



Arbeitsanleitung/Manual

β_2 -Mikroglobulin ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung des β_2 -Mikroglobulin aus Plasma,
Serum und Urin*

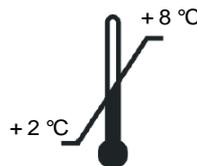
β_2 -Microglobulin ELISA Kit

*For the in vitro determination of β_2 -Microglobulin in serum,
plasma and urine*

Gültig ab / Valid from 12.11.2010



K 6210



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of content	2
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
8. PROBENVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
HINWEISE	6
PIPETTIERSCHEMA	7
10. ERGEBNISSE	8
11. EINSCHRÄNKUNGEN	8
12. QUALITÄTSKONTROLLE	9
ERWARTETE ERGEBNISSE	9
13. TESTCHARAKTERISTIKA	9
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	9
WIEDERFINDUNG	10
SENSITIVITÄT	10
LINEARITÄT	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10

	Page
Table of content	
1. INTENDED USE	14
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	14
4. MATERIAL SUPPLIED	15
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
7. PRECAUTIONS	16
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
9. ASSAY PROCEDURE	17
PROCEDURAL NOTES	17
TEST PROCEDURE	18
10. RESULTS	19
11. LIMITATIONS	19
12. QUALITY CONTROL	20
REFERENCE RANGE	20
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	20
RECOVERY	21
DETECTION LIMIT	21
LINEARITY	21
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	21

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **β -2-Mikroglobulin** aus Serum, Plasma und Urin. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

β -2-Mikroglobulin wird auf der Zellmembran aller kernhaltigen Zellen gefunden. **β -2-Mikroglobulin** hat ein Molekulargewicht von 11,8 kD und ist ein Leichtkettenprotein der HLA-Klasse-I-Antigene.

Die Ausscheidung von **β -2-Mikroglobulin** erfolgt im wesentlichen über die Niere. Die Serumkonzentration ist eine Resultante aus Bildungs- und Ausscheidungsrate und beim Gesunden relativ stabil. Änderungen der Serumkonzentrationen deuten auf eine Störung der glomerulären und tubulären Funktion hin.

Indikationen

- Frühzeitiges Erkennen einer Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation
- Beurteilung der glomerulären Filtrationsrate

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des **β -2-Mikroglobulin (β -2-M)** im Plasma, Serum und Urin. In diesem ELISA wird **β -2-M** aus den Proben an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen **β -2-M** erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines Peroxidase markierten Antikörpers (POD-AK). Dieser bindet spezifisch das gebundene **β -2-M**. Die Enzymmenge ist direkt proportional dem **β -2-M**-Gehalt. Als Substrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6210MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 6210WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 6210PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 6210K	CONJ	Konjugat (Kaninchen anti β -2-M, Peroxidase-markiert), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 6210ST	STD	Standards, lyophilisiert (0; 0.6; 1.2; 2.5; 5; 10 mg/l)	6 x 1 vial
K 6210KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	1 x 1 vial
K 6210KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	1 x 1 vial
K 6210NaCl	NACL	0.9 %-ige NaCl-Lösung, gebrauchsfertig	25 ml
K 6210TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 6210AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 μ l
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm

*Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln $> 0,2 \mu$ m) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,055 \mu$ S/cm bei 25°C ($\leq 18,2 \text{M}\Omega \text{ cm}$).

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das WASHBUF (Pufferkonzentrat) kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) werden mit je **250 µl** Reinstwasser rekonstituiert, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Die Standards sind nach dem Rekonstituieren 4 Wochen bei 2-8 °C stabil. Für Langzeitlagerung (> 4 Wochen) müssen sie bei -20 °C gelagert
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H₂SO₄ verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Proben müssen vor der Analyse **1:50** mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) verdünnt werden, z. B. 10 µl Probe + 490 µl SAMPLEBUF.

Proben mit einem β-2-M Gehalt > 10 mg/l müssen noch **1:10** mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) weiter verdünnt werden.

Plasma- bzw. Serumproben sind 14 Tage bei 2-8 °C stabil; ansonsten müssen sie bei -20 °C gelagert werden.

Urine müssen mit 1N NaOH auf einen pH zwischen 6 und 8 eingestellt werden. Die Proben sind ebenfalls 14 Tage bei 2-8 °C stabil, ansonsten müssen sie bei -20 °C gelagert werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Pipettierschema

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **200 µl NACL** (0,9% NaCl-Lösung) in alle Vertiefungen vorlegen.
2. **10 µl vorverdünnte STD** (Standards), **CTRL** (Kontrollen) und **Patientenproben** in die Vertiefungen der MTP pipettieren.
3. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
4. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
5. **200 µl CONJ** (Konjugat; POD-Antikörper) pro Vertiefung pipettieren.
6. **15 Minuten** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
7. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8. **200 µl SUB** (TMB-Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
9. **5-15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis ausreichend große Farbdifferenzen eingetreten sind.
10. **50 µl STOP** (Stopplösung) zusetzen und kurz mischen.
11. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von **450 nm** messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (**STD**) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von **405 nm** wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

10. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Auswertung

Bei einer 1:50 Verdünnung der Proben werden die Ergebnisse **nicht** mit einem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Bei einer weiteren Verdünnung als 1:50 (bei Konzentrationen höher als 10 mg/ml) muss die ermittelte Probenkonzentration mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Konzentration größer dem größten Standard sollten weiter verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen oder Serum/Urin Pools bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen ein oder mehrere Werte von Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Probenergebnisse nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Referenzbereiche:

Plasma bzw. Serum: < 2,5 mg/l

Urin < 0,4 mg/l

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Meßserie wurde geprüft. Eine Urinprobe und eine Plasmaprobe wurden 12 mal in β -2-M ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n = 12

Probe	β -2-M Mittelwert [mg/l]	Intra-Assay VK [%]
Urin	5.7	9
Plasma	1.1	11

Inter-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft. Eine Urinprobe und eine Plasmaprobe wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im β -2-M ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n = 12

Probe	β -2-M Mittelwert [mg/l]	Inter-Assay VK [%]
Urin	5.9	15
Plasma	1.0	12

Wiederfindung

In Aufstockversuchen einer Plasmaprobe und einer Urinprobe mit je 5 mg human- β -2-Mikroglobulin pro Liter wurden Wiederfindungsraten von 98 % für die Plasmaprobe und 93 % für die Urinprobe gefunden.

Sensitivität

Die Nachweisgrenze, definiert als $B_0 + 2 SD$, liegt bei 0,1 mg/l.

Linearität

Die Linearität wurde durch Verdünnen einer β -2-M-haltigen Probe in Verdünnungspuffer ermittelt. Der lineare Bereich erstreckt sich von 0,2 - 10 mg/l.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Bestandteile verschiedener Packungen dürfen nicht unter einander ausgetauscht werden.
- Reagenzien nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
- Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

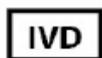
Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

β_2 -Microglobulin ELISA Kit

*For the in vitro determination of β_2 -Microglobulin in serum,
plasma and urine*

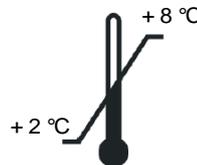
Gültig ab / Valid from 12.11.2010



K 6210



96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of **beta-2- microglobulin** in serum, plasma and urine. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

β -2-Microglobulin is a light chain protein (11.8 kD) of the HLA-class-I antigens and is found on the cell membrane of all nucleated cells. This protein is metabolised extensively in the kidney. The serum concentration is influenced by the rates of synthesis and metabolism and is usually stable in healthy persons. Changes in the serum concentrations are indicative of disorders in glomerular and tubular functions.

Indications

- Early detection of a renal transplant rejection
- Assessment of the glomerular filtration rate (GFR)

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) allows the quantitative determination of β -2-microglobulin from plasma, serum and urine.

β -2-microglobulin of the samples is bound to an excess of polyclonal rabbit anti β -2-microglobulin antibodies immobilised on the microtitre plate surface. After a washing step, to remove all unbound substances, the quantification of the bound β -2-microglobulin is carried out by adding an enzyme (horseradish peroxidase, POD) labeled antibody (POD-antibody), which also binds to the β -2-microglobulin. The amount of bound enzyme is directly proportional to the β -2-microglobulin content. The substrate tetramethylbenzidine (TMB) is converted by the enzyme to a chromogenic compound, which is determined photometrically at 450 nm (if the extinction is out of range, measure at 410 nm).

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 6210MTP	PLATE	One holder with precoated strips	96
K 6210WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K 6210PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 6210K	CONJ	Conjugate (rabbit anti β -2-M, peroxidase-labelled), ready-to-use	2 x 15 ml
K 6210ST	STD	Calibrators, lyophilized (0; 0.6; 1.2; 2.5; 5; 10 mg/l)	6 x 1 vial
K 6210KO1	CTRL	Control, lyophilized	1 x 1 vial
K 6210KO2	CTRL	Control, lyophilized	1 x 1 vial
K 6210NaCl	NACL	0.9 % NaCl - solution, ready-to-use	25 ml
K 6210TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml
K 6710AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 μ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm

*Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 μ m) with an electrical conductivity of 0.055 μ S/cm at 25°C (\leq 18.2 M Ω cm).

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution. The WASHBUF (wash buffer concentrate) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **250 µl** ultra pure water. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Diluted standards are not stable. Reconstituted standards are stable for 4 weeks at 2 – 8 ° C and for long term storage at – 20 ° C until the expiry date stated on the label.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C.**

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.

- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

All samples must be diluted **1:50** with SAMPLEBUF (sample dilution buffer) before use, for example 10 µl sample + 490 µl SAMPLEBUF.

Samples with a-2-microglobulin content higher than 10 mg/l should be further diluted 1:10 with SAMPLEBUF (sample dilution buffer).

Plasma or serum

Samples can be stored for two weeks at 2-8 °C. For longer storage, samples should be frozen at -20 °C.

Urine

Urine should be adjusted to a pH of 6 to 8 with 1 N NaOH. Adjusted samples can be stored at 2-8 °C for 14 days. For longer storage, non-treated samples should be frozen at -20 °C.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Quality control guidelines should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well.

Wash the pre-coated microtiter plate 5 x with 250 µl ELISA wash buffer.

Carry out the tests in duplicate.

1. Pipette **200 µl** of **NACL** (0.9% NaCl solution) into each well of the microtiter plate.
2. Add **10 µl** of the diluted **STD** (standards), **CTRL** (controls) and **patient samples**.
3. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
4. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250 µl** of diluted washing buffer solution.
5. Add **200 µl** of **CONJ** (conjugate, POD-antibody) into each well.
6. Incubate for **15 minutes**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
7. Decant the content of the plate and wash the cavities **5 x with 250 µl** of washing buffer solution.
8. Add **200 µl** of **SUB** (TMB-solution) into each well.
9. Incubate for **5-15 minutes** at room temperature, shaking slightly, until color differences are sufficient.
10. Add **50 µl** of **STOP** (stop solution) and mix shortly.
11. Determine **absorption** immediately with an ELISA reader at **450 nm**. If the highest extinction of the standards (**STD**) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

10. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend for the optical density a linear ordinate and for the concentration a logarithmic abscissa. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Evaluation

The results are **not** multiplied by any factor at 1:50 sample dilution.

If samples are diluted more than 1:50 (at concentrations higher than 10 mg/ml), the corresponding dilution factor must be considered.

11. LIMITATIONS

Samples with levels greater than the highest standard should be further diluted and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

Plasma or serum: < 2.5 mg/l

Urine: < 0.4 mg/l

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Through repeated measurements (n=12) of plasma and urine samples, containing β -2-microglobulin, the following results were obtained:

Intra-assay n = 12:

Sample	β -2-M mean [mg/l]	Intra-Assay CV [%]
Urine	5.7	9
Plasma	1.1	11

Inter-assay n = 12:

Sample	β -2-M mean [mg/l]	Inter-Assay CV [%]
Urine	5.9	15
Plasma	1.0	12

Recovery

Recovery studies were made with urine and plasma samples. The mean value of the plasma and urine samples was 98% and 93%, respectively.

Detection limit

The detection limit was defined as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and set to 0,1 mg/l.

Linearity

The linearity of this assay was estimated by dilution with sample buffer of β -2-microglobulin-containing material. The linearity extends from 0,2 to 10 mg/L.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Quality control guidelines should be followed.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.

- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number