwell Plate	Microwell plate coated with Anti-HBsAg	96 wells/kit 1 plate (96 wells/plate)
1	HBsAg Conjugate	Anti-HBsAg bound to peroxidase, Preservative: 0.1% ProCin™ 300	1 x 8 mL 5 x 8 mL
2	Concentrated Wash Buffer (25x)	Tris-HCl buffer containing 0.1% Tween 20, Preservative: 0.1% ProCin™ 300	1 x 40 mL 5 x 40 mL
3	Substrate A	Citrate-phosphate buffer containing hydrogen peroxide, Preservative: 0.1% ProCin™ 300	1 x 8 mL 5 x 8 mL
4	Substrate B	Buffer containing tetramethylbenzidine (TMB), Preservative: 0.1% ProCin™ 300	1 x 8 mL 5 x 8 mL
5	Stop Solution	0.5M Sulfuric acid	1 x 8 mL 5 x 8 mL

6	HBsAg Negative Control	Normal serum non-reactive for HBsAg, HCV, HIV-1, and HIV-2; Preservative: 0.1% ProCin™ 300	1 x 1 mL 5 x 1 mL
7	HBsAg Positive Control	Inactivated serum containing HBsAg and negative for HCV, HIV-1, and HIV-2; Preservative: 0.1% ProCin™ 300	1 x 1 mL 5 x 1 mL
	Plate Sealers		2
	Package Insert		1

Materials Required But Not Provided

- Freshly distilled or deionized water
- Calibrated micropipettes with disposable tips capable of dispensing 50 and 100 µL
- Sodium hypochlorite solution for decontamination
- Absorbent paper or paper towel
- Vortex mixer for specimen mixing (optional)
- Water bath or incubator capable of maintaining 37°C ± 2°C
- Disposable reagent reservoirs
- Calibrated automatic or manual microwell plate washer capable of aspirating and dispensing 350 µL/well
- Automated processor (optional)
- Disposable gloves

DIRECTIONS FOR USE

Allow reagents and specimens to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. The procedure must be strictly followed. Assay must proceed to completion within time limits. Arrange the controls so that well A1 is the Blank well. From well A1, arrange the controls in a horizontal or vertical configuration. The procedure below assigns specific wells arranged in a vertical configuration. Configuration may depend upon software.

Step	Detailed Procedure	Simplified Procedure
	- Prepare Working Wash Buffer by diluting the Concentrated Wash Buffer 1:25. Pour the contents of the bottle containing the concentrated wash buffer in a graduated cylinder and fill it with freshly distilled or deionized water to 1000 mL for 96 wellsplate testing. The Working Wash Buffer is stable for 2 weeks at 15-30°C. - Note: If crystals are present in the Concentrated Wash Buffer, warm it up at 37°C until all crystals dissolve. - Remove unused strips from the microwell plate, and store in the original resealable pouch at 2-8°C. - Leave A1 as Blank well	- Prepare Working Wash Buffer by diluting the Concentrated Wash Buffer 1:25 - Remove and store unused strips at 2-8°C
0	- Leave A1 as Blank well - Add 100 µL of Negative Control in wells B1 and C1. (Blue Reagent)	B1 and C1: Add 100 µL Negative Control
1	- Add 100 µL of Positive Control in wells D1 and E1. (Red Reagent) - Add 100 µL of specimen to assigned wells starting at F1.	- D1 and E1: Add 100 µL Positive Control - Starting F1: Add 100 µL specimen
2	- Add 50 µL of Conjugate to each well except for the Blank well. (Red Reagent) - NOTE: To avoid contamination, drop the conjugate on the bottom of the well vertically, be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip. - Mix gently by swirling the microwell plate on a flat bench for 30 seconds. - Cover the microwell plate with the Plate Sealer and incubate in a water bath or an incubator using one of the following procedures: - Standard Procedure: Incubate at 37°C ± 2°C for 60 minutes ± 2 minutes. - Enhanced Procedure: Incubate at 37°C ± 2°C for 120 minutes ± 2 minutes.	- Add 50 µL of Conjugate to each well except for the Blank well - Incubate at 37°C for 60 min - Enhanced Procedure: Incubate at 37°C for 120 min
3	- Remove the Plate Sealer - Wash each well 5 times with 350 µL of Working Wash Buffer per well, then remove the liquid. - Turn the microwell plate upside down on absorbent tissue for a few seconds. Ensure that all wells have been completely washed and dried. - NOTE: Incomplete wash can cause false positive results. Ensure no less than 5 washing cycles with overlapping of 350 µL/well. Ensure there's no overflow and no liquid is left in the well. Tap out any residual wash fluid on to absorbent paper after washing.	- Remove the Plate Sealer - Wash each well 5 times with 350 µL of Working Wash Buffer - Turn the microwell plate upside down on absorbent tissue
4	- Add 50 µL of Substrate A to each well. - Incubate at 37°C ± 2°C for 60 minutes ± 2 minutes. - Add 50 µL of Substrate B to each well. - Incubate at 37°C ± 2°C for 120 minutes ± 2 minutes.	- Add 50 µL of Substrate A to each well - Add 50 µL of Substrate B to each well





Technical Data

Grams Stain-Kit

K001

Intended Use

Grams Stain Kit is used for differentiation of bacteria on the basis of their gram nature.

Composition **

Ingredients

Gram's Crystal Violet (S012)(Solution A)

Crystal Violet

Ethyl alcohol, 95%

Gram's Crystal Violet (S012)(Solution B)

Ammonium oxalate

Distilled Water

Solution A and B are mixed and stored for 24 hours before use. The resulting stain is stable.

Gram's Decolorizer(S032) -

Ethyl alcohol, 95%

Acetone

Gram's Iodine(S013)

Iodine

Potassium iodide

Distilled water

Safranin, 0.5% w/v(S027)

Safranin O

Ethyl alcohol, 95%

**Formula adjusted, standardized to suit performance parameters

Directions

1) Prepare a thin smear on clear, dry glass slide.

2) Allow it to air dry and fix by gentle heat.

3) Flood with Gram's Crystal Violet (S012) for 1 minute. (If over staining results in improper decolorization of known gram-negative organisms, use less crystal violet)

4) Drain the stain.

5) Flood the smear with Gram's Iodine (S013). Allow it to remain for 1 minute

6) Decolorize with Gram's Decolorizer (S032) until the blue dye no longer flows from the smear.

7) Wash with tap water.

8) Counter stain with 0.5% w/v Safranin (S027). Allow it to remain for 1 minute

9) Wash with water.

10) Allow the slide to air dry or blot dry between sheets of clean bibulous paper and examine under oil immersion objective.

Principle And Interpretation

The Gram stain is a differential staining technique most widely applied in all microbiology disciplines laboratories. It is one of the most important criteria in any identification scheme for all types of bacterial isolates. Different mechanisms have been proposed to explain the gram reaction. There are many physiological differences between gram-positive and gram-negative cell walls (1). Ever since Christian Gram has discovered Gram staining, this process has been extensively investigated and redefined. In practice, a thin smear of bacterial cells is stained with crystal violet, then treated with an iodine containing mordant to increase the binding of primary stain (2). A decolorizing solution of alcohol or acetone is used to remove the crystal violet from cells which bind it weakly and then the counterstain (like safranin) is used to provide a colour contrast in those cells that are decolorized.

Please refer disclaimer Overleaf.

Gram-positive bacteria have a thick mesh-like cell wall made of peptidoglycan (50-90% of cell envelope), and as a result are stained purple by crystal violet, whereas gram-negative bacteria have a thinner layer (10% of cell envelope), so do not retain the purple stain and are counter-stained pink by safranin. In a properly stained smear by gram staining procedure, the gram-positive bacteria appear blue to purple and gram negative cells appear pink to red.

Type of specimen

Clinical samples - Blood, urine, CSF, pus, wounds, lesions, body tissues, sputum etc. ; food & dairy samples ; Water samples

Specimen Collection and Handling

For clinical samples follow appropriate techniques for handling specimens as per established guidelines (3, 4).

For food and dairy samples, follow appropriate techniques for sample collection and processing as per guidelines (5, 6).

For water samples, follow appropriate techniques for sample collection, processing as per guidelines and local standards(7).

After use, contaminated materials must be sterilized by autoclaving before discarding.

Warning and Precautions :

In Vitro diagnostic Use only. Read the label before opening the container. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/ face protection. Follow good microbiological lab practices while handling specimens and culture. Standard precautions as per established guidelines should be followed while handling clinical specimens. Safety guidelines may be referred in individual safety data sheets

Limitations :

1. Use results of Gram stains in conjunction with other clinical and laboratory findings. Use additional procedures (e.g., special stains, inclusion of selective media, etc.) to confirm findings suggested by gram-stained smears (8).
2. False Gram stain results may be related to inadequately collected specimens or delay in transit.
3. Careful adherence to procedure and interpretive criteria is required for accurate results. Accuracy is highly dependent on the training and skill of microscopists (9).
4. The sensitivity of Gram stain is 10^5 cells/ml or 10^4 if the specimen has been prepared with the cytocentrifuge (10). This is particularly applicable to the smear of a drop of urine, where an average of the one bacterial cell per field from an examination of 20 fields correspond to a count of $\geq 10^5$ cfu/ml.

Performance and Evaluation

Performance of the product is expected when used as per the direction on the label within the expiry period when stored at recommended temperature.

Quality Control

Microscopic examination

Gram staining is carried out and observed under oil immersion lens.

Results

Gram-positive organisms : Violet coloured

Gram-negative organisms : Pinkish red coloured

Storage and Shelf Life

Store between 10- 30°C in tightly closed container and away from bright light. Use before expiry date on label. On opening, product should be properly stored in dry ventilated area protected from extremes of temperature and sources of ignition. Seal the container tightly after use.

Disposal

User must ensure safe disposal by autoclaving and/or incineration of used or unusable preparations of this product. Follow established laboratory procedures in disposing of infectious materials and material that comes into contact with clinical sample must be decontaminated and disposed of in accordance with current laboratory regulations (2, 4).

Please refer disclaimer Overleaf.



Alcoran

Reference

1. Lamanna and Mallette, 1965, Basic Bacteriology, 3rd ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore.
2. Salton, 1964, The Bacterial Cell Wall, Elsevier, Amsterdam.
3. Isenberg, H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd Edition.
4. Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Carroll, K.C., Funke, G., Landry, M.L., Richter, S.S. and Wamock, D.W. (2015) Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition, Vol. 1.
5. Downes F. P. and Ito K. (Ed.), 2001, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed., APHA, Washington, D.C.
6. Weir H. M. and Frank J. H., 2004, Standard Methods for the Microbiological Examination of Dairy Products, 17th Ed., APHA Inc., Washington, D.C.
7. Rice E.W., Baird, R.B., Eaton A.D., Clesceri L. S. (Eds.), 2012, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed., APHA, Washington, D.C.
8. Brown, M.S. and T.C. Wu, 1986, The Gram stain morphology of fungi, mycobacteria, and Pneumocystis carinii. J. Med. Technol. 3:495-499.
9. Washington, J.A. 1986 Rapid diagnosis by microscopy. Clin. Microbiol. Newsl. 8:135-137.
10. Shanholtzer, C.J.P. Schaper and L.R. Peterson. 1982. Concentrated Gram stain smear prepared with a cytospin centrifuge. J. Clin. Microbiol. 16:1052-1056

Revision : 02 / 2018

In vitro diagnostic medical device



CE Marking



Storage temperature



Do not use if package is damaged



HIMedia Laboratories Pvt. Limited,
21 Vadhani Industrial Estate,
LBS Marg, Mumbai-40, MS, India

CE Partner 4U, Edoornlaan 13, 3951
DB Maas The Netherlands,
www.cepartner4u.eu



Disclaimer:

User must ensure suitability of the product(s) in their application prior to use. Products conform solely to the information contained in this and other related HIMedia™ publications. The information contained in this publication is based on our research and development work and is to the best of our knowledge true and accurate. HIMedia™ Laboratories Pvt Ltd reserves the right to make changes to specifications and information related to the products at any time. Products are not intended for human or animal or therapeutic use but for laboratory, diagnostic, research or further manufacturing use only, unless otherwise specified. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for infringement of any patents.

HIMedia Laboratories Pvt. Ltd. Reg. office: 23, Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India. Customer care No.: 022-6116 9797 Corporate office: A-516, Swastik Disha Business Park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India. Customer care No.: 022-6147 1919 Email: techhelp@himedialabs.com Website: www.himedialabs.com

