

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	2
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	8
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 АЛЬВЕОМУЦИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ «АЛЬВЕОМУЦИН-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Альвеомуцин (АМ), или муциновый антиген ZEG5, продуцируется в бронхах альвеолоцитами 2-го типа и в норме секретируется в бронхоальвеолярный секрет. Повышение его концентрации в сыворотке крови отмечено у больных с интерстициальными заболеваниями легких (ИЗЛ), причем степень повышения коррелирует со степенью выраженности клинической картины. Определение уровня АМ может быть полезным для диагностики ИЗЛ и оценки активности и степени тяжести воспалительного процесса.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Использование мышиных моноклональных антител к альвеомуцину позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Воспроизводимость.

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

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации альвеомуцина в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их биологическими жидкостями, не содержащей альвеомуцин, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 25–200 Ед/мл и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации альвеомуцина предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 50 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «АЛЬВЕОМУЦИН-ИФА» концентрация альвеомуцина в биологических жидкостях не превышает 20 Ед/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P240Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C240Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе фосфатного буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества альбумина – 0; 25; 50; 100; 200 Ед/мл , готовы к использованию (по 0.8 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q240Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием альбумина, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T240Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5 SP240	DIL	Буфер для разведения образцов , готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
6 R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7 S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21x-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10 K240I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «АЛЬВЕОМУЦИН-ИФА»	1	шт.	-
11 K240Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «АЛЬВЕОМУЦИН-ИФА»	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;
- орбитальный шейкер (встряхиватель) для микропланшет, скорость 600–800 об./мин.
- 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.

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 «АЛЬВЕОМУЦИН-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.

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;
- Буфер для разведения образцов, 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 альвеомуцина 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 сывортки.
2	Если предполагается концентрация альвеоцифера в исследуемом образце превышает 200 Ед/мл, его следует дополнительно развести, используя Буфер для разведения образцов (SP240). Использование других буферов и реагентов для разведения образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сывортки (плазмы) крови.
3	Внесите во все лунки планшета по 50 мкл Буфера для разведения образцов.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сывортки. При исследовании сывортки (плазмы) крови в лунки, предназначенные для исследуемых образцов, внесите по 50 мкл образцов. При исследовании других видов материала объемом вносимого исследуемого образца указан в таблице М. Внесение калибровочных проб, контрольной сывортки 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 +18...+25 °С и постоянном встряхивании со скоростью 600–800 об/мин
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 +18...+25 °С и постоянном встряхивании со скоростью 600–800 об/мин.
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.
11	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 содержимое лунок окрашивается в ярко-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-реактента. Бланк фотометра выставьте по калибровочной пробе С1.
13	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация альвеоमुцина в калибровочных пробах (Ед/мл), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
14	Определите по калибровочному графику содержание альвеоमुцина в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (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	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.	50	50	1
бронхоальвеолярная жидкость	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных образцов может привести к искажению результатов.	50	50	1

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследовании, 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 альвеоमुцина в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (20 Ед/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (200 Ед/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация альвеомуцина ниже 20 Ед/мл или выше 200 Ед/мл.

Исследуемая группа	Единицы, Ед/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	-	70
Беременные:		
1-й триместр	-	90
2-й триместр	-	140
3-й триместр	-	130
В период лактации	-	130

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Raghu G. Interstitial lung disease : a diagnostic approach. Am. J. Respir. Crit. Care. 1995; 51 : 909- 914.
2. Corryn B. Pathology of interstitial lung disease. Semin. Respir. Crit. Care Med. 1994; 15(1) : 61- 76.
3. Crystal R.G., Gadek J.E., Ferrans V.J., Fulmer J.D., Line B.R., Hunninghake G.W. Interstitial lung disease : current concepts of pathogenesis , staging and therapy. Am. J. Med. 1981 ; 70 : 542-567.
4. Quanjer Ph.H., Tammeling G.J., Cotes J.E., Pedersen O.F., Peslin R., Yernault J.C. Lung volumes and forced ventilatory flows. Eur. Respir. J. 1993; 6 (Suppl.16): 5 -40.
5. Cotes J.E., Chinn D.J., Quanjer Ph.H., Roca J., Yernault J.C. Standardization of the measurement of transfer factor (diffusing capacity). Eur. Respir. J. 1993 ; 6 (Suppl. 16) : 41- 52.
6. Chuchalin A.G., Avdeeva O., Lebedin Y., Avdeev S., Chukanov S. An elevated level of glycolyl-sialylated mucin antigen 3EG5 in patients with interstitial lung diseases. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998; 157(Suppl.): A39.

По вопросам, касающимся качества Набора **«АЛЬВЕОМУЦИН-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 ALVEOMUCIN IN HUMAN BIOLOGICAL FLUIDS

1. INTENDED USE

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

This kit is designed for measurement of alveomucin 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

Alveomucin (AM) or mucin antigen 3EG5 is produced by alveolocytes of type 2. Elevated serum levels of AM were found in patients with interstitial lung diseases (ILD), the degree of elevation correlating to the severity of clinical symptoms.

AM determination may be of use for ILD diagnostics and monitoring.

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 alveomucin-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 alveomucin, 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	Alveomucin EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2 CAL 1-5	Calibrator set, 0.8 ml each. The set contains 5 calibrators: 0; 25; 50; 100; 200 U/ml	5	pcs	red (CI - colourless)	2 months
3 CONTROL	Control serum (0.8 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4 CONJ HRP	Conjugate, 11 ml	1	pcs	red	until exp.date
5 DIL	EIA Sample buffer 11 ml	1	pcs	blue	until exp.date
6 SUBS TMB	Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
7 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
8 STOP	Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
9 N003	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
10 K240I	Instruction Alveomucin EIA	1	pcs		N/A
11 K240Q	QC data sheet Alveomucin 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;
- Microtiter plate shaker. Shaking should be medium to vigorous. Longitudinal shaking approximately 200 strokes/min, oscillations 600–800/min
- 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 °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 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

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

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °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 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.
2	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using EIA buffer. Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
3	Pipet 50 µl of EIA Sample buffer into each well.
4	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1–5 and control samples CONTROL into allocated wells. For testing of serum or plasma pipet 50 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).
5	Incubate 30 minutes at +18...+25 °C and continuous shaking at 600-800 rpm
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. Cover the wells by plate adhesive tape.
8	Incubate 30 minutes at +18... +25 °C and continuous shaking at 600–800 rpm
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. 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	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.	50	50	1
bronchoalveolar fluid	Turbid samples should give incorrect measurement results and should be treated by centrifugation before testing.	50	50	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

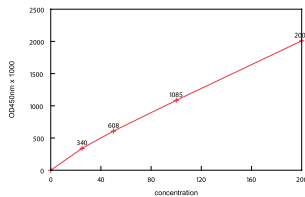
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

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

9.3. Determine the corresponding concentration of alveomucin 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 U/ml	0.15
CAL 2	25 U/ml	0.49
CAL 3	50 U/ml	0.76
CAL 4	100 U/ml	1.24
CAL 5	200 U/ml	2.16



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 Alveomucin. 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, U/ml	
	Lower limit	Upper limit
Healthy donors	-	70.0
Pregnancy:		
1st trimester	-	90
2nd trimester	-	140
3rd trimester	-	130
Lactation	-	130

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical sensitivity Sensitivity of the assay was assessed as being 20 U/ml.

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

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

12. LITERATURE

- Raghu G. Interstitial lung disease : a diagnostic approach. Am. J. Respir. Crit. Care. 1995; 51 : 909- 914.
- Corryn B. Pathology of interstitial lung disease. Semin. Respir. Crit. Care Med. 1994; 15(1) : 61- 76.
- Crystal R.G., Gadek J.E., Ferrans V.J., Fulmer J.D., Line B.R., Hunninghake G.W. Interstitial lung disease : current concepts of pathogenesis, staging and therapy. Am. J. Med. 1981 ; 70 : 542- 567.
- Quanjer Ph.H., Tammeling G.J., Cotes J.E., Pedersen O.F., Peslin R., Yernault J.C. Lung volumes and forced ventilatory flows. Eur. Respir. J. 1993; 6 (Suppl.16): 5 -40.
- Cotes J.E., Chinn D.J., Quanjer Ph.H., Roca J., Yernault J.C. Standardization of the measurement of transfer factor (diffusing capacity). Eur. Respir. J. 1993 ; 6 (Suppl. 16) : 41- 52.
- Chuchalin A.G., Avdeeva O., Lebedin Y., Avdeev S., Chukanov S. An elevated level of glycolyl-sialylated mucin antigen 3EG5 in patients with interstitial lung diseases. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998; 157(Suppl.): A39.