

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 ОБЩЕГО IgM В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ «общий IgM-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «общий IgM-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации общего IgM в биологических жидкостях (см. таблицу М) методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Иммуноглобулин М (IgM) присутствует в крови как в мономерной, так и в пентамерной формах. Повышенная концентрация IgM в сыворотке крови является основным признаком первичного иммунного ответа, а также может свидетельствовать о персистирующих бактериальных и вирусных инфекциях. Снижение концентрации IgM в сыворотке крови наблюдается при некоторых иммунодефицитах. Резкое повышение уровня IgM характерно для макроглобулинемии (болезни Вальденстрема) и IgM миеломы.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение общего IgM основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к общему IgM человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание общего IgM, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к общему IgM 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 общего IgM в исследуемом образце. Концентрацию общего IgM в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания общего IgM в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

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

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания общего IgM в одном и том же образце биологических жидкостей с использованием Набора «общий IgM-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации общего IgM в образцах биологических жидкостей при разведении их биологическими жидкостями, не содержащей общий IgM, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.5-10 г/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации общего IgM предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 2 г/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «общий IgM-ИФА» концентрация общего IgM в биологических жидкостях не превышает 0.12 г/л.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	R277Z	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C277Z	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества общего IgM – 0; 0.5; 2; 5; 10 г/л, готовы к использованию (по 1 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости пурпурного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q277Z	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием общего IgM, готова к использованию (1 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4	T277Z	Конъюгат, готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость пурпурного цвета
5	S012Z	Красный ИФА-Буфер, готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная жидкость красного цвета
6	S011Z3	ИФА-Буфер, готов к использованию (50 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
7	R055Z	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	S008Z	Концентрат отмывочного раствора, 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9	R050Z	Стоп-реагент, готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
10	N003	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
11	K277I	Инструкция по применению Набора реагентов «общий IgM-ИФА»	1	шт.	-
12	K277Q	Паспорт контроля качества Набора реагентов «общий IgM-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2a (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 $+37\pm 0,1$ °С;
- 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 (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18-25$ °С) 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 $+2-8$ °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. 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 «общий IgM-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 42 исследуемых образцов, 5 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 (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) 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 общего IgM 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 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки. ВНИМАТЕЛЬНО: объем внесения калибровочной пробы/контрольной сыворотки в лунки планшета отличается от объема внесения исследуемых образцов!
2	Разбавьте образцы сыворотки (плазмы) крови в 200 раз, используя ИФА-Буфер (S011Z3). Пример: 5 мкл образца + 1000 мкл буфера для разведения образцов. Способ разведения для других видов материала приведен в таблице М. Не разбавляйте калибровочные пробы и контрольную сыворотку.
3	Если предполагаемая концентрация общего IgM в исследуемом образце превышает 10 г/л, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер (S011Z3). 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 (плазмы) крови.
4	Внесите в лунки планшета предназначенные для сыворотки (плазмы) крови по 120 мкл красного ИФА-Буфера. При исследовании других видов материала объем вносимого красного ИФА-Буфера указан в таблице М.
5	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. При исследовании сыворотки (плазмы) кровив лунки, предназначенные для исследуемых образцов, внесите по 5 мкл разбавленных образцов. При исследовании других видов материала объем вносимого исследуемого образца указан в таблице М. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5-10 минут.
6	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.
7	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.
8	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
9	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
10	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
11	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензида. Внесение раствора субстрата тетраметилбензида 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

12	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержащее лунок окрашивается в яркий-желтый цвет.
13	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержащего лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм . Измерение ОП содержащего лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставьте по калибровочной пробе С1.
14	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) – концентрация общего IgM в калибровочных пробах (г/л), ось ординат (у) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
15	Определите по калибровочному графику содержание общего IgM в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предрезволили (см. п.2), умножьте полученный результат на фактор разведения. При анализе различных видов материала необходимо умножить полученные значения на фактор пересчета, приведенный в таблице М.

Таблица М

Вид материала	Сбор, хранение и обработка материала	Пример разведения	красный ИФА-Буфер в лунку, мкл	Образец в лунку, мкл	Фактор пересчета
сыворотка (плазма) крови	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных, хилезных и гемолитических образцов может привести к искажению результатов.	5 мкл образца + 1000 мкл буфера для разведения образцов	120	5	1
слюна	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных образцов может привести к искажению результатов.		90	10	0.002
моча	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных образцов может привести к искажению результатов.		50	50	0.0004
спинно-мозговая жидкость	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных образцов может привести к искажению результатов.		80	20	0.001

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 общего IgM в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.12 г/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (10 г/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация общего IgM ниже 0.12 г/л или выше 10 г/л.

Исследуемая группа	Единицы	
	г/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	0.7	3.7
новорожденные	0.1	0.35
1-3 месяца	0.12	0.9
4-6 месяцев	0.25	1.2
7-12 месяцев	0.35	1.0
1-6 лет	0.55	2.2
7-11 лет	0.65	1.7

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Erik J. Wiersma, Cathy Collins, Shafie Fazel, and Marc J. Shulman Structural and Functional Analysis of J Chain-Deficient IgM J. Immunol., Jun 1998; 160: 5979 – 5989.

По вопросам, касающимся качества Набора «**общий IgM-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 TOTAL IgM IN HUMAN BIOLOGICAL FLUIDS

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of total IgM in biological fluids.

This kit is designed for measurement of total IgM in biological fluids. 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 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Immunoglobulin M (IgM) is secreted during primary immune response and exists in monomeric and pentameric forms. Elevated serum IgM is observed in chronic inflammation, macroglobulinemia and IgM myeloma. Decreased IgM level may occur in some immunodeficiency syndromes.

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 total IgM-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 total IgM, 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 total IgM EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2	CAL 1-5 Calibrator set, 1 ml each. The set contains 5 calibrators: 0; 0.5; 2; 5; 10 g/l	5	pcs	purple (C1 – 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 red EIA buffer, 11 ml	1	pcs	red	until exp.date
6	DIL SPE EIA buffer, 50 ml	1	pcs	blue	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	K2771 Instruction total IgM EIA	1	pcs		N/A
12	K277Q QC data sheet total IgM 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 μ l, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25-250 μ l;
- Dry thermostat for 37 $^{\circ}$ C \pm 0.1 $^{\circ}$ 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 to 8 $^{\circ}$ 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 or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

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

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

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18 to +25 $^{\circ}$ 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

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1 – 5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS. NOTE: the calibrator/control and unknown sample wells are filled differently.
2	Dilute samples using buffer DIL SPE (EIA buffer) See table M for dilution modes and factors for different types of analyzed material. 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 DIL SPE (EIA buffer). Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
4	Pipet 120 µl of red EIA buffer into the wells allocated for blood serum or plasma. For other tested materials, see table M for the volume of red EIA buffer.
5	Pipet 100 µl of calibrators CAL 1 – 5 and control samples CONTROL into allocated wells. For testing of blood serum or plasma pipet 5 µl of the unknown sample into the allocated wells. See table M for the volumes of other materials. 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).
6	Incubate 30 minutes at 37 °C .
7	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.
8	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells.
9	Incubate 30 minutes at 37 °C.
10	Wash the strips 5 times.
11	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
12	Incubate 10-20 minutes at 18-25 °C
13	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
14	Measure OD (optical density) at 450 nm.
15	Set photometer blank on first calibrator
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 or plasma	Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided and should be treated by centrifugation before testing.	5 μl of sample + 1000 μl of diluent	120	5	1
saliva	Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided and should be treated by centrifugation before testing.		90	10	0.002
urine	Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided and should be treated by centrifugation before testing.		50	50	0.0004
cerebrospinal fluid	Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided and should be treated by centrifugation before testing.		80	20	0.001

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

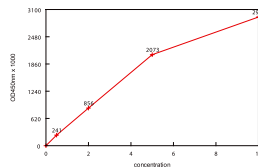
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

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

9.3. Determine the corresponding concentration of total IgM 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	1 g/l	0.32
CAL 3	5 g/l	0.93
CAL 4	10 g/l	2.15
CAL 5	25 g/l	3.01



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 total IgM. 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	0.7	3.7
newborn	0.1	0.35
1-3 month	0.12	0.9
4-6 month	0.25	1.2
7-12 month	0.35	1.0
1-6 yrs	0.55	2.2
7-11 yrs	0.65	1.7

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
IgA	<0.1
IgG	<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 total IgM concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

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

12. LITERATURE

1. Erik J. Wiersma, Cathy Collins, Shafie Fazal, and Marc J. Shulman Structural and Functional Analysis of J Chain-Deficient IgM J. Immunol., Jun 1998; 160: 5979 – 5989.