

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	9
11. ЛИТЕРАТУРА	9

CONTENT

1. INTENDED USE	10
2. SUMMARY AND EXPLANATION	10
3. PRINCIPLE OF THE TEST	10
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	11
5. KIT COMPONENTS	12
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	13
7. TEST PROCEDURE	13
8. QUALITY CONTROL	15
9. CALCULATION OF RESULTS	15
10. EXPECTED VALUES	16
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	16
12. LITERATURE	16

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ «IgG2-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «IgG2-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации IgG2 в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Среди антител класса IgG человека на основании различий в аминокислотной последовательности тяжелых цепей выделяют четыре подкласса – IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Подкласс IgG2 играет существенную роль в иммунном ответе на полисахаридные антигены инкапсулированных бактерий. Избирательный дефицит IgG2 характеризуется пониженным содержанием IgG2 в сыворотке и сопровождается ослаблением иммунного ответа при инфицировании менингококками, пневмококками, гемофильной палочкой и другими патогенами. В результате повышается риск развития хронических инфекционных заболеваний верхних и нижних дыхательных путей, неэффективными оказываются стандартные схемы лечения и вакцинация полисахаридными антигенами. Снижение содержания IgG2 наблюдают также в большинстве случаев общего переменного иммунодефицита.

1.3. Содержание IgG2 в сыворотке крови человека составляет около 20% от общего уровня IgG. Концентрация IgG2, будучи одним из показателей иммунного статуса индивида, является параметром, который принимают во внимание при диагностике, прогнозе развития ряда заболеваний и контроле эффективности лечения.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgG2 основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к IgG2 человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание IgG2, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к IgG2 с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG2 в исследуемом образце. Концентрацию IgG2 в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания IgG2 в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция мышиных моноклональных антител к IgG2 с другими анализатами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
IgA	<0.1
IgM	<0.1
IgE	<0.1

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG2 в одном и том же образце сыворотки крови с использованием Набора «IgG2-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации IgG2 в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей IgG2, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.5–15 г/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации IgG2 предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 1 г/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «IgG2-ИФА» концентрация IgG2 в сыворотке крови не превышает 0.12 г/л.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P272Z	SORB MTP	1	ШТ	-
2	C272Z	CAL 1-6	6	ШТ	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 - прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q272Z	CONTROL	1	ШТ	прозрачная бесцветная жидкость
4	T272Z	CONJ HRP	1	ШТ	прозрачная жидкость пурпурного цвета
5	S011Z3	DIL	1	ШТ	прозрачная жидкость синего цвета
6	SP272Z	DIL SPE	1	ШТ	прозрачная жидкость желтого цвета
7	R055Z	SUBS TMB	1	ШТ.	прозрачная бесцветная жидкость
8	S008Z	BUF WASH 21X	1	ШТ.	прозрачная бесцветная жидкость
9	R050Z	STOP	1	ШТ.	прозрачная бесцветная жидкость
10	N003	-	2	ШТ.	-
11	K272I	-	1	ШТ	-
12	K272Q	-	1	ШТ	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. 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.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «IgG2-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации IgG2 в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов - исследуемые образцы в 2 повторах и 14 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Для предварительной обработки пробы внесите в первый ряд пробирок 10 мкл исследуемого образца и 500 мкл буфера для обработки проб S272Z ; тщательно перемешайте и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 20–25 °С . После окончания инкубации ДОПОЛНИТЕЛЬНО разбавьте все образцы буфером S011Z (ИФА-Буфер) в 100 раз , для этого перенесите 10 мкл обработанной пробы во второй ряд пробирок, содержащий 1000 мкл буфера S011Z и снова тщательно перемешайте. Не разбавляйте контрольные образцы и калибровочные пробы!
3	Если предполагаемая концентрация IgG2 в исследуемом образце превышает 15 г/л, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки крови.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 100 мкл разбавленных исследуемых образцов сыворотки крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза . При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
10	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 °С) в течение 10-20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.

продолжение таблицы на стр. 8

11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидаина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в яркий желтый цвет.
12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
13	Постройте в линейных координатах калибровочных график: ось абсцисс (x) – концентрация IgG2 в калибровочных пробах (г/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
14	Определите по калибровочному графику содержание IgG2 в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п.3), умножьте полученный результат на фактор разведения.

Таблица М

Вид материала	Сбор, хранение и обработка материала	Пример разведения	красный ИФА-Буфер в лунку, мкл	Образец в лунку, мкл	Фактор пересчета
сыворотка крови	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных, хилезных и гемолитических образцов может привести к искажению результатов.	10 мкл образца + 500 мкл буфера для разведения образцов	10 мкл образц-работ-ной пробы + 1000 мкл ИФА-Буфера	100	1

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций IgG2 в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.12 г/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (15 г/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация IgG2 ниже 0.12 г/л или выше 15 г/л.

Исследуемая группа	Единицы, г/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	1.0	7.5

11. ЛИТЕРАТУРА

1. RG Hamilton - Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. Clin. Chem., Oct 1987; 33: 1707 - 1725.
2. V. A. Semenova, E. Steward-Clark, K. L. Stamey, T. H. Taylor, Jr., D. S. Schmidt, S. K. Martin, N. Marano, and C. P. Quinn - Mass Value Assignment of Total and Subclass Immunoglobulin G in a Human Standard Anthrax Reference Serum. Clin. Diagn. Lab. Immunol., Sep 2004; 11: 919 - 923.

По вопросам, касающимся качества Набора «**IgG2-ИФА**», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:

105043, Москва, а/я 58,

тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru

интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,

к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF IgG2 IN HUMAN BLOOD SERUM

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of IgG2 in blood serum .

This kit is designed for measurement of IgG2 in blood serum. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 41 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

IgG2 subclass plays a pivotal role in immune response to polysaccharide antigens of encapsulated bacteria. Selective IgG2 deficiency is characterized by low or absent serum IgG2 and may lead to higher probability of infections caused by Meningococcus, Pneumococcus, Haemophilus and related pathogens. In this case the risk of chronic infectious diseases of respiratory system is increased. Low serum IgG2 is also observed in common variable immunodeficiency (CVID). IgG2 serum content comprises 20 % of total serum IgG. Serum IgG2 determination may be used for monitoring of humoral immune status.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to human IgG2-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies - murine monoclonal to human IgG2, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	SORB MTP IgG2 EIA strips, 8x12 wells		1 pcs		until exp.date
2	CAL 1-6 Calibrator set, 1 ml each. The set contains 6 calibrators: 0; 0.5; 1; 3; 7.5; 15 g/l		6 pcs	red (CI - colourless)	2 months
3	CONTROL Control serum (1 ml)		1 pcs	colourless	2 months
4	CONJ HRP Conjugate, 11 ml		1 pcs	purple	until exp.date
5	DIL EIA buffer 50 ml		1 pcs	blue	until exp.date
6	DIL SPE EIA Sample buffer 22 ml		1 pcs	yellow	until exp.date
7	SUBS TMB Substrate solution, 11 ml		1 pcs	colourless	until exp.date
8	BUF WASH 21X Washing solution concentrate 21x, 22 ml		1 pcs	colourless	Concentrate - until exp.date Diluted washing solution - 1 month at 2-8 °C or 5 days at RT
9	STOP Stop solution, 11 ml		1 pcs	colourless	until exp.date
10	N003 Plate sealing tape		2 pcs		N/A
11	K272I Instruction IgG2 EIA		1 pcs		N/A
12	K272Q QC data sheet IgG2 EIA		1 pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 μl , is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 μl ;
- Dry thermostat for 37 $^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ $^{\circ}\text{C}$
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 $^{\circ}\text{C}$ upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 $^{\circ}\text{C}$ before testing.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 $^{\circ}\text{C}$) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 14 wells for the calibrators CAL 1–6 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Pretreatment of the samples: in a first row of tubes, add 10 µl of the serum sample to 500 µl of EIA Sample buffer (DIL SPE), mix thoroughly and incubate for 30 minutes at +20...+25 °C. Then transfer 10 µl of pretreated sample into the second row of tubes, containing 1000 µl of EIA buffer (DIL) 100 fold and mix again. Do not dilute control sample and calibrators.
3	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using EIA Buffer (DIL). Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
4	Pipet 100 µl of calibrators CAL 1–6 and control samples CONTROL into allocated wells. For testing of blood serum pipet 100 µl of pretreated sample into the allocated wells. Pipetting should be made within 3 minutes, to ensure an uniform incubation time for all samples. Carefully mix the contents of the wells by short horizontal rotating of the plate for 5–7 seconds and cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 30 minutes at 37 °C .
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times
7	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells.
8	Incubate 30 minutes at 37 °C .
9	Wash the strips 5 times.
10	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
11	Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C
12	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
13	Measure OD (optical density) at 450 nm.
14	Set photometer blank on first calibrator
15	Apply point-by-point method for data reduction.
16	Apply point-by-point method for data reduction. Use Calculation factor listed in table M to calculate analyte concentration in different material types.

7.5. Sample processing

Material type	Notes on material collection, storage and handling	Sample dilution example	red EIA buffer into the well, μl	Sample into the well, μl	Calculation factor
blood serum	Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided and should be treated by centrifugation before testing.	10 μl of sample + 500 μl of EIA Sample buffer DIL SPE	10 μl of pretreated sample + 1000 μl of EIA buffer DIL	100	1

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

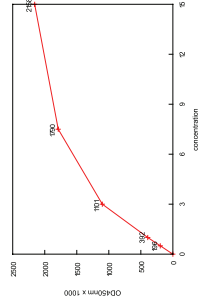
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus IgG2 concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of IgG2 in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 g/l	0.08
CAL 2	0.5 g/l	0.27
CAL 3	1 g/l	0.47
CAL 4	3 g/l	1.18
CAL 5	7.5 g/l	1.87
CAL 6	15 g/l	2.24



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for IgG2. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units, g/l	
	Lower limit	Upper limit
Healthy donors	1.0	7.5

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
IgA	<0.1
IgM	<0.1
IgE	<0.1

11.2. Analytical sensitivity.

Sensitivity of the assay was assessed as being 0.12 g/l.

11.3. Linearity.

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different IgG2 concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery.

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known IgG2 concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

12. LITERATURE

1. RG Hamilton - Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. Clin. Chem., Oct 1987; 33: 1707 - 1725.
2. V. A. Semenova, E. Steward-Clark, K. L. Stamey, T. H. Taylor, Jr., D. S. Schmidt, S. K. Martin, N. Marano, and C. P. Quinn - Mass Value Assignment of Total and Subclass Immunoglobulin G in a Human Standard Anthrax Reference Serum. Clin. Diagn. Lab. Immunol., Sep 2004; 11: 919 - 923.