

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	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 IgG4 В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «IgG4-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «IgG4-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации IgG4 в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Содержание IgG4 в сыворотке крови составляет около 3% от общего уровня IgG.

1.3. Антитела подкласса IgG4 вырабатываются при длительном контакте с антигеном, что характерно для хронических грибковых инфекций, паразитарных инвазий, аутоиммунных заболеваний.

1.4. Особую роль IgG4 подкласс играет при аллергии. Повышенный уровень IgG4 антител выявлен в сыворотках пчеловодов, подвергавшихся укусам пчел. Предполагается, что выработка IgG4-антител при лечении модифицированными аллергенами (аллергоидами) может считаться благоприятным прогностическим признаком. Вместе с тем, уровень IgG4 в сыворотке часто встречается у больных различными аллергическими заболеваниями (бронхиальная астма, atopический дерматит), в том числе и у пациентов с нормальным уровнем общего IgE.

1.5. Дефицит IgG4 подкласса часто сопряжен с IgG2-дефицитом и сопровождается ослаблением иммунного ответа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgG4 основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к IgG4 человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание IgG4, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к IgG4 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 IgG4 в исследуемом образце. Концентрацию IgG4 в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания IgG4 в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция мышиных моноклональных антител к IgG4 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 IgG4 в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «IgG4-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации IgG4 в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей IgG4, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.075–2.5 г/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации IgG4 предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 0.25 г/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «IgG4-ИФА» концентрация IgG4 в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.02 г/л.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P274Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C274Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7,2-7,4), содержащие известные количества IgG4 – 0 ; 0.075 ; 0.25 ; 0.75 ; 2.5 г/л , готовы к использованию (по 1 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q274Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgG4, готова к использованию (1 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T274Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5 S011Z4	DIL SPE	ИФА-Буфер , готов к использованию (100 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 , 21х-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 K274I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «IgG4-ИФА»	1	шт.	-
11 K274Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «IgG4-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;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 5–250 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 ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 «IgG4-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 IgG4 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.
2	Разбавьте образцы сыворотки (плазмы) крови в 5000 раз, используя ИФА-Буфер (S011Z4). Пример: в пробирку Разведение 1 (1:100): 5 мкл образца + 1000 мкл ИФА-Буфера. В другую пробирку Разведение 2 (1:5000) добавьте 10 мкл Разведения 1 + 490 мкл ИФА-Буфера. Разведение 2 (1:5000) следует использовать в анализе. Не разбавляйте калибровочные пробы и контрольную сыворотку.
3	Если предполагаемая концентрация IgG4 в исследуемом образце превышает 2,5 г/л, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер (S011Z). Используйте другие буферов и реагентов для разбавления образцов может искажать результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) 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 (плазмы) 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, заклейте 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-реактента , при этом содержащее лунок окрашивается в яркий-желтый цвет.
12	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-реактента. Бланк фотометра выставьте по калибровочной пробе С1.

Таблица М

Вид материала	Сбор, хранение и обработка материала	Пример разведения	ИФА-Буфер, 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.	Разведение 1 (1:100): 10 мкл образца + 990 мкл ИФА-Буфера. В другую пробирку Разведение 2 (1:5000) добавьте 10 мкл Разведение 1 + 490 мкл ИФА-Буфера. Разведение 2 (1:5000) следует использовать в анализе	0	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 IgG4 в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.02 г/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (2.5 г/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация IgG4 ниже 0.02 г/л или выше 2.5 г/л.

Исследуемая группа	Единицы, г/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	0.1	1.2

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 «**IgG4-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 IGG4 IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of IgG4 in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of IgG4 in blood serum or plasma. 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

IgG4 subclass represents ca. 3% of total serum IgG.

IgG4-antibodies are developed after long term antigen stimulation, eg in chronic fungal infections, parasitic invasions and autoimmunity.

IgG4 plays a special role in atopic allergy. Elevated serum total and venom specific IgG4 is observed in honey bee keepers. The development of IgG4 response is suggested to correlate with successful treatment of allergy patients by modified allergens (immunotherapy). Serum IgG4 is also elevated in atopic diseases (atopic asthma, atopic dermatitis) even in the patients showing normal serum IgE.

IgG4 deficiency is frequently associated with IgG2 deficiency and lead to decreased immune response to bacterial antigens.

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 IgG4-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 IgG4, 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% H_2SO_4 . 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 IgG4 EIA strips, 8X12 wells	1	pcs		until exp.date
2	CAL 1-5 Calibrator set, 1 ml each. The set contains 5 calibrators: 0; 0.075; 0.25; 0.75; 2.5 g/l	5	pcs	blue (C1 – colourless)	2 months
3	CONTROL Control serum (1 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4	CONJ HRP Conjugate, 11 ml	1	pcs	red	until exp.date
5	DIL SPE EIA buffer 100 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	K274I Instruction IgG4 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 5–250 μ l;
- 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.

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. NOTE: the calibrator/control and unknown sample wells are filled differently.
2	Dilute samples using buffer DIL SPE (EIA buffer) 5000 fold. 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 100 µl of calibrators CAL 1–5 and control samples CONTROL into allocated wells. For testing of blood serum or plasma pipet 100 µl of the unknown sample into the allocated wells. Pipetting should be made within 3 minutes, to ensure a 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	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. Pipetting should be made within 3 minutes, to ensure a 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. Cover the wells by plate adhesive tape.
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.

7.5. Sample processing

Material type	Notes on material collection, storage and handling	Sample dilution example	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.	10 μl of sample + 990 μl of diluent = DILUTION 1. 10 μl of DILUTION1 + 490 μl of diluent = DILUTION 2 (1:5000)	0	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

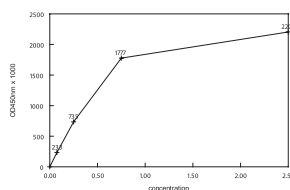
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus total IgG4 concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of total IgG4 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	0.17
CAL 2	0.075 g/l	0.42
CAL 3	0.25 g/l	0.90
CAL 4	0.75 g/l	1.91
CAL 5	2.5 g/l	2.50



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 IgG4. 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	0.1	1.2

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 0.02 g/l.

11.3. Linearity.

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different IgG4 concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery.

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known IgG4 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