

α_2 -Makroglobulin ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung des α_2 -Makroglobulin in Urin, Serum
und Plasma

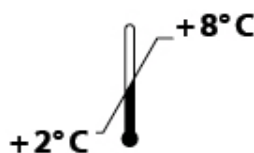
α_2 -Macroglobulin ELISA Kit

For the in vitro determination of α_2 -Macroglobulin in urine,
serum and plasma

Gültig ab/valid from 31.03.2010



K 6610A



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 contents	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
PIPETTIERSHEMA	7
10. ERGEBNISSE	8
11. EINSCHRÄNKUNGEN	8
12. QUALITÄTSKONTROLLE	9
ERWARTETE ERGEBNISSE	9
13. TESTCHARAKTERISTIKA	9
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	9
WIEDERFINDUNG	10
SENSITIVITÄT	11
LINEARITÄT	12
14. LITERATUR	13
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13

TABLE OF CONTENTS	PAGE
1. INTENDED USE	16
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	16
3. PRINCIPLE OF THE TEST	16
4. MATERIAL SUPPLIED	17
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
7. PRECAUTIONS	18
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	19
9. ASSAY PROCEDURE	19
PROCEDURAL NOTES	19
TEST PROCEDURE	20
10. RESULTS	21
11. LIMITATIONS	21
12. QUALITY CONTROL	22
EXPECTED VALUES	22
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	22
RECOVERY	23
SENSITIVITY	24
SAMPLE DILUTION	25
14. REFERENCES	26
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

α -2-Makroglobulin ist eines der größten Plasmaproteine mit einem Molekulargewicht von 650 kDa bis 900 kDa, je nach Glykosilierungsgrad und besteht aus 4 Untereinheiten. Es handelt sich um einen universellen Proteinaseinhibitor aller bekannten Klassen von Endopeptidasen (Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen). Makroproteine wie α -2-Makroglobulin erscheinen bei schweren Schädigungen der glomerulären Basalmembran im Harn, während eine Albuminurie in Verbindung mit Transferrin einen milderen glomerulären Schaden signalisiert.

Klinische Wertigkeit:

Bei 133 Männern und 92 Frauen wurde durch Koronarangiographie der Schweregrad des Koronarleidens untersucht. Bei mehreren Serum-Glykoproteine wie α -1-Antitrypsin und α -2-Makroglobulin konnte eine signifikante Beziehung zwischen dem Serumspiegel dieser Proteine gefunden werden. Andere Risikofaktoren wie Rauchen, Hypertonie oder erhöhtes Cholesterin sind als Erklärung für diesen Zusammenhang ausgeschlossen worden.

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des Alpha-2-Makroglobulins (α -2-M) in Plasma, Serum und Urin.

In diesem ELISA wird α -2-Makroglobulin aus den Proben in einem einstündigen an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen α -2-Makroglobulin erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines Peroxidase-markierten Antikörpers (PO-AK). Dieser markiert spezifisch das gebundene α -2-Makroglobulin. Die Enzymmenge ist direkt proportional dem α -2-Makroglobulin-Gehalt. Als Substrat wird TMB eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K6610AMTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K6610AWP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K6610AK	CONJ	Konjugat, (Kaninchen anti α_2 -Makroglobulin, Peroxidase-markiert)	1 x 200 μ l
K6610APV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K6610AST	STD	Standard, lyophilisiert	2 x 6 vials
K6610AKO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K6610AKO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K6610ATMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6610AAC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- 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 (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Beim Mehrfachansatz der Platte ist bitte darauf zu achten, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert werden und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden** (z.B. das verdünnte Konjugat (CONJ) ist nicht haltbar). Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen (innerhalb des angegebenen Verfallsdatums) verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 μ l** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in aqua dest. verdünnt werden (50 ml Konzentrat + 450 ml aqua dest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C 1 Monat** (in einem geschlossenen Gefäß) haltbar.
- Das **Konjugat** (CONJ; Peroxidase-markierte Antikörper) ist vor Gebrauch **1:101** in Waschpuffer zu verdünnen (100 μ l CONJ + 10 ml Waschpuffer). Der unverdünnte Antikörper ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Antikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden**.
- Die lyophilisierten **Standards** (STD) und die **Kontrollen** (CTRL) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Standards und Kontrollen werden mit **500 μ l** aqua bidest. rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards und Kontrollen können **4 Wochen bei -20°C** gelagert und **nach dem Auftauen einmal** wieder verwendet werden.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H₂SO₄. H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H₂SO₄ verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Plasma und Serum

Plasma bzw. Serum ist 14 Tage bei 2-8 °C stabil; danach ist es bei –20°C zu lagern.

Plasma und Serum sind vor der Analyse **1:50 000** mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) zu verdünnen. Wir empfehlen eine Verdünnung in drei Schritten.

Zum Beispiel:

50 µl Serum/Plasma + **950 µl** SAMPLEBUF, gut mischen (**1:20**)

20 µl der 1:20 Verdünnung + **980 µl** SAMPLEBUF, gut mischen (**1:1000**)

20 µl der 1:1000 Verdünnung + **980 µl** SAMPLEBUF, gut mischen (**1:50 000**)

100 µl der letzten **Verdünnung** werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

Urin

Urine werden vor der Analyse **1:5** in mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) verdünnt.

Zum Beispiel:

100 µl Urin + **400 µl** SAMPLEBUF, gut mischen (**1:5**)

100 µl der 1:5 **Verdünnung** werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

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

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch **5x mit je 250 μ l** Waschpuffer (WASHBUF) waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1.	100 μl STD (Standards), CTRL (Kontrollen) und SAMPLE (Patientenproben) in die entsprechende Vertiefung zugeben.
2.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln oder, falls keine Schüttelvorrichtung vorhanden ist, 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) ohne Schütteln inkubieren.
3.	Den Inhalt der PLATE (Platte) verwerfen und 5 x mit je 250 μl WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4.	100 μl vorverdünntes CONJ (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
5.	1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubieren.
6.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 μl WASHBUF waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7.	100 μl SUB (Substrat) in jede Vertiefung pipettieren.
8.	10-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren bis ausreichend große Farbdifferenzen eingetreten sind.
9.	50 μl STOP (Stopplösung) zusetzen und kurz mischen.
10.	Die Extinktion wird sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) gemessen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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.

Serum-und Plasmaproben

Die ermittelte α -2-Makroglobulin Konzentration wird mit **50 000** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Urinproben

Die ermittelte α -2-Makroglobulin Konzentration wird mit **5** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer α -2-Makroglobulin Konzentration größer dem größten Standard sollten mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Für die Qualitätskontrolle empfehlen wir die Verwendung unabhängiger externer Kontrollen.

Erwartete Ergebnisse

Normbereiche:

Plasma bzw. Serum: 1,3-3,0 g/l

Urin: < 0,18 mg/l; entspricht 180 ng/ml

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Urin- bzw. zwei Serumproben wurde innerhalb einer Messreihe geprüft. Die Proben wurden 20-mal von einer Person gemessen.

Intra-Assay VK n= 20

Urin

Probe	α_2 -Makroglobulin Mittelwert [ng/mL]	Intra-Assay Vk [%]
1	163,98	2,53
2	84,17	3,27

Serum

Probe	α_2 -Makroglobulin Mittelwert [mg/mL]	Intra-Assay Vk [%]
1	3,92	2,61
2	2,18	6,37

Inter-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Urin- bzw. zwei Serumproben wurde an unterschiedlichen Tagen geprüft. Die Proben wurden 10-mal von verschiedenen Personen gemessen.

Intra-Assay VK n= 10

Urin

Probe	α_2 -Makroglobulin Mittelwert [ng/mL]	Intra-Assay Vk [%]
1	153,46	3,67
2	83,65	3,43

Serum

Probe	α_2 -Makroglobulin Mittelwert [mg/mL]	Intra-Assay Vk [%]
1	4,01	3,31
2	2,00	3,99

Wiederfindung

Zwei α_2 -Makroglobulin-haltige Urin- bzw. zwei Serumproben wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen α_2 -Makroglobulin versetzt und gemessen.

Wiederfindung n=3

Urin

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	α_2 -Makroglobulin erwartet [ng/ml]	α_2 -Makroglobulin gemessen [ng/ml]
19,1	200	219,1	199,3
19,1	100	119,1	118,4
19,1	50	69,1	64,0
34,7	200	234,7	223,8
34,7	100	134,7	118,6
34,7	50	84,7	80,5

Serum

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	α_2 -Makroglobulin erwartet [ng/ml]	α_2 -Makroglobulin gemessen [ng/ml]
17,3	200	217,3	192,0
17,3	100	117,3	107,0
17,3	50	67,3	64,0
31,8	200	231,8	227,5
31,8	100	131,8	123,3
31,8	50	81,8	80,4

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null.

Probe	α_2 -Makroglobulin Mittelwert [OD]	Standardab- weichung	Nachweisgrenze [ng/mL]
1	0,005	0,0013	1,68

Linearität

n= 2

Zwei Urin- bzw. Serumproben wurden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle aufgelistet:

Urin

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/mL]	Gemessen [ng/mL]
1	1:5	1485,30	1485,30
	1:10	742,65	812,30
	1:20	371,33	417,90
	1:40	185,66	212,70
2	1:5	1121,50	1121,50
	1:10	560,75	622,80
	1:20	280,38	347,40
	1:40	140,19	191,30

Serum

Probe	Verdünnung	Erwartet [mg/mL]	Gemessen [mg/mL]
1	1:50 000	2,58	2,58
	1:100 000	1,29	1,33
	1:200 000	0,65	0,65
	1:400 000	0,32	0,31
2	1:50 000	1,74	1,74
	1:100 000	0,87	0,92
	1:200 000	0,44	0,48
	1:400 000	0,22	0,26

14. LITERATUR

1. Steinhoff et al.: 1994; Transplantation Proceedings 26 (3), 1768
2. Steinhoff, J.: 1995; Fortschritte d. Medizin 113, 507
3. Wood et al.: 1990; Ärztl. Lab. 36, 260
4. Hoyer et al.: 1995; Transplantation Proceedings 27 (5), 2571

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/ Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik 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 zurück zu senden.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

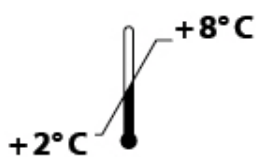
α_2 -Macroglobulin ELISA Kit

For the in vitro determination of α_2 -Macroglobulin in urine,
serum and plasma

Valid from 31.03.2010



K 6610A



1. INTENDED USE

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

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Alpha 2-Macroglobulin is one of the biggest plasma proteins with a molecular weight of 650-900kDa, dependent on the degree of glycosylation. It consists of 4 subunits. **Alpha 2-Macroglobulin** functions as protease inhibitor of all known classes of endopeptidase (serine-, cysteine-, aspartat- and metalloproteases).

The measurement of urinary proteins in the urine allows the diagnosis of proteinuria. In case of a microalbuminuria (selective proteinuria) increased levels (> 150 mg protein/24h) of albumin and transferrin (marker proteins of the tubulus) could be measured. In case of severe diseases of the kidney with pathological changes of the basal membran in the glomerulus (Chronic Glomerulonephritis, Tubulopathy, Nephrotic Syndrom) the protein level will rise up to > 3 g/24h and also the proteintyp will change to high molecular proteins like β -Lipoproteins and **α 2-Macroglobulin** (non-selective proteinuria).

Additionally previous investigations have shown that the determination of the two acute-phase proteins in the urins, C-reactive protein (CRP) and **α 2-Macroglobulin**, allows a noninvasive diagnosis of acute renal transplant dysfunction and rejection.

Indication

- Marker for glomerulonephropathy
- Monitoring of renal transplant dysfunction and rejection (together with CRP)

3. PRINCIPLE OF THE TEST

In a first incubation step, the **α 2-Macroglobulin** in the samples is bound to polyclonal rabbit antibodies (in excess), which are immobilized to the microtiter wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a Peroxidase-labeled anti **α 2-Macroglobulin** (POD-Antibody) antibody is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stop solution is then added to stop the reaction. The color converts from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of **α 2-Macroglobulin** in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the results obtained from the calibrators. **α 2-Macroglobulin**, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K6610AMTP	PLATE	One holder with pre-coated strips	12 x 8 wells
K6610AWP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate (10x)	1 x 100 ml
K6610AK	CONJ	Conjugate, (rabbit anti α -2-Macroglobulin peroxidase-labeled)	1 x 200 μ l
K6610APV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	2 x 100 ml
K6610AST	STD	Calibrators, lyophilized	2 x 6 vials
K6610AKO1	CTRL	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K6610AKO2	CTRL	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K6610ATMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K6610AAC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- 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 (reference wave length 620 or 690 nm)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, please make sure that the reagents are carefully stored as mentioned. Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with Aqua dest. **1:10** before use (add 450 ml A. dest. to 50 ml concentrate). Crystals could occur due to high salt concentration. The crystals have to be resuspended **before dilution of the buffer solutions** using a water bath (37°C). The buffer concentrates are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted solutions could be stored at 2-8°C for 1 month.
- The reagent tubes with the lower amounts should be centrifuged before use, to guarantee that the required amount is available for use.
- The **Conjugate** (CONJ; POD antibody) must be diluted **1:101** in ELISA wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml ELISA wash buffer). The undiluted antibody is stable at 2 -8 °C until expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and cannot be stored.**
- The lyophilized **calibrators** (STD) and **controls** (CTRL) are stable at 2-8°C until the expiry date. The calibrators (STD) and controls (CTRL) must be reconstituted with **500 µl** of aqua bidest. Allow the vial to stand for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Reconstituted calibrators and controls can be stored at **-20°C for 4 weeks and used once after thawing.**

7. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- The calibrators and controls contain human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2, and anti-HCV. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HVC or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- Stop Solution consists of diluted Sulfuric Acid. This is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma and serum

Plasma and sera are stable at 2-8°C for about 14 days. For long time storage we recommend -20°C:

Plasma and sera must be diluted **1:50 000** with SAMPLEBUF (sample dilution buffer). Dilution in three steps is recommended.

For example:

50 µl serum/plasma+ **950 µl** SAMPLEBUF, mix well (**1:20**)

20 µl of the 1:20 dilution + **980 µl** SAMPLEBUF, mix well (**1:1000**)

20 µl of the 1:1000 dilution + **980 µl** SAMPLEBUF, mix well (**1:50 000**)

For analysis, pipette **100 µl** of the **final dilution** per well.

Urine

Urine samples must be diluted before the assay **1:5** in SAMPLEBUF (sample dilution buffer).

For example:

100 µl urine+ **400 µl** SAMPLEBUF, mix well (**1:5**).

For analysis, pipette **100 µl** of the **diluted urine** per well.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- Carry out the assay with the actual manual delivered with the kit.

Test procedure

Wash the precoated microtiter plate **5 x with 250 μ l** ELISA wash buffer (WASHBUF). After the final washing step, remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper. Carry out the tests in duplicate.

1.	Add 100 μl of each STD (standard), CTRL (controls) and SAMPLE (patient samples) in the corresponding well.
2.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) shaking on a horizontal mixer or for 2 hours at room temperature (18-26°C) without any shaking .
3.	Decant the content of the plate and wash the wells 5 x with 250μl ELISA WASHBUF (wash buffer). After the final washing step, remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
4.	Add 100 μl of diluted CONJ (Conjugate).
5.	Incubate for 1 hour , shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
6.	Decant the content of the plate and wash the wells 5 x with 250μl ELISA WASHBUF. After the final washing step, remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
7.	Add 100 μl of SUB (TMB substrate) solution.
8.	Incubate for 10-20 minutes at room temperature.
9.	Add 50 μl of STOP (stop solution) and mix shortly.
10.	Determine absorption with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as reference.

10. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using 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 must be specified with a value less 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 a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less 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.

Plasma and serum samples

The estimated plasma and serum concentration must be multiplied by the dilution factor of **50 000**.

Urine samples

The estimated concentration must be multiplied by the dilution factor of **5**.

11. LIMITATIONS

Samples with α 2-Macroglobulin levels greater than the highest calibrator should be diluted in SAMPLEBUF (sample dilution buffer) 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.

Expected values

Plasma and serum: 1.3 – 3.0 g/l

Urine: < 0.18 mg/l; corresponds to 180 ng/ml

We recommend each laboratory to establish its own normal range.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay-Variation

The intra-assay variation was calculated from 20 determinations on each one of two urine or serum samples measured by one person.

Intra-Assay VK n= 20

Urine

Sample	α_2 -Macroglobulin mean value [ng/mL]	Intra-Assay CV [%]
1	163.98	2.53
2	84.17	3.27

Serum

Sample	α_2 -Macroglobulin mean value [mg/mL]	Intra-Assay CV [%]
1	3.92	2.61
2	2.18	6.37

Inter-Assay-Variation

The inter-assay variation was calculated from data on 2 urine or two serum samples obtained by different technicians in 10 different assays on different days.

Intra-Assay VK n= 10

Urine

Sample	α_2 -Macroglobulin mean value [ng/mL]	Intra-Assay CV [%]
1	153.46	3.67
2	83.65	3.43

Serum

Sample	α_2 -Macroglobulin mean value [mg/mL]	Intra-Assay CV [%]
1	4.01	3.31
2	2.00	3.99

Recovery

Two α_2 -Macroglobulin-containing urine or serum samples were spiked with 3 different α_2 -Macroglobulin-concentrations and measured.

Recovery n=3

Urine

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	α_2 -Macroglobulin expected [ng/ml]	α_2 -Macroglobulin measured [ng/ml]
19.1	200	219.1	199.3
19.1	100	119.1	118.4
19.1	50	69.1	64.02
34.7	200	234.7	223.8
34.7	100	134.7	118.6
34.7	50	84.7	80.46

Serum

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	α_2 -Macroglobulin expected [ng/ml]	α_2 -Macroglobulin measured [ng/ml]
17.3	200	217.3	192.0
17.3	100	117.3	107.0
17.3	50	67.3	64.0
31.8	200	231.8	227.5
31.8	100	131.8	123.3
31.8	50	81.8	80.4

Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$. The zero-standard was measured 20 times.

Sample	α_2 -Macroglobulin mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [ng/mL]
1	0.005	0.0013	1.68

Sample dilution

n= 2

Two patient urine or serum samples were diluted with sample dilution buffer and measured with the assay. The results are shown below:

Urine

Sample	Dilution	Expected [ng/mL]	Measured [ng/mL]
1	1:5	1485.30	1485.30
	1:10	742.65	812.30
	1:20	371.33	417.90
	1:40	185.66	212.70
2	1:5	1121.50	1121.50
	1:10	560.75	622.80
	1:20	280.38	347.40
	1:40	140.19	191.30

Serum

Sample	Dilution	Expected [mg/mL]	Measured [mg/mL]
1	1:50 000	2.58	2.58
	1:100 000	1.29	1.33
	1:200 000	0.65	0.65
	1:400 000	0.32	0.31
2	1:50 000	1.74	1.74
	1:100 000	0.87	0.92
	1:200 000	0.44	0.48
	1:400 000	0.22	0.26

14. REFERENCES

1. Steinhoff et al.: 1994; Transplantation Proceedings 26 (3), 1768
2. Steinhoff, J.: 1995; Fortschritte d. Medizin 113, 507
3. Wood et al.: 1990; Ärztl. Lab. 36, 260
4. Hoyer et al.: 1995; Transplantation Proceedings 27 (5), 2571

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components which are made of human serum are tested for Australia antigen and HIV and found to be negative. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent; these reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. The normal precautions for laboratory working should be observed.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for in vitro diagnostics only.
- The reagents should not be used after the date of expiry (see label on the test package).
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- 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 lodged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG together 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