

NovaLisa®

Ascaris lumbricoides IgG

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

English	2
Deutsch	7
Français	12
Italiano	17
Español	22
Português	27
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia	34
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	34
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	35
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	36

Product Number: ASCG0020 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Ascaridae are big nematodes. The male individuals are up to 25 cm, the female ones are up to 40 cm long.

Is among the Ascaridae the species with the highest importance for human medicine, because it is the only one with humans as main host.

The sexually mature roundworm lives in the small intestine. The females produce up to 200 000 eggs daily, which attain to the environment by faeces. Infectious larvae develop inside the eggs and after oral ingestion they hatch in the upper part of the small intestine. They penetrate the wall of the intestine and get into the venous blood with which they get into liver and lung, where they leave the vessels and skin in the aveoles. The larvae migrate into the trachea and through the pharynx after swallowing back to the small intestine where the maturation to the adult worm takes place. Ca. 10-12 weeks after infestation the roundworms will be excreted with faeces. The adult worm lives for around 18 months.

Ascaris lumbricoides is one of the most abundant exciter of infectious diseases worldwide. Main endemic areas are Eastern Asia, Africa and Middle and South America. Children are more often affected than adults. The infestation leads to Ascariasis mostly with latent progression. The migrating larvae can lead to inflammatory, eosinophile infiltration of the lung and cause cough, dyspnoea and light fever. Conglomerates of the worms can cause intestinal blockage. If the worms migrate into gall, pancreas or stomach the corresponding clinical symptoms result.

Species	Disease	Symptoms (e.g.)	Transmission route
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariasis	Adult worms cause no symptoms in general. Conglomerates of worms can cause abdominal pain and ileus. Infection of gall, stomach or pancreas leads to corresponding symptoms. Migrating larvae are able to cause pulmonal symptoms like cough and dyspnoea.	Ingestion of infectious Ascaridae eggs (classical way of infestation is the consumption of insufficient washed salad)

Infection or presence of pathogen may be identified by:

- Microscopy: Detection of eggs in faeces
- Serology: Detection of antibodies by ELISA

2. INTENDED USE

The *Ascaris lumbricoides* IgG ELISA is intended for the qualitative determination of IgG class antibodies against *Ascaris lumbricoides* in human serum or plasma (citrate, heparin).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with *Ascaris lumbricoides* antigens; in resealable aluminium foil.
- **Sample Dilution Buffer:** 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **Washing Buffer (20x conc.):** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled Protein A in phosphate buffer (10 mM); coloured blue, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **Cut-off Control:** 1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **Negative Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

For hazard and precautionary statements see 12.1

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run!

6.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with *Ascaris lumbricoides* antigens. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e.g. 10 mL Washing Buffer + 190 mL distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgG Sample Dilution Buffer. Dispense 10 µL sample and 1 mL IgG Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully before performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of Washing Buffer from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour \pm 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader to **zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these Instructions for Use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < 0.100
- **Negative Control:** Absorbance value < 0.200 and $< \text{Cut-off}$
- **Cut-off Control:** Absorbance value $0.150 - 1.300$
- **Positive Control:** Absorbance value $> \text{Cut-off}$

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43
Cut-off = 0.43

9.2.1. Results in Units [NTU]

$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec Units} = \text{NTU}]$

Example: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ NTU}$

9.3. Interpretation of Results

Cut-off	10 NTU	-
Positive	> 11 NTU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 NTU	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative .
Negative	< 9 NTU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.
In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

For further information about the specific performance characteristics please contact NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precision

Intraassay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	24	0.295	3.54
#2	24	0.539	4.55
#3	24	0.657	6.16

Interassay	n	Mean (NTU)	CV (%)
#1	12	18.48	2.77
#2	12	6.35	8.02
#3	12	22.58	4.03

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 95.0 % (95% confidence interval: 87.69% - 98.62%).

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 100 % (95% confidence interval: 47.82% - 100%).

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/mL hemoglobin, 5 mg/mL triglycerides and 0.5 mg/mL bilirubin.

10.5. Cross Reactivity

Cross reaction with antibodies against *Toxocara canis*, *Trichinella*, *Fasciola*, *Filaria* and *Strongyloides* cannot be excluded.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or Microtiterplates of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

12.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



H317	May cause an allergic skin reaction.
P261	Avoid breathing spray.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P362+P364	Take off contaminated and Wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet

12.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: ASCG0020

Ascaris lumbricoides IgG ELISA (96 Determinations)

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

Askariden oder Spulwürmer sind große Nematoden (Rundwürmer). Die männlichen Individuen können bis zu 25 cm, die weiblichen bis zu 40 cm lang werden. *Ascaris lumbricoides* kommt unter den Askariden die größte humanmedizinische Bedeutung zu, da dieser der einzige ist, bei dem der Mensch als Hauptwirt auftritt.

Die geschlechtsreifen, getrenntgeschlechtlichen Spulwürmer leben im Dünndarm. Die weiblichen Individuen produzieren täglich bis zu 200 000 Eier, die mit den Fäzes an die Umwelt verbracht werden. In diesen entwickelt eine infektiöse Larve, die nach oraler Aufnahme der Eier im oberen Dünndarm schlüpft, die Darmwand durchdringt, Anschluß an das venöse Blutgefäßsystem findet und über die Leber in die Lunge gelangt. Dort verlassen sie das Gefäßsystem und häuten sich in den Alveolen. Die Larven wandern dann in den luftführenden Systemen der Lunge zur Trachea und gelangt über den Pharynx nach Verschlucken wieder in den Dünndarm, wo die Reifung zum adulten Wurm erfolgt. Etwa 10-12 Wochen nach der Infestation werden Spulwürmer im Stuhl ausgeschieden. Adulte Askariden werden ca. 18 Monate alt.

Acaris lumbricoides ist einer der weltweit häufigsten Erreger von Infektionskrankheiten. Hauptendemiegebiete finden sich in Ländern Ostasiens, Afrikas und Lateinamerikas. Kinder sind häufiger betroffen als Erwachsene.

Die Infestation führt zur Askariose, einer meist latent verlaufenden Krankheit. Die wandernden Larven können zu entzündlichen, eosinophilen Infiltrationen (Löfflersches Infiltrat) in der Lunge führen und Ursache von Husten, Dyspnoe und leichtem Fieber sein. Würmerkonglomerate können einen Darmverschluss (Wurmileus) bewirken, wandern Würmer in die Gallenwege, ins Pankreas oder den Magen, resultieren entsprechende klinische Erscheinungsbilder (z.B. Ikterus durch Abflußstörungen der Gallenwege, etc.).

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Askariose	Adulte Würmer verursachen in der Regel keine Symptome. Würmerkonglomerate können Ursache von Abdominalschmerzen und eines Ileus sein. Befall von Gallengang, Magen, Pankreas führt zu entsprechenden Symptomen. Wandernde Larven können pulmonale Symptome verursachen (z.B. Husten, Dyspnoe).	Aufnahme infektiöser Askariden-Eier (klassischer Weg der Aufnahme ist der Genuss von schlecht gewaschen Salates)

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Mikroskopie: Nachweis von Eiern in Stuhl
- Serologie: Nachweis von Antikörpern mittels ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Der *Ascaris lumbricoides* IgG ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen *Ascaris lumbricoides* in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschriff wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

NovaLisa[®]

Toxocara canis IgG

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

English	2
Deutsch	7
Français	12
Italiano	17
Español	22
Português	27
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia	34
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	34
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	35
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	36

Product Number: TOCG0450 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Toxocara canis (an ascarid) is a parasitic nematode (roundworm) commonly found in the intestine of dogs. Humans are paratenic hosts who become infected by ingesting infective eggs in contaminated soil. After ingestion, the eggs yield larvae that penetrate the intestinal wall and are carried by the circulation to a wide variety of tissues (liver, heart, lungs, brain, muscle, eyes). While the larvae do not undergo any further development in these sites, they can cause several local reactions that are the basis of toxocariasis.

In most cases, *Toxocara* infections are not serious, and many people, especially adults infected by a small number of larvae (immature worms), may not notice any symptoms. The most severe cases are rare, but are more likely to occur in young children, who often play in dirt, or eat dirt contaminated by dog stool. The two main clinical presentations of toxocariasis are Ocular Larva Migrans (OLM), an eye disease that can cause blindness (each year more than 700 people infected with *Toxocara* experience permanent partial loss of vision), and Visceral Larva Migrans (VLM), a disease that causes swelling of ancillary body's organs or central nervous system

Species	Disease	Symptoms (e.g.)	Transmission route
<i>Toxocara canis</i>	Toxocariasis	Abdominal pain, gastrointestinal symptoms, weakness, prurits	Infection after ingesting infective <i>Toxocara</i> eggs from larvae in soil or other contaminated surfaces.
	Ocular larva migrans (OLM)	Visual disturbance, endophthalmitis, retinal granuloma	
	Visceral larva migrans (VLM)	Fever, hepatomegaly, coughing, asthma or pneumonia	

Infection or presence of pathogen may be identified by:

- Microscopy
- Serology: Detection of antibodies by ELISA

2. INTENDED USE

The *Toxocara canis* IgG ELISA is intended for the qualitative determination of IgG class antibodies against *Toxocara canis* in human serum or plasma (citrate, heparin).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with *Toxocara canis* antigens; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Dilution Buffer:** 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **Washing Buffer (20x conc.):** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 20 mL of peroxidase Protein A in phosphate buffer (10 mM); coloured blue; ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **Cut-off Control:** 1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **Negative Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

For hazard and precautionary statements see 12.1

For potential hazardous substances, please check the safety data sheet.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplate
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run!

6.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with *Toxocara canis* antigens. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e. g. 10 mL Washing Buffer + 190 mL distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37°C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgG Sample Dilution Buffer. Dispense 10 µL sample and 1 mL IgG Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of Washing Buffer from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour \pm 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25°C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these Instructions for Use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value **< 0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value **< 0.200 and $< \text{Cut-off}$**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **$0.150 - 1.300$**
- **Positive Control:** Absorbance value **$> \text{Cut-off}$**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control $0.44 + \text{absorbance value Cut-off control } 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43$
Cut-off = 0.43

9.2.1. Results in Units [NTU]

$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec Units} = \text{NTU}]$

Example: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ NTU}$

9.3. Interpretation of Results

Cut-off	10 NTU	-
Positive	> 11 NTU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 NTU	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative .
Negative	< 9 NTU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.
In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

For further information about the specific performance characteristics please contact NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precision

Intraassay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	24	0.516	3.61
#2	24	0.904	2.90
#3	24	1.061	2.20

Interassay	n	Mean (NTU)	CV (%)
#1	12	18.81	4.83
#2	12	21.65	7.01
#3	12	2.23	12.17

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 98.63% (95% confidence interval: 96.52% - 99.62%).

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 96.92% (95% confidence interval: 89.32% - 99.63%).

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/mL hemoglobin, 5 mg/mL triglycerides and 0.5 mg/mL bilirubin.

10.5. Cross Reactivity

Cross reactivity with antibodies against *Ascaris lumbricoides* and *Schistosoma* cannot be excluded.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

12.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



H317	May cause an allergic skin reaction.
P261	Avoid breathing spray
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P362+P364	Take off contaminated and Wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

12.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: TOCG0450 Toxocara canis IgG ELISA (96 Determinations)

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

Toxocara canis ist ein Nematode (Rundwurm, Fadenwurm) der Familie der Ascarididae. Ascariden oder Spulwürmer sind große Rundwürmer. Die männlichen Individuen können bis zu 25 cm, die weiblichen bis zu 40 cm lang werden. *Toxocara canis* findet sich gewöhnlich bei Hunden. Befallen seine Larven den Menschen entwickelt sich das Larva-migrans-visceralis-Syndrom.

Die Infektion wird durch orale Aufnahme von Wurmeiern mit Erde, Sand, Nahrungsmitteln oder Wasser initiiert. Nach Ingestion schlüpfen die Larven, die die Darmwand durchbrechen und alle Organe des Menschen besiedeln können. Die meisten Hundespulwurminfektionen verlaufen unbemerkt, einige Infizierte haben jedoch bis zu mehrere Monate andauernde Symptome. Dazu zählen Eosinophilie und Hepatomegalie oder Fieberintervalle, gastro-intestinale Störungen, Asthma, cardiale Symptomatik, Lymph-adenopathie und urtikarielle Hautveränderungen, verbunden mit Leukozytose. Befall der Augen führt zu Endophthalmitis oder Chorioretinitis, die in eine Erblindung münden können. Zentralnervöse Störungen bedingen Lähmungen oder epileptiforme Anfälle. Die Infektion kann auch latent verlaufen. Etwa die Hälfte aller klinisch manifesten Fälle betrifft das Auge (Visusverlust).

Toxocara canis ist weltweit verbreitet. Neben Hundehaltern sind vor allem Kleinkinder betroffen

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
<i>Toxocara canis</i>	Toxocariasis	Bauchschmerzen, gastrointestinale Symptome, Schwäche, Pruritus	Infektion nach Einnahme von infektiösen <i>Toxocara</i> -Eiern aus Larven im Boden oder anderen kontaminierten Oberflächen.
	Larva Migrans ocularis (auf english OLM)	Sehstörungen, Endophthalmitis, Netzhaut-Granulom	
	Larva-migrans-visceralis-Syndrom	Fieber, Hepatomegalie, Husten, Asthma oder Lungenentzündung	

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Mikroskopie:
- Serologie: Nachweis der Antikörper mittels ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Der *Toxocara canis* IgG ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen *Toxocara canis* in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschrift wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов классов А, М, G
к антигенам лямблий
в сыворотке (плазме) крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Утверждена 21.07.2011
приказом Росздравнадзора № 4449-Пр/11

Лямблия-антитела – ИФА – БЕСТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-3552

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Лямблия-антитела-ИФА-БЕСТ предназначен для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов классов А (IgA), М (IgM), G (IgG) к антигенам лямблий в сыворотке (плазме) крови.

1.2. Лямблиоз – часто встречающееся паразитарное заболевание тонкого кишечника человека, вызываемое *Ciardia lamblia* – представителем семейства *Protozoe*. Лямблии существуют в двух отдельных формах – цистах (статическая форма) и трофозитах (пролиферативная форма).

1.3. Заражение человека происходит оральным путем, при попадании цист лямблий в желудочно-кишечный тракт. Источник инвазии – некипяченая питьевая вода, вода водоемов, немытые фрукты и овощи, грязные руки и контакт с домашними животными.

Традиционно диагностика лямблиоза проводится микроскопическим методом по обнаружению цист или трофозитов в образцах фекалий или дуоденальном содержимом.

Дополнительным методом диагностики лямблиоза является иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на обнаружении в крови инвазированного антител, специфичных к антигенам лямблий.

Определение иммуноглобулинов различных классов к антигенам лямблий целесообразно дополнительно включать в комплексное

обследование детей с аллергическими симптомами, дерматитами, с гастродуоденитами, а также часто болеющих детей. Это способствует более надежному выявлению лямблиозной инвазии, позволяет своевременно провести специфическое лечение и в последующем осуществить контроль его эффективности.

1.4. Набор рассчитан на проведение 96 анализов образцов сыворотки (плазмы) крови, включая контроли, или 12 независимых постановок ИФА по 8 определений, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения суммарных антител к антигенам лямблий представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ. Специфическими компонентами набора реагентов являются антигены лямблий, иммобилизованные в лунках планшетов, конъюгат моноклональных антител к IgA, IgM, IgG человека с пероксидазой хрена, положительный и отрицательный контрольные образцы.

На первой стадии анализа при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами лямблий происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-антитело» на поверхности лунок. После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и добавления в лунки планшета конъюгата

моноклональных антител к IgA, IgM, IgG человека с пероксидазой хрена происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс. После второй отмывки количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-волна в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации суммарных антител к антигенам лямблий в анализируемом образце сыворотки.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антигенами лямблий, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgA, IgM, IgG к антигенам лямблий, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgA, IgM, IgG к антигенам лямблий, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);

- конъюгат моноклональных антител к IgA, IgM, IgG человека с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,5 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 5–200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Перекрестные реакции при описторхозе, токсокарозе, эхинококкозе, трихинеллезе, аскаридозе не выявлены.

3.2. Специфическая активность

Чувствительность выявления иммуноглобулинов классов А, М, G к антигенам лямблий – соответствие результатов выявления набором IgA, IgM, IgG к антигенам лямблий требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-134), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с положительными сыворотками больше либо равны величине диагностического значения оптической плотности.

Специфичность выявления иммуноглобулинов классов А, М, G к антигенам лямблий – соответствие результатов выявления набором IgA, IgM, IgG к антигенам лямблий требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-134), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с отрицательными сыворотками меньше либо равны величине диагностического значения оптической плотности, умноженного на 0,85.

3.3. Титр стандартного образца предприятия СОП+ (рег. № 05-2-17), аттестованного ОБТК АО «Вектор-Бест», должен быть не менее 1:800.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как в состав набора входят компоненты крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , дioxлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $37 \pm 1^\circ C$;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать

- объемы жидкостей от 5 мкл до 200 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования;
- промывочное устройство для планшетов;
 - перчатки резиновые или пластиковые;
 - бумага фильтровальная лабораторная;
 - флаконы вместимостью 15 мл;
 - цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
 - вода дистиллированная;
 - дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови. После размораживания образцы тщательно перемешать.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25°C в течение времени не менее 60 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление рабочего буферного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный рабочий буферный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного (K^+) и отрицательного (K^-) контрольных образцов

Контрольные образцы готовы к использованию. Перед использованием встряхнуть.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.5. Предварительное разведение исследуемых образцов

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать. При этом темно-красный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, ИФА данного образца может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

Предварительно разведенные исследуемые образцы можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 ч.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовится в отдельном чистом флаконе или в пластиковой ванночке для реагента из концен-

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во одновременно используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидаина		Рабочий буферный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	РБР, мл	ТМБ, концентрат, мл	СБР, мл	ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистил. вода, мл
1	0,1	1,0	0,05	1,0	2,0	до 50
2	0,2	2,0	0,10	2,0	4,0	до 100
3	0,3	3,0	0,15	3,0	6,0	до 150
4	0,4	4,0	0,20	4,0	8,0	до 200
5	0,5	5,0	0,25	5,0	10,0	до 250
6	0,6	6,0	0,30	6,0	12,0	до 300
7	0,7	7,0	0,35	7,0	14,0	до 350
8	0,8	8,0	0,40	8,0	16,0	до 400
9	0,9	9,0	0,45	9,0	18,0	до 450
10	1,0	10,0	0,50	10,0	20,0	до 500
11	1,1	11,0	0,55	11,0	22,0	до 550
12	1,2	12,0	0,60	12,0	24,0	до 600

трата конъюгата и рабочего буферного раствора не более, чем за 5–10 мин до окончания первой инкубации.

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 ч.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.7. Приготовление рабочего раствора ТМБ

Готовится в отдельном чистом флаконе или в пластиковой ванночке для реагента из концентрата ТМБ и СБР не более, чем за 5-10 мин до окончания первой инкубации.

Рабочий раствор ТМБ можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 ч.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Внимание! *Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.*

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

7.9. Внесение контрольных образцов

В лунку А-1 внести 100 мкл положительно-го контрольного образца (K^+). В лунки В-1 и С-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-).

7.10. Внесение исследуемых образцов сыворотки (плазмы)

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 7.5.), тщательно перемешать.

Для повышения достоверности результатов исследуемые образцы рекомендуется анализировать в дублях, используя для каждого образца по две лунки.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 5–7 мин.

7.10.1. Определение титра исследуемых образцов

При определении титра антител тестирование исследуемых образцов произвести в семи последовательных двукратных разведениях в интервале от 1:100 до 1:12800. В соответствующие лунки горизонтального ряда А внести по 180 мкл РРС и по 20 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 7.5.), тщательно перемешать. В соответствующие лунки рядов В–Н внести по 100 мкл РРС. Каждый образец титровать, перенося по 100 мкл раствора из лунок предыдущего ряда в лунки последующего от А до Н, тщательно перемешивая пипетированием. После раститровки из каждой лунки последнего ряда Н удалить в дезинфицирующий раствор по 100 мкл раствора, оставляя в лунках по 100 мкл.

7.11. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.12. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

Оставшийся после проведения ИФА рабочий раствор конъюгата из флакона или пластиковой ванночки удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором.

7.14. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.15. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет, как указано в п. 7.12.

7.16. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (см п. 7.7.).

Для внесения рабочего раствора ТМБ использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

Планшет инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°C.

Оставшийся после проведения ИФА рабочий раствор ТМБ удалить из стеклянного флакона или пластиковой ванночки в сосуд с дезинфицирующим раствором.

7.17. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 5 мин после остановки реакции.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{cp}K^-$).

9.2. Среднее значение ОП в лунках с K^- не должно превышать 0,30 ед. опт. пл.

Значение ОП в лунке с K^+ должно быть не менее, чем 0,80 ед. опт. пл.

9.3. Только при соблюдении положений п. 9.2. можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.4. На основании полученных данных вычислить диагностическое значение оптической плотности ($ОП_{д}$).

$$ОП_{д} = ОП_{ср. K^-} + 0,2$$

9.5. Результат анализа считается **положительным**, если $ОП_{обр.} \geq ОП_{д}$.

Результат анализа считается **отрицательным**, если $ОП_{обр.} \leq 0,85 \times ОП_{д}$.

где $ОП_{обр.}$ – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом сыворотки (плазмы) крови.

Результат анализа считается **сомнительным**, если $0,85 \times ОП_{д} < ОП_{обр.} < ОП_{д}$. Рекомендуется повторно провести иммуноферментный анализ данного образца.

9.6. За титр положительной сыворотки (плазмы) принимают ее наибольшее разведение, при котором оптическая плотность образца $ОП_{обр.} \geq ОП_{д}$.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности (9 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности набора:

- неиспользованные стрипы после первого вскрытия пакета можно хранить в закрытом на замок пакете при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор, раствор для разведения сывороток, раствор для предварительного разведения сывороток, концентрат конъюгата, концентрат тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- положительный и отрицательный контрольные образцы можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;

- рабочий буферный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток;
- рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 ч;
- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 ч.

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

По вопросам, касающимся качества набора «Лямблия-антитела-ИФА-БЕСТ»,
обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:
630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 363-13-46,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащиеся в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

Антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют.

Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности.

Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации иммуноглобулинов классов А, М и G в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

1. Гарантийные обязательства

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

2. Обеспечение безопасности персонала

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать в соответствии п. 4.7 настоящей инструкции и согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998).

Порядок утилизации или уничтожения компонентов набора

При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии

с СанПиНом 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

3. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

- не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

- ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором субстрата;

- избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

- рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

- никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и рабочего раствора ТМБ;
- перед отбором ТМБ из флакона необходимо обрабатывать конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флаконов с СБР и ТМБ;
- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

- Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.
- Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.
- Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.
- Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

– Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

4. Количественная оценка результатов анализа

Результаты анализа можно оценить по коэффициенту позитивности (КП), рассчитывая отношение ОП в лунке с образцом пациента относительно ОП_д. (п. 9.4.).

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих ОП₄₅₀ ≤ 3,5 о.е., использовать формулу:

$$\text{КП}_{\text{обр.}} = \frac{\text{ОП}_{450 \text{ обр.}}}{\text{ОП}_{\text{д}}},$$

где ОП_{450 обр.} – ОП образца, полученная в двухволновом режиме 450 / 620–655 нм (или только с фильтром 450 нм).

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих ОП₄₅₀ > 3,5 о.е., использовать формулу:

$$\text{КП}_{\text{обр.}} = 3,2 \times \frac{\text{ОП}_{450 \text{ обр.}}}{\text{ОП}_{\text{д}}},$$

где ОП_{405 обр.} – ОП образца, полученная в двухволновом режиме 405 / 620–655 нм (или только с фильтром 405 нм).

Результат анализа **положительный**, если $KП_{обр.} \geq 1$, где $KП_{обр.}$ – коэффициент позитивности исследуемого образца.

Результат анализа **отрицательный**, если $KП_{обр.} \leq 0,85$.

Результат анализа **сомнительный**, если соответствующее ему значение $KП_{обр.}$ попадает в интервал от 0,85 до 1,0.

Расчет КП целесообразно проводить для оценки концентрации специфических антител в исследуемых образцах и при наблюдении за изменением концентрации суммарных антител к антигенам лямблий в динамике в парных образцах сывороток.

5. Диагностическая значимость полученных результатов











Лямблии обитают в проксимальном отделе тонкой кишки, поэтому для лямблиоза характерно развитие местных иммунологических реакций. Однако и в сыворотках крови инвазированных лямблиями людей выявляются антитела к антигенам лямблий, относящиеся к различным классам иммуноглобулинов. Показано, что попадание антигенов лямблий в периферическую кровь увеличивается при резорбции слизистой оболочки кишечника, проницаемость которой, как известно, возрастает при ее воспалении. В связи с этим выявление антител к антигенам лямблий в сыворотке крови может свидетельствовать о наличии патологического процесса.

**6. Краткая схема проведения ИФА
для набора реагентов
«Лямблия-антитела-ИФА-БЕСТ»**

*Использовать только после тщательного
ознакомления с инструкцией!*

- Внести:** по 100 мкл K^+ и K^- ;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл
предварительно разведенных
анализируемых образцов.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** рабочим буферным раствором,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора
конъюгата.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** рабочим буферным раствором,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора
тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная
длина волны 620–655 нм.

7. Графические символы

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до ...		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 363-35-56.

14.05.18.

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»

Международный сертификат ISO 13485

НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИФА

Вирусные гепатиты А, В, С, D, E;
ВИЧ-инфекция; ИППП; ТОРСН-инфекции;
герпесвирусные инфекции; беременность;
аутоиммунные, системные, паразитарные,
желудочно-кишечные заболевания;
гормоны; опухолевые и кардиомаркеры;
цитокины, аллергены и др.

***Точная диагностика –
эффективное лечение!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

Internet: www.vector-best.ru

HBsAg_{one}

Version ULTRA

**Fourth generation Enzyme
Immunoassay (ELISA)
for the determination of
Hepatitis B surface Antigen or HBsAg
in human serum and plasma**

- for "in vitro" diagnostic use only -



DIA.PRO
Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

HBsAg One version ULTRA

A. INTENDED USE

Fourth generation Enzyme Immunoassay (ELISA) for the one-step determination of Hepatitis B surface Antigen or HBsAg in human plasma and sera.

The kit is intended for the screening of blood units, is able to detect HBsAg mutants and finds application in the follow-up of HBV-infected patients.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) defines Hepatitis B Virus infection as follows:

"Hepatitis B is one of the major diseases of mankind and is a serious global public health problem. Hepatitis means inflammation of the liver, and the most common cause is infection with one of 5 viruses, called hepatitis A,B,C,D, and E. All of these viruses can cause an acute disease with symptoms lasting several weeks including yellowing of the skin and eyes (jaundice); dark urine; extreme fatigue; nausea; vomiting and abdominal pain. It can take several months to a year to feel fit again. Hepatitis B virus can cause chronic infection in which the patient never gets rid of the virus and many years later develops cirrhosis of the liver or liver cancer.

HBV is the most serious type of viral hepatitis and the only type causing chronic hepatitis for which a vaccine is available. Hepatitis B virus is transmitted by contact with blood or body fluids of an infected person in the same way as human immunodeficiency virus (HIV), the virus that causes AIDS. However, HBV is 50 to 100 times more infectious than HIV. The main ways of getting infected with HBV are: (a) perinatal (from mother to baby at the birth); (b) child- to-child transmission; (c) unsafe injections and transfusions; (d) sexual contact.

Worldwide, most infections occur from infected mother to child, from child to child contact in household settings, and from reuse of un-sterilized needles and syringes. In many developing countries, almost all children become infected with the virus. In many industrialized countries (e.g. Western Europe and North America), the pattern of transmission is different. In these countries, mother-to-infant and child-to-child transmission accounted for up to one third of chronic infections before childhood hepatitis B vaccination programmes were implemented. However, the majority of infections in these countries are acquired during young adulthood by sexual activity, and injecting drug use. In addition, hepatitis B virus is the major infectious occupational hazard of health workers, and most health care workers have received hepatitis B vaccine.

Hepatitis B virus is not spread by contaminated food or water, and cannot be spread casually in the workplace. High rates of chronic HBV infection are also found in the southern parts of Eastern and Central Europe. In the Middle East and Indian sub-continent, about 5% are chronically infected. Infection is less common in Western Europe and North America, where less than 1% are chronically infected.

Young children who become infected with HBV are the most likely to develop chronic infection. About 90% of infants infected during the first year of life and 30% to 50% of children infected between 1 to 4 years of age develop chronic infection. The risk of death from HBV-related liver cancer or cirrhosis is approximately 25% for persons who become chronically infected during childhood. Chronic hepatitis B in some patients is treated with drugs called *interferon* or *lamivudine*, which can help some patients. Patients with cirrhosis are sometimes given liver transplants, with varying success. It is preferable to prevent this disease with vaccine than to try and cure it.

Hepatitis B vaccine has an outstanding record of safety and effectiveness. Since 1982, over one billion doses of hepatitis B vaccine have been used worldwide. The vaccine is given as a series of three intramuscular doses. Studies have shown that the vaccine is 95% effective in preventing children and adults from developing chronic infection if they have not yet been infected. In many countries where 8% to 15% of children used to become chronically infected with HBV, the rate of chronic infection has been reduced to less than 1% in immunized groups of children. Since 1991, WHO has called for all countries to add hepatitis B vaccine into their national immunization programs."

Hepatitis B surface Antigen or HBsAg is the most important protein of the envelope of Hepatitis B Virus, responsible for acute and chronic viral hepatitis.

The surface antigen contains the determinant "a", common to all the known viral subtypes, immunologically distinguished by two distinct subgroups (ay and ad).

The ability to detect HBsAg with high sensitive immunoassays in the last years has led to an understanding of its distribution and epidemiology worldwide and to radically decrease the risk of infection in transfusion.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

A mix of mouse monoclonal antibodies specific to the determinants "a", "d" and "y" of HBsAg is fixed to the surface of microwells. Patient's serum/plasma is added to the microwell together with a second mix of mouse monoclonal antibodies, conjugated with Horseradish Peroxidase (HRP) and directed against a different epitope of the determinant "a" and against "preS".

The specific immunocomplex, formed in the presence of HBsAg in the sample, is captured by the solid phase.

At the end of the one-step incubation, microwells are washed to remove unbound serum proteins and HRP conjugate.

The chromogen/substrate is then added and, in the presence of captured HBsAg immunocomplex, the colorless substrate is hydrolyzed by the bound HRP conjugate to a colored end-product. After blocking the enzymatic reaction, its optical density is measured by an ELISA reader.

The color intensity is proportional to the amount of HBsAg present in the sample.

The version ULTRA is particularly suitable for automated screenings and is able to detect "s" mutants.

D. COMPONENTS

The standard configuration contains reagents to perform 192 tests and is made of the following components:

1. Microplate MICROPLATE

n° 2. 12 strips of 8 breakable wells coated with anti HBsAg, affinity purified mouse monoclonal antibodies, specific to "a", "y" and "d" determinants, and sealed into a bag with desiccant.

2. Negative Control CONTROL -

1x4.0ml/vial. Ready to use control. It contains goat serum, 10 mM phosphate buffer pH 7.4+/-0.1, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The negative control is pale yellow color coded.

3. Positive Control CONTROL +

1x4.0ml/vial. Ready to use control. It contains goat serum, non infectious recombinant HBsAg, 10 mM phosphate buffer pH 7.4+/-0.1, 0.02% gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The positive control is color coded green.

4. Calibrator CAL ...

n° 2 vials. Lyophilized calibrator. To be dissolved with EIA grade water as reported in the label. Contains fetal bovine serum, non infectious recombinant HBsAg at 0.5 IU/ml (2nd WHO international standard for HBsAg, NIBSC code 00/588), 10 mM phosphate buffer pH 7.4+/-0.1, 0.02% gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label .

5. Wash buffer concentrate WASHBUF 20X

2x60ml/bottle. 20X concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

6. Enzyme Conjugate Diluent **CONJ DIL**

2x16ml/vial. Ready to use and pink/red color coded reagent. It contains 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 1% normal mouse serum, 5% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives. The solution is normally opalescent.

7. Enzyme Conjugate **CONJ 20X**

2x1ml/vial. 20X concentrated reagent. It contains Horseradish Peroxidase (HRP) labeled mouse monoclonal antibodies to HBsAg, determinant "a" and "preS", 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 5% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

8. Chromogen/Substrate **SUBS TMB**

2x25ml/bottle. It contains a 50 mM citrate-phosphate buffered solution at pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine (TMB) and 0.02% hydrogen peroxide (H₂O₂).

Note: To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.

9. Sulphuric Acid **H₂SO₄ 0.3 M**

1x25ml/bottle. It contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

Note: Attention: Irritant (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)

10. Plate sealing foils n° 4

11. Package insert

Important note:

Only upon specific request, Dia.Pro can supply reagents for 96, 480, 960 tests, as reported below:

	N°1	N°5	N°10
Microplates			
Negative Control	1x2ml/vial	1x10ml/vial	1x20ml/vial
Positive Control	1x2ml/vial	1x10ml/vial	1x20ml/vial
Calibrator	N° 1 vial	N° 5 vials	N° 10 vials
Wash buffer concentrate	1x60ml/vial	5x60ml/vial	4x150ml/vial
Enzyme conjugate	1x0.8ml/vial	1x4ml/vial	2x4ml/vial
Conjugate Diluent	1x16ml/vial	2x40ml/vial	2x80ml/vial
Chromogen/Substrate	1x25ml/vial	3x42ml/vial	2x125ml/vial
Sulphuric Acid	1x15ml/vial	2x40ml/vial	2x80ml/vial
Plate sealing foils	N° 2	N° 10	N° 20
Package insert	N° 1	N° 1	N° 1
Number of tests	96	480	960
Code SAG1ULTRA.CE	96	480	960

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (150ul, 100ul and 50ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (double distilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator (dry or wet), capable to provide shaking at 1300 rpm+/-150, set at +37°C.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. When the kit is used for the screening of blood units and blood components, it has to be used in a laboratory certified and qualified by the national authority in that field (Ministry of Health or similar entity) to carry out this type of analysis.
3. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
5. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
6. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
7. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
8. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
9. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
10. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
11. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-use of the device and up to 6 months.
12. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
13. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
14. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..
15. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
16. The Stop Solution is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water
17. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

- Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
- Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate, generating false negative results.
- Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
- Haemolysed (red) and lipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as well as they could give rise to false positive results. Specimens with an altered pathway of coagulation, presenting particles after blood collection and preparation of serum/plasma as those coming from hemodialized patients, could give origin to false positive results.
- Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen sample should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
- If some turbidity is present or presence of microparticles is suspected after thawing, filter the sample on a disposable 0.2-0.8µm filter to clean it up for testing or use the two-steps alternative method.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-uses of the device and up to 6 months.

1. Microplates:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant has not turned green, indicating a defect in conservation. In this case, call Dia.Pro's customer service. Unused strips have to be placed back inside the aluminum pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C. After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

2. Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

3. Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use. The positive control does not contain any infective HBV as it is composed of recombinant synthetic HBsAg.

4. Calibrator:

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilized powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex. The solution is not stable. Store the Calibrator frozen in aliquots at -20°C.

5. Wash buffer concentrate:

The 20x concentrated solution has to be diluted with EIA grade water up to 1200 ml and mixed gently end-over-end before use. As some salt crystals may be present into the vial, take care to dissolve all the content when preparing the solution. In the preparation avoid foaming as the presence of bubbles could give origin to a bad washing efficiency.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

6. Enzyme conjugate:

The working solution is prepared by diluting the 20X concentrated reagent into the Conjugate Mix well on vortex before use.

Avoid any contamination of the liquid with oxidizing chemicals, dust or microbes. If this component has to be transferred, use only plastic sterile disposable containers.

Important note: The working solution is not stable. Prepare only the volume necessary for the work of the day. As an example when the kit is used in combination with other instruments or manually, dilute 0.1 ml 20X Conjugate with 1.9 ml Conjugate Diluent into a disposable plastic vial and mix carefully before use.

7. Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well by end-over-end mixing.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. Do not expose to strong light, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, and if possible, sterile disposable container.

8. Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well by end-over-end mixing.

Attention: Irritant (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

- Micropipettes** have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (70% ethanol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample or the components of the kit. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of ±2%.
- The **ELISA incubator** has to be set at +37°C (tolerance of ±1°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
- In case of **shaking** during incubations, the instrument has to ensure 350 rpm ±150. Amplitude of shaking is very important as a wrong one could give origin to splashes and therefore to some false positive result.
- The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with

deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution.

The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).

5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.

An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.

5. **Incubation times** have a tolerance of $\pm 5\%$.
6. The **microplate reader** has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; (d) repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer 's instructions.
7. When using **ELISA automated workstations**, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, shaking, data handling, etc.) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated by checking full matching the declared performances of the kit. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set paying particular attention to avoid carry over by the needles used for dispensing samples and for washing. The carry over effect must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells due to strongly reactive samples, leading to false positive results. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening and when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
8. When using automatic devices, in case the vial holder of the instrument does not fit with the vials supplied in the kit, transfer the solution into appropriate containers and label them with the same label peeled out from the original vial. This operation is important in order to avoid mismatching contents of vials, when transferring them. When the test is over, return the secondary labeled containers to 2.8°C, firmly capped.
9. **Dia.Pro's customer service** offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure full compliance with the essential requirements of the assay. Support is also provided for the installation of new instruments to be used in combination with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label of the kit box. Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by naked-eye visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate is colorless or pale blue. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box. Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
4. Dilute the 20X concentrated Enzyme Conjugate with its Diluent as reported.
5. Dissolve the Calibrator as described above.
6. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix as described.

7. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
8. Check that the ELISA reader has been turned on at least 20 minutes before reading.
9. If using an automated workstation, turn it on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
10. Check that the micropipettes are set to the required volume.
11. Check that all the other equipment is available and ready to use.
12. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

Automated assay:

In case the test is carried out automatically with an ELISA system, we suggest to make the instrument dispense first 150 ul controls & calibrator, then all the samples and finally 100 ul diluted Enzyme Conjugate.

For the pre-washing step (point 1 of the assay procedure) and all the next operations follow the operative instructions reported below for the Manual Assay.

It is strongly recommended to check that the time lap between the dispensation of the first and the last sample will be calculated by the instrument and taken into consideration by delaying the first washing operation accordingly.

Manual Assay:

1. Place the required number of strips in the plastic holder and wash them once to hydrate wells. Carefully identify the wells for controls, calibrator and samples.

Important note: *Pre washing (1 cycle: dispensation of 350ul/well of washing solution+ aspiration) is fundamental to obtain reliable and specific results both in the manual and in the automatic procedures. Do not omit it !*

2. Leave the A1 well empty for blanking purposes.
3. Pipette 150µl of the Negative Control in triplicate, 150ul of the Calibrator in duplicate and then 150ul of the Positive Control in single followed by 150ul of each of the samples.
4. Check for the presence of samples in wells by naked eye (there is a marked color difference between empty and full wells) or by reading at 450/620nm. (samples show OD values higher than 0.100).
5. Dispense 100ul diluted Enzymatic Conjugate in all wells, except for A1, used for blanking operations.

Important note: *Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip when the conjugate is dispensed. Contamination might occur.*

6. Following addition of the conjugate, check that the color of the samples have changed from yellowish to pink/red and then incubate the microplate for **120 min at +37°C**.

Important notes:

- a. *Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, only when the test is performed manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.*
- b. *If the procedure is carried out on shaking, be sure to deliver the rpm reported for in Section I.3 as otherwise intra-well contamination could occur.*

- When the first incubation is over, wash the microwells as previously described (section I.4)
- Pipette 200 µl Chromogen/Substrate into all the wells, A1 included.

Important note: Do not expose to strong direct light as a high background might be generated.

- Incubate the microplate protected from light at **18-24°C for 30 min**. Wells dispensed with the positive control, the calibrator and positive samples will turn from clear to blue.
- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells to stop the enzymatic reaction, using the same pipetting sequence as in step 8. Addition of the acid solution will turn the positive control, the calibrator and positive samples from blue to yellow/brown.
- Measure the color intensity of the solution in each well, as described in section I.6 using a 450nm filter (reading) and a 620-630nm filter (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

Important general notes:

- Ensure that no fingerprints or dust are present on the external bottom of the microwell before reading. They could generate false positive results on reading.
- Reading should ideally be performed immediately after the addition of the acid solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self-oxidation of the chromogen can occur leading to a higher background.
- When samples to be tested are not surely clean or have been stored frozen, the assay procedure reported below is recommended as long as it is far less sensitive to interferences due to hemolysis, hyperlipaemia, bacterial contamination and fibrin microparticles. The assay is carried out in two-steps at +37°C on shaking at 350 rpm ±150 as follows:
 - dispense 100 ul of controls, calibrator and samples
 - incubate 60 min at +37°C on shaking
 - wash according to instructions (section I.4)
 - dispense 100 ul diluted enzyme tracer
 - incubate 30 min at +37°C on shaking
 - wash
 - dispense 100 ul TMB&H2O2 mix
 - incubate 30 min at r.t. on shaking
 - stop and read

In this procedure the pre-wash can be omitted. This method shows performances similar to the standard one and therefore can be used in alternative.

- The Calibrator (CAL) does not affect the cut-off calculation and therefore the test results calculation. The Calibrator may be used only when a laboratory internal quality control is required by the management.

N. ASSAY SCHEME

Operations	Procedure
Pre-Washing step	n° 1 cycle
Controls&Calibrator&samples	150 ul
Diluted Enzyme Conjugate	100 ul
1st incubation	120 min
Temperature	+37°C
Washing steps	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Chromogen/Substrate	200ul
2nd incubation	30 min
Temperature	room
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme is reported in the following section:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control
CAL = Calibrator PC = Positive Control S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is performed on the controls/calibrator any time the kit is used in order to verify whether the expected OD450nm or S/Co values have been matched in the analysis.

Ensure that the following results are met:

Parameter	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Negative Control (NC)	< 0.050 mean OD450nm value after blanking
Calibrator 0.5 IU/ml	S/Co ≥ 2
Positive Control	> 1.000 OD450nm value

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
Negative Control (NC) > 0.050 OD450nm after blanking	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative control or of the wells where the control was dispensed has occurred due to spills of positive samples or of the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

Calibrator S/Co < 2	<ol style="list-style-type: none"> that the procedure has been correctly performed; that no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of negative control instead of calibrator) that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; that no external contamination of the calibrator has occurred.
Positive Control < 1.000 OD450nm	<ol style="list-style-type: none"> that the procedure has been correctly performed; that no mistake has occurred during the distribution of the control (dispensation of negative control instead of positive control. In this case, the negative control will have an OD450nm value > 0.050). that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; that no external contamination of the positive control has occurred.

If any of the above problems have occurred, report the problem to the supervisor for further actions.

Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 11.

P. CALCULATION OF THE CUT-OFF

The test results are calculated by means of a cut-off value determined on the mean OD450nm/620-630nm value of the negative control (NC) with the following formula:

$$NC + 0.050 = \text{Cut-Off (Co)}$$

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

Important note: *When the calculation of results is performed by the operating system of an ELISA automated work station, ensure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the correct interpretation of results.*

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as a ratio of the sample OD450nm/620-630nm (S) and the Cut-Off value (Co), mathematically S/Co, according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 – 1.1	Equivocal
> 1.1	Positive

A negative result indicates that the patient is not infected by HBV and that the blood unit may be transfused.

Any patient showing an equivocal result should be retested on a second sample taken 1-2 weeks after the initial sample; the blood unit should not be transfused.

A positive result is indicative of HBV infection and therefore the patient should be treated accordingly or the blood unit should be discarded.

Important notes:

- Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.*
- Any positive result must be confirmed first by repeating the test on the sample, after having filtered it on 0.2-0.8 u filter to remove any microparticles interference. Then, if still positive, the sample has to be submitted to a confirmation test before a diagnosis of viral hepatitis is released.*
- When test results are transmitted from the laboratory to another department, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.*
- Diagnosis of viral hepatitis infection has to be taken and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.*

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 11):

The following data must not be used instead or real figures obtained by the user.

Negative Control: 0.012 – 0.008 – 0.010 OD450nm
 Mean Value: 0.010 OD450nm
 Lower than 0.050 – Accepted
 Positive Control: 2.489 OD450nm
 Higher than 1.000 – Accepted
 Cut-Off = 0.010+0.050 = 0.060
 Calibrator: 0.350 - 0.370 OD450nm
 Mean value: 0.360 OD450nm S/Co = 6.0
 S/Co higher than 2.0 – Accepted
 Sample 1: 0.028 OD450nm
 Sample 2: 1.690 OD450nm
 Sample 1 S/Co < 0.9 = negative
 Sample 2 S/Co > 1.1 = positive

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Common Technical Specifications or CTS (art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC). Version ULTRA proved to be at least equivalent to the original design in a study conducted for the validation of the new version.

1. Analytical Sensitivity

The limit of detection of the assay has been calculated on the 2nd WHO international standard, NIBSC code 00/588.

In the following table, results are given for three lots (P1, P2 and P3) of the version ULTRA in comparison with the reference device (Ref.):

WHO IU/ml	Lot # P1 S/Co	Lot # P2 S/Co	Lot # P3 S/Co	Ref. S/Co
0.4	4.6	4.8	4.6	4.6
0.2	2.3	2.4	2.4	2.4
0.1	1.4	1.4	1.5	1.2
0.05	0.8	0.8	1.0	0.7
0.025	0.6	0.6	0.6	0.4
FCS (NC)	0.3	0.2	0.3	0.1

The assay shows an Analytical Sensitivity better than 0.1 WHO IU/ml of HBsAg.

In addition two panels of sensitivity supplied by EFS, France, and by SFTS, France, were tested and gave in the best conditions the following results:

Panel EFS Ag HBs HB1-HB6 lot n° 04

Sample ID	Characteristics	ng/ml	S/Co
HB1	diluent	/	0,2
HB2	adw2+ayw3	0.05	0,6
HB3	adw2+ayw3	0.1	1,0
HB4	adw2+ayw3	0.2	1,8
HB5	adw2+ayw3	0.3	2,4
HB6	adw2+ayw3	0.5	4,2

Sensitivity panel SFTS, France, Ag HBs 2005

Sample ID	Characteristics	ng/ml	S/Co
171	Adw2 + ayw3	2.21 ± 0.15	15,4
172	Adw2 + ayw3	1.18 ± 0.10	8,7
173	Adw2 + ayw3	1.02 ± 0.05	6,1
174	Adw2 + ayw3	0.64 ± 0.04	4,0
175	Adw2 + ayw3	0.49 ± 0.03	3,4
176	Adw2 + ayw3	0.39 ± 0.02	2,6
177	Adw2 + ayw3	0.25 ± 0.02	2,0
178	Adw2 + ayw3	0.11 ± 0.02	1,3
179	Adw2 + ayw3	0.06 ± 0.01	0,9
180	Adw2 + ayw3	0.03 ± 0.01	0,8
181	Adw2	0.5 – 1.0	4,7
182	Adw4	0.5 – 1.0	3,6
183	Adr	0.5 – 1.0	4,5
184	Ayw1	0.5 – 1.0	5,1
185	Ayw2	0.5 – 1.0	6,4
186	Ayw3	0.5 – 1.0	7,3
187	Ayw3	0.5 – 1.0	5,8
188	Ayw4	0.5 – 1.0	6,9
189	Ayr	0.5 – 1.0	6,1
190	diluent	/	0,6

The panel # 808, supplied by Boston Biomedical Inc., USA, was also tested to define the limit of sensitivity. Results in the best conditions are as follows :

BBI panel PHA 808

Sample ID	Characteristics	ng/ml	S/Co
01	ad	2,49	10,2
02	ad	1,17	4,8
03	ad	1,02	4,3
04	ad	0,96	3,8
05	ad	0,69	2,9
06	ad	0,50	2,2
07	ad	0,41	1,5
08	ad	0,37	1,3
09	ad	0,30	1,2
10	ad	0,23	1,0
11	ay	2,51	11,2
12	ay	1,26	5,9
13	ay	0,97	4,1
14	ay	0,77	3,7
15	ay	0,63	2,0
16	ay	0,48	2,4
17	ay	0,42	2,0
18	ay	0,33	1,8
19	ay	0,23	1,6
20	ay	0,13	1,1
21	negative	/	0,6

2. Diagnostic Sensitivity:

The diagnostic sensitivity was tested according to what required by Common Technical Specifications (CTS) of the directive 98/79/EC on IVD for HBsAg testing. Positive samples, including HBsAg subtypes and a panel of "s" mutants from most frequent mutations, were collected from

different HBV pathologies (acute, a-symptomatic and chronic hepatitis B) or produced synthetically, and were detected positive in the assay.

All the HBsAg known subtypes, "ay" and "ad", and isoforms "w" and "r", supplied by CNTS, France, were tested in the assay and determined positive by the kit as expected.

An overall value of 100% has been found in a study conducted on a total number of more than 400 samples positive with the original reference IVD code SAG1.CE, CE marked.

A total of 30 sero-conversions were studied, most of them produced by Boston Biomedica Inc., USA.

Results obtained by examining eight panels supplied by Boston Biomedica Inc., USA, are reported below for the version ULTRA in comparison with the reference device code SAG1.CE.

Panel ID	1 st sample positive	HBsAg subtype	HBsAg ng/ml	Version ULTRA S/Co	Ref. device S/Co
PHM 906	02	ad	0.5	3.7	1.4
PHM 907 (M)	06	ay	1.0	4.4	2.9
PHM 909	04	ad	0.3	1.2	0.8
PHM 914	04	ad	0.5	1.1	1.1
PHM 918	02	ad	0.1	1.8	0.5
PHM 923	03	ay	< 0.2	2.2	1.2
PHM 925	03	Ind.	n.d.	1.4	0.9
PHM 934	01	ad	n.d.	1.0	0.8

3. Diagnostic Specificity:

It is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of specific analyte. In addition to the first study, where more than 5000 negative samples from blood donors (two blood centers), classified negative with a CE marked device in use at the laboratory of collection were examined, the diagnostic specificity was recently assessed by testing a total of 2288 negative blood donors on seven different lots. A value of specificity of 100% was found.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the specificity.

No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed.

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

Samples derived from patients with different viral (HCV, HAV) and non viral pathologies of the liver that may interfere with the test were examined. No cross reaction were observed.

4. Precision:

It has been calculated for the version ULTRA on two samples examined in 16 replicates in 3 different runs for three lots.

Results are reported in the following tables:

Average values Total n = 144	Negative Sample	Calibrator 0.5 IU/ml
OD450nm	0.026	0.332
Std.Deviation	0.004	0.027
CV %	16%	8%

The variability shown in the tables did not result in sample misclassification.

S. LIMITATIONS

Repeatable false positive results were assessed on freshly collected specimens in less than 0.1% of the normal population, mostly due to high titers Heterophilic Anti Mouse Antibodies (HAMA).

Interferences in fresh samples were also observed when they were not particles-free or were badly collected (see chapter G).

Old or frozen samples, presenting fibrin clots, crioglobulins, lipid-containing micelles or microparticles after storage or thawing, can generate false positive results.

REFERENCES

1. Aach R.D., Grisham J.W., Parker S.W. Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. *Proc.Natl.Acad.Sci..USA*, 68:1956, 1971.
2. Blumberg B.S., Suinick A.I., London W.T.. Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. *Bull.N.Y.Acad.Med..* 44:1566, 1968.
3. Boniolo A., DAVIS M., Matteja R.. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for screening hybridoma antibodies against hepatitis B surface antigen. *J.Immunol.Meth..* 49:1, 1982.
4. Caldwell C.W., Barpet J.T.. Enzyme immunoassay for hepatitis B and its comparison to other methods. *Cli.Chim.Acta* 81: 305, 1977
5. Fazekas S., De St.Groth, Scheidegger D.. production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J.Immunol.Meth..* 35: 1, 1980
6. Reesink H.W.. et al.. Comparison of six 3rd generation tests for the detection of HBsAg. *Vox.Sang..* 39:61, 1980
7. Rook G.A.W.. Chromogens for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using horseradish peroxidase. *Lepr.Rev.* 52: 281, 1981
8. Schroder J.. Monoclonal antibodies: a new tool for reasearch and immunodiagnostic. *Med.Biol..* 58: 281, 1981
9. Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. *J.Med.Virol.* 1999;59(1):19-24

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy

CE
0318

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com



 **604_4**

ORG 604 Anti-dsDNA

INTENDED PURPOSE

Anti-dsDNA is an ELISA test system for the quantitative measurement of IgG class autoantibodies against double-stranded DNA in human serum or plasma. This product is intended for professional in vitro diagnostic use only.

The test is used as an aid in the differential diagnosis of inflammatory autoimmune diseases, especially systemic lupus erythematosus (SLE). Autoantibodies to dsDNA are diagnostic markers for SLE and levels may be elevated during active disease. Evaluation of a test result should always take into account all clinical and laboratory diagnostic findings.

SYMBOLS USED



In vitro diagnostic medical device



Manufacturer



Catalogue number



Sufficient for 96 determinations



Batch code



Use by



Temperature limitation



Keep away from sunlight



Do not reuse



Date of manufacture



CE marked according to 98/79/EC



Consult instructions for use

604_4

Electronic Instruction For Use: version

MICROPLATE

Microplate

CALIBRATOR A

Calibrator

CALIBRATOR B

Calibrator

CALIBRATOR C

Calibrator

CALIBRATOR D

Calibrator

CALIBRATOR E

Calibrator

CALIBRATOR F

Calibrator

CONTROL +

Control positive

CONTROL -

Control negative

DILUENT

Sample Buffer

CONJUGATE

Enzyme Conjugate

TMB

TMB Substrate

STOP

Stop solution

WASH

Wash Buffer

RTU

Ready to use

PRINCIPLE OF THE TEST

Highly purified double-stranded DNA (dsDNA) is bound to microwells.

The determination is based on an indirect enzyme linked immune reaction with the following steps: Specific antibodies in the patient sample bind to the antigen coated on the surface of the reaction wells. After incubation, a washing step removes unbound and unspecifically bound serum or plasma components. Subsequently added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen-complexes. After incubation, a second washing step removes unbound enzyme conjugate. After addition of substrate solution the bound enzyme conjugate hydrolyses the substrate forming a blue coloured product. Addition of an acid stops the reaction generating a yellow end-product. The intensity of the yellow color correlates with the concentration of the antibody-antigen-complex and can be measured photometrically at 450 nm.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- All reagents of this kit are intended for professional in vitro diagnostic use only.
- Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2 by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.
- Bovine serum albumin (BSA) used in components has been tested for BSE and found negative.
- Avoid contact with the substrate TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine).
- Stop solution contains acid, classification is non-hazardous. Avoid contact with skin.
- Control, sample buffer and wash buffer contain sodium azide 0.09% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
- Enzyme conjugate contains ProClin 300 0.05% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.

During handling of all reagents, controls and serum samples observe the existing regulations for laboratory safety regulations and good laboratory practice:

- First aid measures: In case of skin contact, immediately wash thoroughly with water and soap. Remove contaminated clothing and shoes and wash before reuse. If system fluid comes into contact with skin, wash thoroughly with water. After contact with the eyes carefully rinse the opened eye with running water for at least 10 minutes. Get medical attention if necessary.
 - Personal precautions, protective equipment and emergency procedures:
Observe laboratory safety regulations. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled. When spilled, absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal.
 - Exposure controls / personal protection: Wear protective gloves of nitril rubber or natural latex. Wear protective glasses. Used according to intended use no dangerous reactions known.
 - Conditions to avoid: Since substrate solution is light-sensitive. Store in the dark.
 - For disposal of laboratory waste the national or regional legislation has to be observed.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying control sera.

CONTENTS OF THE KIT

ORG 604	▽ ⁹⁶	Sufficient for 96 determinations
MICROPLATE	1	One divisible microplate consisting of 12 modules of 8 wells each. Ready to use. Product code on module: dsD
CALIBRATOR A	1x 1.5 ml	Calibrator A 0 IU/ml, containing no serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR B	1x 1.5 ml	Calibrator B 12.5 IU/ml, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR C	1x 1.5 ml	Calibrator C 25 IU/ml, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR D	1x 1.5 ml	Calibrator D 50 IU/ml, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR E	1x 1.5 ml	Calibrator E 100 IU/ml, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR F	1x 1.5 ml	Calibrator F 200 IU/ml, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
CONTROL +	1x 1.5 ml	Control positive, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.
CONTROL -	1x 1.5 ml	Control negative, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.
DILUENT	20 ml	Sample Buffer PD, containing PBS, BSA, detergent, preservative sodium azide 0.09%, yellow, concentrate (5 x).
CONJUGATE	15 ml	Enzyme Conjugate containing anti-human IgG antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative PROCLIN 0.05%, light red. Ready to use.
TMB	15 ml	TMB Substrate; containing 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin, colorless. Ready to use.
STOP	15 ml	Stop solution; contains acid. Ready to use.
WASH	20 ml	Wash Buffer, containing Tris, detergent, preservative sodium azide 0.09%; 50 x conc.

MATERIALS REQUIRED

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm; optional: reference filter at 620 nm
- Data reduction software
- Multi-channel dispenser or repeatable pipette for 100 µl
- Vortex mixer
- Pipettes for 10 µl, 100 µl and 1000 µl
- Laboratory timing device
- Distilled or deionised water
- Measuring cylinder for 1000 ml and 100 ml
- Plastic container for storage of the wash solution

This ELISA assay is suitable for use on open automated ELISA processors. Each assay has to be validated on the respective automated system. Detailed information is provided upon request.

SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

- Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
- Allow blood to clot and separate the serum or plasma by centrifugation.
- Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia should be avoided, but does not interfere with this assay.
- Specimens may be refrigerated at 2-8°C for up to five days or stored at -20°C up to six months.
- Avoid repetitive freezing and thawing of serum or plasma samples. This may result in variable loss of antibody activity.
- Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

STORAGE AND STABILITY

- Store test kit at 2-8°C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store microplate sealed and desiccated in the clip bag provided.
- Shelf life of the unopened test kit is 18 months from day of production.
Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.
- Diluted Wash Buffer and Sample Buffer are stable for at least 30 days when stored at 2-8°C.
We recommend consumption on the same day.

PROCEDURAL NOTES

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- Do not interchange kit components from different lots and products.
- All materials must be at room temperature (20-28°C) prior to use.
- Prepare all reagents and samples. Once started, perform the test without interruption.
- Double determinations may be done. By this means pipetting errors may become obvious.
- Perform the assay steps only in the order indicated.
- Always use fresh sample dilutions.
- Pipette all reagents and samples into the bottom of the wells.
- To avoid carryover or contamination, change the pipette tip between samples and different kit controls.
- Wash microwells thoroughly and remove the last droplets of wash buffer.
- All incubation steps must be accurately timed.
- Do not re-use microplate wells.

PREPARATION OF REAGENTS

WASH
Dilute the contents of one vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled or deionised water to a final volume of 1000 ml prior to use.

DILUENT
Sample Buffer PD Prior to use dilute the contents (20 ml) of one vial of sample buffer 5x concentrate with distilled or deionised water to a final volume of 100 ml.

Preparation of samples

Dilute patient samples 1:100 before the assay: Put 990 µl of prediluted sample buffer in a polystyrene tube and add 10 µl of sample. Mix well. Note: Calibrators / Controls are ready to use and need not be diluted.

TEST PROCEDURE

Prepare enough microplate modules for all calibrators / controls and patient samples.

1. Pipette **100 µl** of calibrators, controls and prediluted patient samples into the wells.
Incubate for **30 minutes** at room temperature (20-28 °C).
Discard the contents of the microwells and **wash 3 times** with **300 µl** of wash solution.
2. Dispense **100 µl** of enzyme conjugate into each well.
Incubate for **15 minutes** at room temperature.
Discard the contents of the microwells and **wash 3 times** with **300 µl** of wash solution.
3. Dispense **100 µl** of TMB substrate solution into each well.
Incubate for **15 minutes** at room temperature
4. **Add 100 µl** of stop solution to each well of the modules
Incubate for **5 minutes** at room temperature.
Read the optical density at 450 nm (reference 600-690nm) and calculate the results.
The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read during this time.

Example for a pipetting scheme:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D											
E	E											
F	F											
G	C+											
H	C-											

P1, ... patient sample A-F calibrators C+, C- controls

VALIDATION

Test results are valid if the optical densities at 450 nm for calibrators / controls and the results for controls comply with the reference ranges indicated on the Certificate of Analysis enclosed in each test kit.
If these quality control criteria are not met the assay run is invalid and should be repeated.

CALCULATION OF RESULTS

For quantitative results plot the optical density of each calibrator versus the calibrator concentration to create a calibration curve. The concentration of patient samples may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

Using data reduction software a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Calibration

The assay system is calibrated against the international reference preparation WHO Wo/80 for human anti-dsDNA IgG antibodies as 200 IU/ml.

Measuring range

The calculation range of this ELISA assay is 0 - 200 IU/ml

Expected values

In a normal range study with samples from healthy blood donors the following ranges have been established with this ELISA assay: Cut-off 20 IU/ml

Interpretation of results

Negative: < 20 IU/ml
Positive: ≥ 20 IU/ml

Linearity

Patient samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in sample buffer to demonstrate the dynamic range of the assay and the upper / lower end of linearity. Activity for each dilution was calculated from the calibration curve using a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates.

Sample	Dilution	Observed IU/ml	Expected IU/ml	O/E [%]
1	1:100	104.2	104.2	100
.	1:200	50.6	52.1	97
.	1:400	24.9	26.1	95
.	1:800	11.2	13.0	86
2	1:100	135.3	135.3	100
.	1:200	68.9	67.7	102
.	1:400	35.2	33.8	104
.	1:800	18.2	16.9	108

Limit of detection

Functional sensitivity was determined to be: 1 IU/ml

Reproducibility

Intra-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Inter-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 6 determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

Intra-Assay		
Sample	Mean IU/ml	CV %
1	26.0	4.5
2	61.0	3.1
3	114.0	6.4

Inter-Assay		
Sample	Mean IU/ml	CV %
1	29.0	12.4
2	68.0	7.3
3	138.0	5.2

Interfering substances

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dl) or lipemic (up to 3 g/dl triglycerides) sera or plasma, or bilirubin (up to 40 mg/dl) containing sera or plasma. Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, Heparine). However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

Study results

<u>Study population</u>	<u>n</u>	<u>n_pos</u>	<u>%</u>
SLE	202	164	81.2
Other autoimmune diseases	33	1	3.0
Normal human sera	115	1	0.9

Clinical Diagnosis

		POS	NEG		
ORG 604	POS	164	2		
	NEG	38	146		
		202	148	350	

Sensitivity: 81.2 %
Specificity: 98.6 %
Overall agreement: 88.6 %

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

The above pathological and normal reference ranges for antibodies in patient samples should be regarded as recommendations only. Each laboratory should establish its own ranges according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.

REFERENCES

- Alba P, Bento L, Cuadrado MJ, Karim Y, Tungekar MF, Abbs I et al. Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(6):556-560.
- Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test. *Lupus* 2010; 19(8):906-912.
- Brouwer R, Hengstman GJ, Vree EW, Ehrfeld H, Bozic B, Ghirardello A et al. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(2):116-123.
- Castro C, Gourley M. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S238-S247.
- Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, Grosso S, Cereda A, Guercilena G et al. Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2011; 10(3):150-154.
- Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, Hallmans G, Wadell G, Rantapaa-Dahlqvist S. Autoantibodies predate the onset of Systemic Lupus Erythematosus in northern Sweden. *Arthritis Research & Therapy* 2011; 13(1):R30.
- Haugbro K, Nossent JC, Winkler T, Figenschau Y, Rekvig OP. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity. *Ann Rheum Dis JID* - 0372355 2004; 63(4):386-394.
- Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, Fortin PR, Urowitz M, Werth V et al. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. *Lupus* 2011; 20(3):250-255.
- Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46(7):1052-1056.
- Kattah NH, Kattah MG, Utz PJ. The U1-snRNP complex: structural properties relating to autoimmune pathogenesis in rheumatic diseases. *Immunol Rev* 2010; 233(1):126-145.
- Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol* 2009; 4:1.
- Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1420-1422.
- Petri M, Magder L. Classification criteria for systemic lupus erythematosus: a review. *Lupus* 2004; 13(11):829-837.
- Poole BD, Schneider RI, Guthridge JM, Velte CA, Reichlin M, Harley JB et al. Early targets of nuclear RNP humoral autoimmunity in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 60(3):848-859.
- Putova I, Dostal C, Becvar R. Prevalence of antinucleosome antibodies by enzyme-linked immunosorbent assays in patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1109:275-286.
- Reveille JD. Predictive value of autoantibodies for activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus JID* - 9204265 2004; 13(5):290-297.
- Simon JA, Cabiedes J, Ortiz E, Alcocer-Varela J, Sanchez-Guerrero J. Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(2):220-224.
- Sinclair D, Saas M, Williams D, Hart M, Goswami R. Can an ELISA replace immunofluorescence for the detection of anti-nuclear antibodies?--The routine use of anti-nuclear antibody screening ELISAs. *Clin Lab*

2007; 53(3-4):183-191.

- Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002; 117(2):316-324.
- Maidhof W., Hilius O. Lupus: an overview of the disease and management options. *P T* 2012; 37(4):240-9.
- Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012; 64(6):797-808.

Notice to the user (European Union):

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU Member State in which the user and/or the patient is established .

Change Control

Former version: *ORG 604_IFU_DE_QM112991_2018-01-02_3*

Reason for revision: *updated description of coating material.*

- 1 **100 µl** Standards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben pipettieren
→ **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren
→ Inhalt der Platte verwerfen und
3 mal mit **300 µl** Waschpuffer waschen
- 2 **100 µl** Enzymkonjugatlösung pipettieren
→ **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren
→ Inhalt der Platte verwerfen und
3 mal mit **300 µl** Waschpuffer waschen
- 3 **100 µl** Substratlösung pipettieren
→ **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren
- 4 **100 µl** Stopplösung zugeben
→ Platte **5 Minuten** stehenlassen
→ Bei **450 nm** messen

ORGENTEC Diagnostika GmbH

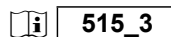
Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com



ORG 515 Anti-Cardioliipin IgG/IgM

INTENDED PURPOSE

Anti-Cardioliipin IgG/IgM is an ELISA test system for the quantitative measurement of IgG and IgM class autoantibodies against cardiolipin in human serum or plasma. This product is intended for professional in vitro diagnostic use only.

Antiphospholipid syndrome (APS, Hughes Syndrome) is a systemic autoimmune disease that causes thromboses, recurrent miscarriage or stillbirths, and stroke. Clinical symptoms are accompanied by specific autoantibodies in the blood, which bind to phospholipids like cardiolipin, or phospholipid-binding proteins like beta-2-glycoprotein I. Autoantibodies against proteins of the coagulation cascade, e.g. prothrombin or annexin V may also be found in patients with APS with otherwise negative phospholipid antibody results. In primary APS autoantibodies against phospholipids appear independently, while in secondary APS phospholipid antibodies are detected in conjunction with other autoimmune diseases, such as lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, or Sjögren's syndrome.

SYMBOLS USED ON LABELS

In vitro diagnostic medical device

Manufacturer

Catalogue number

Sufficient for 96 determinations

Batch code

Use by

Temperature limitation

Keep away from sunlight

Do not reuse

Date of manufacture

CE marked according to 98/79/EC

Consult instructions for use

Electronic Instruction For Use: version

Microplate

Calibrator

Calibrator

Calibrator

Calibrator

Calibrator

Calibrator

Control positive

Control negative

Sample Buffer P

Enzyme Conjugate

Enzyme Conjugate

TMB Substrate

Stop solution

Wash Buffer

Ready to use

PRINCIPLE OF THE TEST

Highly purified cardiolipin is coated on microwells saturated with beta-2-glycoprotein I.

The determination is based on an indirect enzyme linked immune reaction with the following steps:

Specific antibodies in the patient sample bind to the antigen coated on the surface of the reaction wells. After incubation, a washing step removes unbound and unspecifically bound serum or plasma components. Subsequently added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen-complexes. After incubation, a second washing step removes unbound enzyme conjugate. After addition of substrate solution the bound enzyme conjugate hydrolyses the substrate forming a blue coloured product. Addition of an acid stops the reaction generating a yellow end-product. The intensity of the yellow color correlates with the concentration of the antibody-antigen-complex and can be measured photometrically at 450 nm.

WARNINGS AND PRECAUTIONS







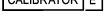
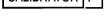



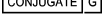
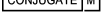




- All reagents of this kit are intended for professional in vitro diagnostic use only.
- Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2 by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.
- Bovine serum albumin (BSA) used in components has been tested for BSE and found negative.
- Avoid contact with the substrate TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine).
- Stop solution contains acid, classification is non-hazardous. Avoid contact with skin.
- Control, sample buffer and wash buffer contain sodium azide 0.09% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
- Enzyme conjugate contains ProClin 300 0.05% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.

During handling of all reagents, controls and serum samples observe the existing regulations for laboratory safety regulations and good laboratory practice:

- First aid measures: In case of skin contact, immediately wash thoroughly with water and soap. Remove contaminated clothing and shoes and wash before reuse. If system fluid comes into contact with skin, wash thoroughly with water. After contact with the eyes carefully rinse the opened eye with running water for at least 10 minutes. Get medical attention if necessary.
- Personal precautions, protective equipment and emergency procedures:
Observe laboratory safety regulations. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled. When spilled, absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal.
- Exposure controls / personal protection: Wear protective gloves of nitril rubber or natural latex. Wear protective glasses. Used according to intended use no dangerous reactions known.
- Conditions to avoid: Since substrate solution is light-sensitive. Store in the dark.
- For disposal of laboratory waste the national or regional legislation has to be observed.

Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying control sera.

CONTENTS OF THE KIT

ORG 515		96	Sufficient for 96 determinations
	1		One divisible microplate consisting of 12 modules of 8 wells each. Ready to use. Product code on module: CLP
	1x 1.5 ml		Calibrator A 0 GPL-U/ml / 0 MPL-U/ml, containing serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
	1x 1.5 ml		Calibrator B 7.5 GPL-U/ml / 5 MPL-U/ml, containing Cardiolipin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
	1x 1.5 ml		Calibrator C 15 GPL-U/ml / 10 MPL-U/ml, containing Cardiolipin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
	1x 1.5 ml		Calibrator D 30 GPL-U/ml / 20 MPL-U/ml, containing Cardiolipin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
	1x 1.5 ml		Calibrator E 60 GPL-U/ml / 40 MPL-U/ml, containing Cardiolipin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
	1x 1.5 ml		Calibrator F 120 GPL-U/ml / 80 MPL-U/ml, containing Cardiolipin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
	1x 1.5 ml		Control positive, containing cardiolipin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.
	1x 1.5 ml		Control negative, containing cardiolipin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.
	20 ml		Sample Buffer P; containing PBS, BSA, detergent, preservative sodium azide 0.09%, yellow, concentrate 5x.
	15 ml		Enzyme Conjugate IgG; containing anti-human IgG antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative PROCLIN 0.05%, light red. Ready to use.
	15 ml		Enzyme Conjugate IgM; containing anti-human IgM antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative PROCLIN 0.05%, light red. Ready to use.
	15 ml		TMB Substrate, containing 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin. Ready to use.
	15 ml		Stop solution; contains acid. Ready to use.
	20 ml		Wash Buffer, containing Tris, detergent, preservative sodium azide 0.09%; 50 x conc.
	1		Certificate of Analysis

MATERIALS REQUIRED

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm; optional: reference filter at 620 nm
- Data reduction software
- Multi-channel dispenser or repeatable pipette for 100 µl
- Vortex mixer
- Pipettes for 10 µl, 100 µl and 1000 µl
- Laboratory timing device
- Distilled or deionised water
- Measuring cylinder for 1000 ml and 100 ml
- Plastic container for storage of the wash solution

This ELISA assay is suitable for use on open automated ELISA processors. Each assay has to be validated on the respective automated system. Detailed information is provided upon request.

SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

- Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
- Allow blood to clot and separate the serum or plasma by centrifugation.
- Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia should be avoided, but does not interfere with this assay.
- Specimens may be refrigerated at 2-8°C for up to five days or stored at -20°C up to six months.
- Avoid repetitive freezing and thawing of serum or plasma samples. This may result in variable loss of antibody activity.
- Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

STORAGE AND STABILITY

- Store test kit at 2-8°C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store microplate sealed and desiccated in the clip bag provided.
- Shelf life of the unopened test kit is 18 months from day of production.
Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.
- Diluted Wash Buffer and Sample Buffer are stable for at least 30 days when stored at 2-8°C.
We recommend consumption on the same day.

PROCEDURAL NOTES

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- Do not interchange kit components from different lots and products.
- All materials must be at room temperature (20-28°C) prior to use.
- Prepare all reagents and samples. Once started, perform the test without interruption.
- Double determinations may be done. By this means pipetting errors may become obvious.
- Perform the assay steps only in the order indicated.
- Always use fresh sample dilutions.
- Pipette all reagents and samples into the bottom of the wells.
- To avoid carryover or contamination, change the pipette tip between samples and different kit controls.
- Wash microwells thoroughly and remove the last droplets of wash buffer.
- All incubation steps must be accurately timed.
- Do not re-use microplate wells.

PREPARATION OF REAGENTS

WASH

Dilute the contents of one vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled or deionised water to a final volume of 1000 ml prior to use.

DILUENT

Sample Buffer P: Prior to use dilute the contents (20 ml) of one vial of sample buffer 5x concentrate with distilled or deionised water to a final volume of 100 ml.

Preparation of samples

Dilute patient samples 1:100 before the assay: Put 990 µl of prediluted sample buffer in a polystyrene tube and add 10 µl of sample. Mix well. Note: Calibrators / Controls are ready to use and need not be diluted.

TEST PROCEDURE

Prepare enough microplate modules for all calibrators / controls and patient samples.

- Pipette **100 µl** of calibrators, controls and prediluted patient samples into the wells.
Incubate for **30 minutes** at room temperature (20-28 °C).
Discard the contents of the microwells and **wash 3 times** with **300 µl** of wash solution.
- Dispense **100 µl** of enzyme conjugate into each well.
Incubate for **15 minutes** at room temperature.
Discard the contents of the microwells and **wash 3 times** with **300 µl** of wash solution.
- Dispense **100 µl** of TMB substrate solution into each well.
Incubate for **15 minutes** at room temperature
- Add 100 µl** of stop solution to each well of the modules
Incubate for **5 minutes** at room temperature.
Read the optical density at 450 nm (reference 600-690nm) and calculate the results.
The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read during this time.

Example for a pipetting scheme:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1	A	P1								
B	B	P2	B	P2								
C	C	P3	C	P3								
D	D	P4	D	P4								
E	E	P5	E	P5								
F	F	P6	F	P6								
G	C+	P7	C+	P7								
H	C-	P8	C-	P8								

IgG IgG IgM IgM

P1, ... patient sample A-F calibrators C+, C- controls

VALIDATION

Test results are valid if the optical densities at 450 nm for calibrators / controls and the results for controls comply with the reference ranges indicated on the Certificate of Analysis enclosed in each test kit.

If these quality control criteria are not met the assay run is invalid and should be repeated.

CALCULATION OF RESULTS

For quantitative results plot the optical density of each calibrator versus the calibrator concentration to create a calibration curve. The concentration of patient samples may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

Using data reduction software a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Calibration

The assay system is calibrated against the internationally recognised reference sera from E.N. Harris, Louisville and the specific reference material IRP 97/656 (IgG) and HCAL (IgG) / EY2C9 (IgM).

Measuring range

The calculation range of this ELISA assay is IgG: 0 - 120 GPL-U/ml IgM: 0 - 80 MPL-U/ml

Expected values

In a normal range study with samples from healthy blood donors the following ranges have been established with this ELISA assay: Cut-off IgG: 10 GPL-U/ml IgM: 7 MPL-U/ml

Interpretation of results

Negative: IgG < 10 GPL-U/ml IgM < 7 MPL-U/ml
Positive: ≥ 10 GPL-U/ml ≥ 7 MPL-U/ml

Linearity

Patient samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in sample buffer to demonstrate the dynamic range of the assay and the upper / lower end of linearity. Activity for each dilution was calculated from the calibration curve using a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates.

Sample	Dilution Factor	Observed	Expected	O/E [%]
		GPL/MPL-U/ml	GPL/MPL-U/ml	
IgG 1	1	73.0	73.0	100
	2	37.1	36.5	102
	4	19.6	18.3	107
	8	10.9	9.1	120
IgG 2	1	80.5	80.5	100
	2	42.0	40.3	104
	4	22.2	20.1	111
	8	12.1	10.1	120
IgG 3	1	66.2	64.4	103
	2	34.5	32.2	107
	4	16.2	16.1	101
	8	8.1	8.1	101
IgM 1	1	70.9	70.9	100
	2	34.1	35.5	96
	4	18.2	17.7	103
	8	10.1	8.9	114
IgM 2	1	114.0	114.0	100
	2	50.6	57.0	89
	4	27.3	28.5	96
	8	14.8	14.3	104
IgM 3	1	48.2	48.2	100
	2	24.7	24.1	102
	4	12.7	12.1	105
	8	7.1	6.0	118

Limit of detection

Functional sensitivity was determined to be: IgG: 1 GPL-U/ml IgM: 0.5 MPL-U/ml

Reproducibility

Intra-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Inter-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 6 determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

Intra-Assay IgG		
Sample	Mean GPL-U/ml	CV %
1	10.9	5.5
2	20.5	5.4
3	73.0	5.4

Inter-Assay IgG		
Sample	Mean GPL-U/ml	CV %
1	11.8	5.3
2	21.1	3.7
3	70.5	6.3

Intra-Assay IgM		
Sample	Mean MPL-U/ml	CV %
1	12.8	3.7
2	30.7	4.1
3	65.2	3.8

Inter-Assay IgM		
Sample	Mean MPL-U/ml	CV %
1	12.2	3.5
2	31.4	3.5
3	64.9	4.2

Interfering substances

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dl) or lipemic (up to 3 g/dl triglycerides) sera or plasma, or bilirubin (up to 40 mg/dl) containing sera or plasma. Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, Heparine). However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

Study results

Study population	n	Pos IgG	%	Pos IgM	%
Primary APS	8	6	75.0	4	50.0
Secondary APS	65	57	87.7	26	40.0
Normal human serum	150	6	4.0	3	2.0

		Clinical Diagnosis		
		POS	NEG	
ORG 515	POS	63	6	223
IgG	NEG	10	144	
		73	150	
Sensitivity:		86.3 %		
Specificity:		96.0 %		
Overall agreement:		92.8 %		

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 515	Pos	30	3	223
IgM	Neg	43	147	
		73	150	
Sensitivity:		41.1 %		
Specificity:		98.0 %		
Overall agreement:		79.4 %		

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

The above pathological and normal reference ranges for antibodies in patient samples should be regarded as recommendations only. Each laboratory should establish its own ranges according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.

REFERENCES

- Banzato A, Pozzi N, Frasson R, De F, V, Ruffatti A, Bison E et al. Antibodies to Domain I of beta(2)Glycoprotein I are in close relation to patients risk categories in Antiphospholipid Syndrome (APS). *Thromb Res* 2011; 128 (6):583-6.
- Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, de LB, Forastiero R et al. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus* 2011; 20(2):191-205.
- de Laat B, de Groot PG. Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep* 2011; 13(1):70-6.
- de Laat B, Mertens K, de Groot PG. Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies-from clinical association to pathologic mechanism. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4(4):192-9.
- de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IE et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost* 2009; 7(11):1767-73.
- Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(6):230.
- Favaloro EJ, Wong RC. Laboratory testing for the antiphospholipid syndrome: making sense of antiphospholipid antibody assays. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(3):447-61.
- Fischer MJ, Rauch J, Levine JS. The antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2007; 27(1):35-46.
- Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y, Krilis SA. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2009; 113(5):985-94.
- Greaves M, Cohen H, Machin SJ, Mackie I. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2000; 109(4):704-15.
- Hughes GR. Hughes syndrome: antiphospholipid syndrome. *J R Coll Physicians Lond* 1998; 32(3):260-4.
- Hughes GR. Hughes Syndrome (the antiphospholipid syndrome): ten clinical lessons. *Autoimmun Rev* 2008; 7(3):262-6.
- Hughes GR. Antiphospholipid syndrome, migraine and stroke. *Lupus* 2010; 19(5):555-6.
- Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13(3):486-9.

- Koike T, Bohgaki M, Amengual O, Atsumi T. Antiphospholipid antibodies: lessons from the bench. *J Autoimmun* 2007; 28(2-3):129-33.
- Lakos G, Favaloro EJ, Harris EN, Meroni PL, Tincani A, Wong RC et al. International consensus guidelines on anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I testing: report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum* 2012; 64(1):1-10.
- Mackworth-Young C. Primary antiphospholipid syndrome: a distinct entity? *Autoimmun Rev* 2006; 5(1):70-5.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2):295-306.
- Molina JF, Gutierrez-Urena S, Molina J, Uribe O, Richards S, De CC et al. Variability of anticardiolipin antibody isotype distribution in 3 geographic populations of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24(2):291-6.
- Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(4):335-9.
- Pengo V, Biasiolo A, Bison E, Chantarangkul V, Tripodi A. Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. *Thromb Res* 2007; 120(1):127-33.
- Pierangeli SS, de Groot PG, Dlott J, Favaloro E, Harris EN, Lakos G et al. 'Criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, Texas, April 2010. *Lupus* 2011; 20(2):182-90.
- Pierangeli SS, Favaloro EJ, Lakos G, Meroni PL, Tincani A, Wong RC et al. Standards and reference materials for the anticardiolipin and anti-beta-2-glycoprotein I assays: a report of recommendations from the APL Task Force at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin Chim Acta* 2012; 413(1-2):358-60.
- Sinico RA, Bollini B, Sabadini E, Di Toma L, Radice A. The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus. *J Nephrol JID - 9012268* 2002; 15 Suppl 6:S20-S27.
- Tincani A, Andreoli L, Casu C, Cattaneo R, Meroni P. Antiphospholipid antibody profile: implications for the evaluation and management of patients. *Lupus* 2010; 19(4):432-5.
- Tincani A, Morozzi G, Afeltra A, Alessandri C, Allegri F, Bistoni O et al. Antiprothrombin antibodies: a comparative analysis of homemade and commercial methods. A collaborative study by the Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA). *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25(2):268-74.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7):1309-11.
- Wong RC, Favaloro EJ, Adelstein S, Baumgart K, Bird R, Brighton TA et al. Consensus guidelines on anti-beta 2 glycoprotein I testing and reporting. *Pathology* 2008; 40(1):58-63.
- Wong RC, Gillis D, Adelstein S, Baumgart K, Favaloro EJ, Hendle MJ et al. Consensus guidelines on anticardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology* 2004; 36(1):63-8.

Notice to the user (European Union):

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU Member State in which the user and/or the patient is established .

Change Control

Former version: ORG 515_IFU_EN_QM113142_2016-04-18_2

Reason for revision: Introduction electronic IFU on homepage

- 1 Pipet **100 µl** calibrator, control or patient sample
 - Incubate for **30 minutes** at room temperature
 - Discard the contents of the wells and wash 3 times with **300 µl** wash solution
- 2 Pipet **100 µl** enzyme conjugate
 - Incubate for **15 minutes** at room temperature
 - Discard the contents of the wells and wash 3 times with **300 µl** wash solution
- 3 Pipet **100 µl** substrate solution
 - Incubate for **15 minutes** at room temperature
- 4 Add **100 µl** stop solution
 - Leave untouched for **5 minutes**
 - Read at **450 nm**

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com



 **529_4**




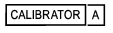



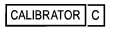

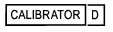





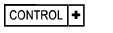

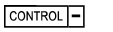



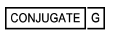

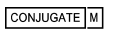





ORG 529 Anti-Phospholipid Screen IgG/IgM

INTENDED PURPOSE

Anti-Phospholipid Screen IgG/IgM is an ELISA test system to screen for the presence of IgG and IgM class autoantibodies against cardiolipin, phosphatidyl serine, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid and beta-2-glycoprotein I in human serum or plasma. This product is intended for professional in vitro diagnostic use only.

Antiphospholipid syndrome (APS, Hughes Syndrome) is a systemic autoimmune disease that causes thromboses, recurrent miscarriage or stillbirths, and stroke. Clinical symptoms are accompanied by specific autoantibodies in the blood, which bind to phospholipids like cardiolipin, or phospholipid-binding proteins like beta-2-glycoprotein I. Autoantibodies against proteins of the coagulation cascade, e.g. prothrombin or annexin V may also be found in patients with APS with otherwise negative phospholipid antibody results. In primary APS autoantibodies against phospholipids appear independently, while in secondary APS phospholipid antibodies are detected in conjunction with other autoimmune diseases, such as lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, or Sjögren's syndrome.

SYMBOLS USED ON LABELS

	In vitro diagnostic medical device		Microplate
	Manufacturer		Calibrator
	Catalogue number		Calibrator
	Sufficient for 96 determinations		Calibrator
	Batch code		Calibrator
	Use by		Calibrator
	Temperature limitation		Calibrator
	Keep away from sunlight		Control positive
	Do not reuse		Control negative
	Date of manufacture		Sample Buffer P
	CE marked according to 98/79/EC		Enzyme Conjugate
	Consult instructions for use		Enzyme Conjugate
	Electronic Instruction For Use: version		TMB Substrate
			Stop solution
			Wash Buffer
			Ready to use

PRINCIPLE OF THE TEST

A mixture of highly purified cardiolipin, phosphatidyl serine, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid and human beta-2-Glycoprotein I is bound to microwells.

The determination is based on an indirect enzyme linked immune reaction with the following steps:

Specific antibodies in the patient sample bind to the antigen coated on the surface of the reaction wells. After incubation, a washing step removes unbound and unspecifically bound serum or plasma components. Subsequently added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen-complexes. After incubation, a second washing step removes unbound enzyme conjugate. After addition of substrate solution the bound enzyme conjugate hydrolyses the substrate forming a blue coloured product. Addition of an acid stops the reaction generating a yellow end-product. The intensity of the yellow color correlates with the concentration of the antibody-antigen-complex and can be measured photometrically at 450 nm.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- All reagents of this kit are intended for professional in vitro diagnostic use only.
- Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2 by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.
- Bovine serum albumin (BSA) used in components has been tested for BSE and found negative.
- Avoid contact with the substrate TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine).
- Stop solution contains acid, classification is non-hazardous. Avoid contact with skin.
- Control, sample buffer and wash buffer contain sodium azide 0.09% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
- Enzyme conjugate contains ProClin 300 0.05% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.

During handling of all reagents, controls and serum samples observe the existing regulations for laboratory safety regulations and good laboratory practice:

- First aid measures: In case of skin contact, immediately wash thoroughly with water and soap. Remove contaminated clothing and shoes and wash before reuse. If system fluid comes into contact with skin, wash thoroughly with water. After contact with the eyes carefully rinse the opened eye with running water for at least 10 minutes. Get medical attention if necessary.
- Personal precautions, protective equipment and emergency procedures: Observe laboratory safety regulations. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled. When spilled, absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal.
- Exposure controls / personal protection: Wear protective gloves of nitril rubber or natural latex. Wear protective glasses. Used according to intended use no dangerous reactions known.
- Conditions to avoid: Since substrate solution is light-sensitive. Store in the dark.
- For disposal of laboratory waste the national or regional legislation has to be observed.

Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying control sera.

CONTENTS OF THE KIT

ORG 529	▽ 96	Sufficient for 96 determinations
<input type="checkbox"/> MICROPLATE	1	One divisible microplate consisting of 12 modules of 8 wells each. Ready to use. Product code on module: PSC
<input type="checkbox"/> CALIBRATOR A	1x 1.5 ml	Calibrator A 0 GPL-U/ml / 0 MPL-U/ml, containing serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
<input type="checkbox"/> CALIBRATOR B	1x 1.5 ml	Calibrator B 6.3 GPL-U/ml / 6.3 MPL-U/ml, containing phospholipid antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
<input type="checkbox"/> CALIBRATOR C	1x 1.5 ml	Calibrator C 12.5 GPL-U/ml / 12.5 MPL-U/ml, containing phospholipid antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
<input type="checkbox"/> CALIBRATOR D	1x 1.5 ml	Calibrator D 25 GPL-U/ml / 25 MPL-U/ml, containing phospholipid antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
<input type="checkbox"/> CALIBRATOR E	1x 1.5 ml	Calibrator E 50 GPL-U/ml / 50 MPL-U/ml, containing phospholipid antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
<input type="checkbox"/> CALIBRATOR F	1x 1.5 ml	Calibrator F 100 GPL-U/ml / 100 MPL-U/ml, containing phospholipid antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use.
<input type="checkbox"/> CONTROL +	1x 1.5 ml	Control positive, containing phospholipid antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.
<input type="checkbox"/> CONTROL -	1x 1.5 ml	Control negative, containing phospholipid antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.
<input type="checkbox"/> DILUENT	20 ml	Sample Buffer P, containing PBS, BSA, detergent, preservative sodium azide 0.09%, yellow, concentrate (5 x).
<input type="checkbox"/> CONJUGATE G	15 ml	Enzyme Conjugate; containing anti-human IgG antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative PROCLIN 0.05%, light red. Ready to use.
<input type="checkbox"/> CONJUGATE M	15 ml	Enzyme Conjugate; containing anti-human IgM antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative PROCLIN 0.05%, light red. Ready to use.
<input type="checkbox"/> TMB	15 ml	TMB Substrate; containing 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin, colorless. Ready to use.
<input type="checkbox"/> STOP	15 ml	Stop solution; contains acid. Ready to use.
<input type="checkbox"/> WASH	20 ml	Wash Buffer, containing Tris, detergent, preservative sodium azide 0.09%; 50 x concn.
<input type="checkbox"/> i	1	Certificate of Analysis

MATERIALS REQUIRED

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm; optional: reference filter at 620 nm
- Data reduction software
- Multi-channel dispenser or repeatable pipette for 100 µl
- Vortex mixer
- Pipettes for 10 µl, 100 µl and 1000 µl
- Laboratory timing device
- Distilled or deionised water
- Measuring cylinder for 1000 ml and 100 ml
- Plastic container for storage of the wash solution

This ELISA assay is suitable for use on open automated ELISA processors. Each assay has to be validated on the respective automated system. Detailed information is provided upon request.

SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

- Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
- Allow blood to clot and separate the serum or plasma by centrifugation.
- Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia should be avoided, but does not interfere with this assay.
- Specimens may be refrigerated at 2-8°C for up to five days or stored at -20°C up to six months.
- Avoid repetitive freezing and thawing of serum or plasma samples. This may result in variable loss of antibody activity.
- Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

STORAGE AND STABILITY

- Store test kit at 2-8°C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store microplate sealed and desiccated in the clip bag provided.
- Shelf life of the unopened test kit is 18 months from day of production.
Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.
- Diluted Wash Buffer and Sample Buffer are stable for at least 30 days when stored at 2-8°C.
We recommend consumption on the same day.

PROCEDURAL NOTES

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- Do not interchange kit components from different lots and products.
- All materials must be at room temperature (20-28°C) prior to use.
- Prepare all reagents and samples. Once started, perform the test without interruption.
- Double determinations may be done. By this means pipetting errors may become obvious.
- Perform the assay steps only in the order indicated.
- Always use fresh sample dilutions.
- Pipette all reagents and samples into the bottom of the wells.
- To avoid carryover or contamination, change the pipette tip between samples and different kit controls.
- Wash microwells thoroughly and remove the last droplets of wash buffer.
- All incubation steps must be accurately timed.
- Do not re-use microplate wells.

PREPARATION OF REAGENTS

WASH

Dilute the contents of one vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled or deionised water to a final volume of 1000 ml prior to use.

DILUENT

Sample Buffer P: Prior to use dilute the contents (20 ml) of one vial of sample buffer 5x concentrate with distilled or deionised water to a final volume of 100 ml.

Preparation of samples

Dilute patient samples 1:100 before the assay: Put 990 µl of prediluted sample buffer in a polystyrene tube and add 10 µl of sample. Mix well. Note: Calibrators / Controls are ready to use and need not be diluted.

TEST PROCEDURE

Prepare enough microplate modules for all calibrators / controls and patient samples.

- Pipette **100 µl** of calibrators, controls and prediluted patient samples into the wells.
Incubate for **30 minutes** at room temperature (20-28 °C).
Discard the contents of the microwells and **wash 3 times** with **300 µl** of wash solution.
- Dispense **100 µl** of enzyme conjugate into each well.
Incubate for **15 minutes** at room temperature.
Discard the contents of the microwells and **wash 3 times** with **300 µl** of wash solution.
- Dispense **100 µl** of TMB substrate solution into each well.
Incubate for **15 minutes** at room temperature
- Add 100 µl** of stop solution to each well of the modules
Incubate for **5 minutes** at room temperature.
Read the optical density at 450 nm (reference 600-690nm) and calculate the results.
The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read during this time.

Example for a pipetting scheme:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1	A	P1								
B	B	P2	B	P2								
C	C	P3	C	P3								
D	D	P4	D	P4								
E	E	P5	E	P5								
F	F	P6	F	P6								
G	C+	P7	C+	P7								
H	C-	P8	C-	P8								
	IgG	IgG	IgM	IgM								

P1, ... patient sample A-F calibrators C+, C- controls

VALIDATION

Test results are valid if the optical densities at 450 nm for calibrators / controls and the results for controls comply with the reference ranges indicated on the Certificate of Analysis enclosed in each test kit.

If these quality control criteria are not met the assay run is invalid and should be repeated.

CALCULATION OF RESULTS

For quantitative results plot the optical density of each calibrator versus the calibrator concentration to create a calibration curve. The concentration of patient samples may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

Using data reduction software a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Calibration

Calibration is related to the internationally recognised reference sera from E.N. Harris, Louisville and to IRP 97/656 (IgG) and HCAL (IgG) / EY2C9 (IgM).

Measuring range

The calculation range of this ELISA assay is IgG: 0 - 100 GPL-U/ml IgM: 0 - 100 MPL-U/ml

Expected values

In a normal range study with samples from healthy blood donors the following ranges have been established with this ELISA assay: Cut-off IgG: 10 GPL-U/ml IgM: 10 MPL-U/ml

Interpretation of results

Negative: IgG < 10 GPL-U/ml IgM < 10 MPL-U/ml
Positive: ≥ 10 GPL-U/ml ≥ 10 MPL-U/ml

Linearity

Patient samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in sample buffer to demonstrate the dynamic range of the assay and the upper / lower end of linearity. Activity for each dilution was calculated from the calibration curve using a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates.

Sample	Dilution	Observed GPL/MPL-U/ml	Expected GPL/MPL-U/ml	O/E [%]
IgG 1	1:100	98.0	98.4	100
	1:200	49.6	49.2	101
	1:400	24.3	24.6	99
	1:800	12.0	12.3	98
	1:1600	5.8	6.2	94
IgG 2	1:100	92.4	92.4	100
	1:200	45.9	46.2	99
	1:400	22.7	23.1	98
	1:800	11.4	11.6	99
	1:1600	5.4	5.8	94
IgM 1	1:100	92.7	92.7	100
	1:200	45.7	46.4	99
	1:400	22.8	23.2	98
	1:800	11.2	11.6	97
	1:1600	5.4	5.8	93
IgM 2	1:100	72.4	74.2	100
	1:200	36.5	37.1	98
	1:400	18.7	18.6	101
	1:800	8.9	9.3	96
	1:1600	4.4	4.6	95

Limit of detection

Functional sensitivity was determined to be: IgG: 0.5 GPL-U/ml IgM: 0.5 MPL-U/ml

Reproducibility

Intra-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Inter-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 6 determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

Intra-Assay IgG		
Sample	Mean GPL-U/ml	CV %
1	10.4	5.1
2	18.7	3.4
3	59.9	5.2

Inter-Assay IgG		
Sample	Mean GPL-U/ml	CV %
1	10.0	3.6
2	17.7	5.4
3	57.9	4.9

Intra-Assay IgM		
Sample	Mean MPL-U/ml	CV %
1	12.8	4.1
2	30.8	3.5
3	63.8	3.7

Inter-Assay IgM		
Sample	Mean MPL-U/ml	CV %
1	12.6	5.3
2	31.9	4.1
3	62.1	4.2

Interfering substances

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dl) or lipemic (up to 3 g/dl triglycerides) sera or plasma, or bilirubin (up to 40 mg/dl) containing sera or plasma. Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, Heparine). However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

Study results

Study population	n	Pos IgG	%	Pos IgM	%
Primary APS	8	7	87.5	6	75.0
Secondary APS	65	60	92.3	33	50.8
Normal human sera	150	4	2.7	5	3.3

		Clinical Diagnosis		
		POS	NEG	
ORG 529	POS	67	4	223
IgG	NEG	6	146	
		73	150	
Sensitivity:		91.8 %		
Specificity:		97.3 %		
Overall agreement:		95.5 %		

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 529	Pos	39	5	223
IgM	Neg	34	145	
		73	150	
Sensitivity:		53.4 %		
Specificity:		96.7 %		
Overall agreement:		82.5 %		

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

The above pathological and normal reference ranges for antibodies in patient samples should be regarded as recommendations only. Each laboratory should establish its own ranges according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.

REFERENCES

- Banzato A, Pozzi N, Frasson R, De F, V, Ruffatti A, Bison E et al. Antibodies to Domain I of beta(2)Glycoprotein I are in close relation to patients risk categories in Antiphospholipid Syndrome (APS). *Thromb Res* 2011; 128 (6):583-6.
- Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, de LB, Forastiero R et al. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus* 2011; 20(2):191-205.
- de Laat B, de Groot PG. Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep* 2011; 13(1):70-6.
- de Laat B, Mertens K, de Groot PG. Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies-from clinical association to pathologic mechanism. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4(4):192-9.
- de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IE et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost* 2009; 7(11):1767-73.
- Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(6):230.
- Favaloro EJ, Wong RC. Laboratory testing for the antiphospholipid syndrome: making sense of antiphospholipid antibody assays. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(3):447-61.
- Fischer MJ, Rauch J, Levine JS. The antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2007; 27(1):35-46.
- Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y, Krilis SA. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2009; 113(5):985-94.
- Greaves M, Cohen H, Machin SJ, Mackie I. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2000; 109(4):704-15.
- Hughes GR. Hughes syndrome: antiphospholipid syndrome. *J R Coll Physicians Lond* 1998; 32(3):260-4.
- Hughes GR. Hughes Syndrome (the antiphospholipid syndrome): ten clinical lessons. *Autoimmun Rev* 2008; 7(3):262-6.
- Hughes GR. Antiphospholipid syndrome, migraine and stroke. *Lupus* 2010; 19(5):555-6.
- Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13(3):486-9.
- Koike T, Bohgaki M, Amengual O, Atsumi T. Antiphospholipid antibodies: lessons from the bench. *J Autoimmun* 2007; 28(2-3):129-33.
- Lakos G, Favaloro EJ, Harris EN, Meroni PL, Tincani A, Wong RC et al. International consensus guidelines on anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I testing: report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum* 2012; 64(1):1-10.
- Mackworth-Young C. Primary antiphospholipid syndrome: a distinct entity? *Autoimmun Rev* 2006; 5(1):70-5.

- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2):295-306.
- Molina JF, Gutierrez-Urena S, Molina J, Uribe O, Richards S, De CC et al. Variability of anticardiolipin antibody isotype distribution in 3 geographic populations of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24(2):291-6.
- Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(4):335-9.
- Pengo V, Biasiolo A, Bison E, Chantarangkul V, Tripodi A. Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. *Thromb Res* 2007; 120(1):127-33.
- Pierangeli SS, de Groot PG, Dlott J, Favaloro E, Harris EN, Lakos G et al. 'Criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, Texas, April 2010. *Lupus* 2011; 20(2):182-90.
- Pierangeli SS, Favaloro EJ, Lakos G, Meroni PL, Tincani A, Wong RC et al. Standards and reference materials for the anticardiolipin and anti-beta-2-glycoprotein I assays: a report of recommendations from the APL Task Force at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin Chim Acta* 2012; 413(1-2):358-60.
- Sinico RA, Bollini B, Sabadini E, Di Toma L, Radice A. The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus. *J Nephrol JID - 9012268* 2002; 15 Suppl 6:S20-S27.
- Tincani A, Andreoli L, Casu C, Cattaneo R, Meroni P. Antiphospholipid antibody profile: implications for the evaluation and management of patients. *Lupus* 2010; 19(4):432-5.
- Tincani A, Morozzi G, Afeltra A, Alessandri C, Allegri F, Bistoni O et al. Antiprothrombin antibodies: a comparative analysis of homemade and commercial methods. A collaborative study by the Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA). *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25(2):268-74.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7):1309-11.
- Wong RC, Favaloro EJ, Adelstein S, Baumgart K, Bird R, Brighton TA et al. Consensus guidelines on anti-beta 2 glycoprotein I testing and reporting. *Pathology* 2008; 40(1):58-63.
- Wong RC, Gillis D, Adelstein S, Baumgart K, Favaloro EJ, Hendle MJ et al. Consensus guidelines on anticardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology* 2004; 36(1):63-8.

Notice to the user (European Union):

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU Member State in which the user and/or the patient is established .

Change Control

Former version: ORG 529_IFU_EN_QM113163_2016-04-18_3

Reason for revision: Introduction electronic IFU on homepage

- 1** Pipet **100 µl** calibrator, control or patient sample
 - Incubate for **30 minutes** at room temperature
 - Discard the contents of the wells and wash 3 times with **300 µl** wash solution
- 2** Pipet **100 µl** enzyme conjugate
 - Incubate for **15 minutes** at room temperature
 - Discard the contents of the wells and wash 3 times with **300 µl** wash solution
- 3** Pipet **100 µl** substrate solution
 - Incubate for **15 minutes** at room temperature
- 4** Add **100 µl** stop solution
 - Leave untouched for **5 minutes**
 - Read at **450 nm**

БЕКТОР



СА 72-4-ИФА-БЕСТ

T-8455

Набор реагентов
для иммуноферментного определения
концентрации опухолевого маркера СА 72-4
в сыворотке крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Утверждена 14.07.20.



1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации опухолевого маркера СА 72-4 в сыворотке крови «СА 72-4-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для количественного определения опухолевого маркера СА 72-4 в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Набор может быть использован при диагностике рака желудка, яичников, легких.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая калибровочные и контрольный образцы. Возможно дробное использование набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител к СА 72-4. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит одновременное связывание СА 72-4 с моноклональными антителами к СА 72-4, иммобилизованными на поверхности лунок, и конъюгатом моноклональных антител к СА 72-4 с пероксидазой. Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием раствора тетраметилбензидина плюс.

Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации СА 72-4 в анализируемых образцах. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты ИФА регистрируются измерением оптической плотности (ОП) в лунках планшета.

Концентрацию СА 72-4 в анализируемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания СА 72-4 в калибровочных образцах.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) <i>Описание</i>	Кол-во
Планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к СА 72-4	1 шт.
Калибровочные образцы* <i>Содержат известные количества СА 72-4 – 0; 5; 10; 25; 50; 100 Ед/мл. Содержат фенол (0,16%), ProClin 300 (0,05%).</i>	6 фл. по 0,7 мл
Контрольный образец <i>Содержит количество СА 72-4 в пределах, указанных в паспорте и на этикетке флакона, Ед/мл. Содержит фенол (0,16%), ProClin 300 (0,05%).</i>	1 фл., 0,7 мл
Конъюгат Конъюгат моноклональных антител к СА 72-4 с пероксидазой хрена. <i>Содержит ProClin 150 (0,044%), фенол (0,08%).</i>	1 фл., 13,0 мл

* аттестованы относительно калибраторов СА 72-4 Elecsys (фирма Roshe Diagnostics GmbH, Германия).

Раствор для разведения сывороток (РРС) <i>Содержит ProClin 300 (0,0005%).</i>	1 фл., 12,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) <i>Содержит ProClin 300 (0,25%).</i>	1 фл., 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) <i>Содержит 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (0,1%).</i>	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент <i>Содержит кислоту серную (4,9%).</i>	1 фл., 12,0 мл
Пленка для заклеивания планшета	1 шт.
Наконечники для дозаторов на 2–200 мкл	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.
Трафарет для построения калибровочного графика	1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1.* Воспроизводимость – коэффициент вариации не превышает 8%.

3.2.* Линейность в диапазоне концентраций 5–100 Ед/мл СА 72-4 – в пределах 90–110%

3.3.* Тест на «открытие» – в пределах 90–110%.

3.4.* Аналитическая чувствительность – минимально определяемая концентрация СА 72-4 не превышает 0,16 Ед/мл.

3.5. Аналитическая специфичность: не обнаружено перекрестной реакции используемых

* по ГОСТ Р 51352-2013.

моноклональных антител с СА-125 (до 400 Ед/мл), СА 15-3 (до 250 Ед/мл), СА 19-9 (до 150 Ед/мл), АФП (до 400 МЕ/мл), ПСА (до 40 нг/мл), РЭА (до 880 мМЕ/мл).

3.6. Хук-эффект высоких концентраций не был обнаружен вплоть до концентрации 1000 Ед/мл СА 72-4.

3.7. Концентрация СА 72-4, измеренная в сыворотке крови 366 здоровых мужчин и женщин в возрасте 20–50 лет не превышала 6 Ед/мл.

3.8. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации СА 72-4, соответствующие нормальным для данного региона у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Стоп-реагент и раствор ТМБ плюс обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора ТМБ плюс на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количе-

ством проточной воды. Некоторые компоненты содержат ProClin 150, ProClin 300, фенол, кислоту серную, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2. «Состав набора».

Все компоненты набора, содержащиеся в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми, контрольным образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание с частотой 400–800 об/мин и температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- дозаторы одноканальные со сменными накопечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 10 до 5000 мкл;
- дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 до 300 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исклю-

чения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

6.2. Для проведения анализа использовать образцы сыворотки крови человека.

6.3. Образцы сыворотки крови следует хранить при температуре (2–8)°С не более 5 суток, или при температуре минус 18°С и ниже, если требуется более длительное хранение. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сыворотки крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

6.5. Образцы, содержащие гемоглобин в концентрации до 2 мг/мл, билирубин в концентрации до 0,2 мг/мл, триглицериды в концентрации до 20 мг/мл пригодны для использования.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Внимание! *Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.*

- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18–26)°С не менее 30 мин.
- При дробном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре (2–8)°С, использовать в течение всего срока годности набора. Допускается хранение ФСБ-Т×25 и стоп-реагента при температуре (2–30)°С.
- Необходимо избегать воздействие прямого солнечного света на раствор ТМБ плюс при подготовке и проведении ИФА.
- При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, раствор ТМБ плюс, стоп-реагент),

которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

- Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.
- При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.
- При использовании автоматического устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.
- Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

- В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ плюс ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду (ванночки) дезинфицирующими растворами и моющими средствами.
- Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Перемешать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его при температуре (30–40)°С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре (2–8)°С не более 1 месяца или при (18–26)°С не более 7 суток.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистил. вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.4. Конъюгат.

Конъюгат готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

7.5. Раствор ТМБ плюс.

Раствор ТМБ плюс готов к использованию. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу

расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ плюс в ванночку для реагента.

7.6. Подготовка исследуемых образцов.

Исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре (18–26)°С не менее 30 мин.

7.7. Калибровочные и контрольный образцы, стоп-реагент готовы к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 50 мкл каждого калибровочного образца и по 50 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки крови.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин.

8.2. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.4.), заклеить стрипы пленкой и инкубировать 60 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре (37±1)°С.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз про-

мывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см. п. 7.5.) и инкубировать в защищенном от прямого солнечного света месте 15 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$.

Остатки раствора ТМБ плюс из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором).

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек, при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

8.6. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение при одной длине волны – 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольный и анализируемые образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности от концентрации СА 72-4 в калибровочных образцах (Ед/мл).

9.3. Определить концентрацию СА 72-4 в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

Если концентрация СА 72-4 в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 100 Ед/мл, образец следует дополнительно развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

9.4. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации СА 72-4 в контрольном образце соответствует диапазону концентраций, указанному на этикетке флакона.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных

средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8)°С. Допускается транспортирование при температуре до 26°С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2–8)°С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. Набор предназначен для однократного применения.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

**По вопросам, касающимся качества набора
«СА 72-4-ИФА-БЕСТ»,**

следует обращаться в АО «Вектор-Бест»

по адресу:

630559, Новосибирская область,

Новосибирский район,

п. Кольцово, а/я 121,

тел. (383) 227-67-64, (383) 227-75-41,

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

1. Расчет результатов анализа

По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности (ОП) в лунках с анализируемыми образцами.

Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации СА 72-4 (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий. Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

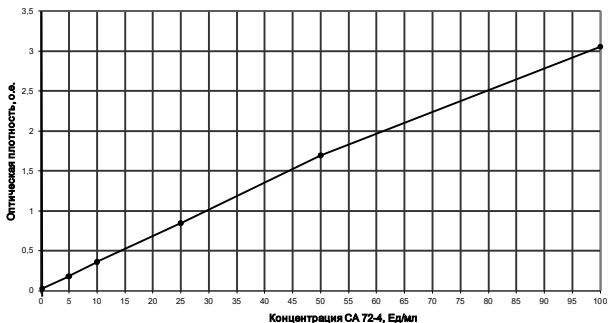


Рисунок. Пример зависимости оптической плотности от концентрации СА 72-4 в калибровочных образцах.

Определить концентрацию СА 72-4 в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации СА 72-4 в образце. Полученную концентрацию СА 72-4 умножить на фактор разведения (см. п. 9.3.).

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.









При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации СА 72-4 в сыворотке крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

2. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «СА 72-4-ИФА-БЕСТ»

*Использовать только после внимательного
ознакомления с инструкцией!*

- Внести:** по 50 мкл калибровочных и контрольного образцов в дублях;
по 50 мкл анализируемых образцов в дублях.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора ТМБ плюс.
- Инкубировать:** 15 мин, 37°C, 650 об/мин, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

3. Графические символы

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до ...		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

22.10.20.

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»

Международный сертификат ISO 13485

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru

www.vector-best.ru

БЕКТОР



СУFRA 21-1-ИФА-БЕСТ

Т-8437

Набор реагентов
для иммуноферментного определения
концентрации опухолевого маркера СУFRA 21-1
в сыворотке (плазме) крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкция утверждена 29.08.22



1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. «Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации опухолевого маркера CYFRA 21-1 в сыворотке (плазме) крови (CYFRA 21-1-ИФА-БЕСТ)» (далее по тексту – набор) предназначен для количественного определения опухолевого маркера – растворимого фрагмента цитокератина 19 (CYFRA 21-1) в сыворотке, плазме (с Li-гепарином) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в качестве вспомогательного средства диагностики злокачественных новообразований эпителиального генеза.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая калибровочные и контрольный образцы. Возможно дробное использование набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном «сэндвич» – варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител к CYFRA 21-1. В лунках планшета при добавлении анализируемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит одновременное связывание растворимого фрагмента цитокератина 19 с моноклональными антителами к CYFRA 21-1, иммобилизованными на поверхности лунок, и конъюгатом

моноклональных антител к СУФРА 21-1 с пероксидазой хрена. При инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся иммунные комплексы. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации СУФРА 21-1 в анализируемом образце. После остановки реакции стоп-реагентом результаты ИФА регистрируются измерением оптической плотности (ОП) в лунках планшета.

Концентрацию СУФРА 21-1 в анализируемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от концентрации СУФРА 21-1 в калибровочных образцах.

2.2. Состав набора

Набор выпускается в двух вариантах комплектации.

Компонент набора (сокращение) <i>Описание</i>	Количество	
	Комплект 1	Комплект 2
Планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к СУФРА 21-1	1 шт.	1 шт.

<p>Калибровочные образцы* <i>Содержат известные количества CYFRA 21-1 – 0; 1; 5; 10; 25; 50 нг/мл (более точные количества CYFRA 21-1 указаны в паспорте и на этикетках флаконов). Содержат фенол (0,16%), ProClin 300 (0,05%), лиофилизированы</i></p>	6 фл.	–
<p>Контрольный образец <i>Содержит количество CYFRA 21-1 в пределах, указанных в паспорте и на этикетке флакона, нг/мл. Содержит фенол (0,16%), ProClin 300 (0,05%), лиофилизирован</i></p>	1 фл.	–
<p>Калибровочные образцы* <i>Содержат известные количества CYFRA 21-1 – 0; 1; 5; 10; 25; 50 нг/мл. Содержат фенол (0,16%), ProClin 300 (0,05%), готовые для использования</i></p>	–	6 фл. по 0,7 мл
<p>Контрольный образец <i>Содержит количество CYFRA 21-1 в пределах, указанных в паспорте и на этикетке флакона, нг/мл. Содержит фенол (0,16%), ProClin 300 (0,05%), готовый для использования</i></p>	–	1 фл., 0,7 мл
<p>Конъюгат <i>Конъюгат моноклональных антител к CYFRA 21-1 с пероксидазой хрена. Содержит ProClin 150 (0,044%), фенол (0,08%).</i></p>	1 фл., 13,0 мл	1 фл., 13,0 мл

*Калибровочные образцы аттестованы относительно внутреннего стандарта предприятия.

Раствор для разведения сывороток (РРС) <i>Содержит ProClin 300 (0,0005%).</i>	1 фл., 12,0 мл	1 фл., 12,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) <i>Содержит ProClin 300 (0,25%).</i>	1 фл., 28,0 мл	1 фл., 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) <i>Содержит 3,3',5,5' – тетраметилбензидин (0,1%).</i>	1 фл., 13,0 мл	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент <i>Содержит кислоту серную (4,9%).</i>	1 фл., 12,0 мл	1 фл., 12,0 мл
Пленка для заклеивания планшета	1 шт.	1 шт.
Наконечники для дозаторов на 2-200 мкл	16 шт.	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.	2 шт.
Трафарет для построения калибровочного графика	1 шт.	1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1.* Линейность в диапазоне концентраций 0–50 нг/мл CYFRA 21-1 – в пределах 90% – 110%.

3.2.* Воспроизводимость – коэффициент вариации не превышает 8%.

3.3.* Тест на «открытие» – в пределах 90% – 110%.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

3.4.* Чувствительность – минимально определяемая концентрация CYFRA 21-1 не превышает 0,15 нг/мл.

3.5. Аналитическая специфичность: не обнаружено перекрестной реакции используемых моноклональных антител с СА 15-3 (до 250 Ед/мл), АФП (до 400 МЕ/мл), ПСА (до 40 нг/мл), РЭА (до 80 нг/мл) и СА 72-4 (до 100 Ед/мл).

3.6. Потенциально интерферирующие вещества.

Возможные интерференции были определены путем тестирования образцов, в которых содержалось повышенная концентрация предполагаемого материала, который может присутствовать в сыворотке пациента. Гемоглобин в концентрации до 2 мг/мл, билирубин в концентрации до 0,2 мг/мл, триглицериды в концентрации до 20 мг/мл не оказывают интерферирующего влияния.

3.7. Концентрация CYFRA 21-1, измеренная в сыворотке крови 516 условно здоровых мужчин и женщин в возрасте 20–50 лет не превышала 1,8 нг/мл. 95й перцентиль – 1,79 нг/мл, медиана – 0,14 нг/мл.

3.8. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации CYFRA 21-1, соответствующие нормальным для данного региона у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Стоп-реагент и раствор ТМБ плюс обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора ТМБ плюс на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды. Некоторые компоненты содержат ProClin 150, ProClin 300, фенол, кислоту серную, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2. «Состав набора».

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми, контрольным образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.7. Противопоказания. Не применимо. Изделие предназначено для клинической лабораторной диагностики.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;

- или любой автоматический ИФА-анализатор открытого типа;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание с частотой 400–800 об/мин и температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
 - промывочное устройство для планшетов;
 - холодильник бытовой;
 - дозаторы одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 10 до 5000 мкл;
 - дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 до 300 мкл;
 - цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
 - вода дистиллированная;
 - перчатки медицинские диагностические одноразовые;
 - бумага фильтровальная лабораторная;
 - дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные

клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

6.2. Для проведения анализа использовать образцы сыворотки, плазмы (с Li-гепарином) крови человека.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови следует хранить при температуре (2–8)°С не более 5 суток, или при температуре минус 18°С и ниже, не более 3 месяцев или до 12 месяцев при температуре не выше минус 40°С. Повторное размораживание и замораживание анализируемых образцов не допускается. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

6.5. Образцы с присутствием выраженного гемолиза и коагуляции (наличие сгустков) не подходят для тестирования.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

– Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18–26)°С не менее 30 мин.

– При детальном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре (2–8)°С, использовать в течение всего срока годности набора. Допускается хранение ФСБ-Т×25 и стоп-реагента при температуре (2–30)°С.

– Необходимо избегать воздействие прямого солнечного света на раствор ТМБ плюс при подготовке и проведении ИФА.

– При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, раствор ТМБ плюс, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

– Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

– При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

– При использовании автоматического устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.

– Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

– В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ плюс ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду (ванночки) дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

– Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок.

Хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Перемешать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его при температуре (30–40)°C до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре (2–8)°C не более 1 месяца или при (18–26)°C не более 7 суток.

7.4. Конъюгат.

Конъюгат готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в

Таблица расхода компонентов

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистил. вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре (2–8)°С в течение всего срока годности набора.

7.5. Раствор ТМБ плюс.

Раствор ТМБ плюс готов к использованию. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов

(см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ плюс в ванночку для реагента.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре (2–8)°С в течение всего срока годности набора.

7.6. Подготовка исследуемых образцов.

Исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при температуре (18–26)°С не менее 30 мин.

7.7. Подготовка калибровочных и контрольных образцов

Комплект №1:

Открыть флакон, не допуская потери лиофилизированного материала, внести во флакон 0,7 мл дистиллированной воды. Затем аккуратно закрыть флакон и выдержать его 30 мин, периодически осторожно перемешивая путем переворачивания и вращения флакона вручную, избегая образования пены. При дробном использовании набора при необходимости разделить на аликвоты растворенные калибровочные и контрольный образцы и поместить в морозильную камеру.

Хранение: растворенный калибровочный/контрольный образец хранить при температуре от 2 до 8°С не более 1 месяца или при температуре минус 18°С в течение срока годности

в плотно закрытом виде, перед использованием выдержать при температуре от 18 до 26°C в течение 30 мин. Не допускается повторное замораживание/оттаивание контрольного и калибровочных образцов.

Комплект №2:

Готовые калибровочные и контрольный образцы не требуют дополнительной подготовки.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.8. Стоп-реагент

Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре (2–30)°C в течение всего срока годности набора.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 50 мкл каждого калибровочного образца и по 50 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 50 мкл анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Время внесения образцов не должно превышать 20 мин.

8.2. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.4.), заклеить стрипы пленкой и инкубировать 60 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температурой (37±1)°C.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать **(не сливать во флакон с исходным конъюгатом)**.

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см. п. 7.5.) и инкубировать в защищенном от прямого солнечного света месте 15 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$.

Остатки раствора ТМБ плюс из ванночки утилизировать **(не сливать во флакон с исходным раствором)**.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек, при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

8.6. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и референсной длине волны в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение при одной длине волны – 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольный и анализируемые образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности от концентрации CYFRA 21-1 в калибровочных образцах (нг/мл).

9.3. Определить концентрацию CYFRA 21-1 в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

Если концентрация CYFRA 21-1 в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 50 нг/мл, образец следует дополнительно развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл анализируемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

9.4. Результаты анализа анализируемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

- $ОП_0 < ОП_1 < ОП_5 < ОП_{10} < ОП_{25} < ОП_{50}$;
- $ОП_{50} \geq 1,0$ ед. опт. плотн. (е.о.), где $ОП_{50}$ – значение оптической плотности в лунке с калибровочным образцом 50 нг /мл;
- $ОП_0 < 0,1$ е.о.;
- вычисленное по калибровочному графику значение концентрации СУFRA 21-1 в контрольном образце соответствует диапазону концентраций, указанному на этикетке флакона.

$ОП_0, ОП_1, ОП_5, ОП_{10}, ОП_{25}$ и $ОП_{50}$ – средние значение оптической плотности калибровочных образцов 0, 1, 5, 10, 25, 50 нг/мл соответственно.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8)°С. Допускается транспортирование при температуре до 26°С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2–8)°С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный

температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. Набор предназначен для однократного применения.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

**По вопросам, касающимся качества набора
«CYFRA 21-1-ИФА-БЕСТ»,**

следует обращаться в АО «Вектор-Бест»

по адресу:

630559, Новосибирская область,

р.п. Кольцово, а/я 121,

тел. (383) 227-67-64, (383) 227-75-41.












E-mail: vbobtk@vector-best.ru

**Краткая схема проведения ИФА
для набора реагентов
«CYFRA 21-1-ИФА-БЕСТ»**

*Использовать только после внимательного
ознакомления с инструкцией!*

- Внести:** по 50 мкл калибровочных и контрольного образцов в дублях;
по 50 мкл анализируемых образцов в дублях.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором,
350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора ТМБ плюс.
- Инкубировать:** 15 мин, 37°C, 650 об/мин, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная
длина волны 620–655 нм.

Графические символы

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до ...		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 227-75-41.

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»

Международный сертификат ISO 13485

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел.: (383) 252-51-66, 252-51-68, 252-51-65,
252-51-64, 252-51-67
E-mail: vbmarket@vector-best.ru

www.vector-best.ru
