

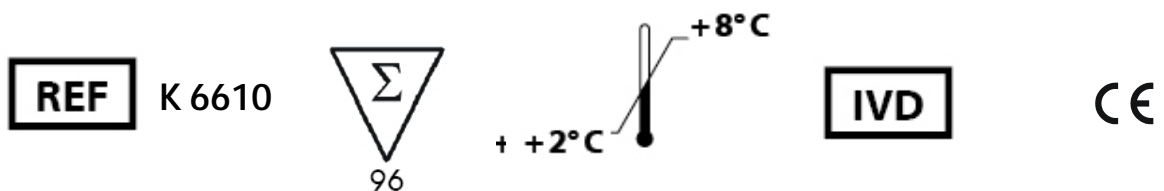
# $\alpha_2$ -Makroglobulin ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung des  $\alpha_2$ -Makroglobulin in Urin, Serum und Plasma*

# $\alpha_2$ -Macroglobulin ELISA Kit

*For the in vitro determination of  $\alpha_2$ -Macroglobulin in urine, serum and plasma*

Gültig ab/valid from 12.12.2007



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

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of contents	2
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>3</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>4</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>4</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMABNAHMEN</b>	<b>6</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>6</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
HINWEISE	6
PIPETTIERSHEMA	7
<b>10. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
MUSTEREICHKURVE	8
<b>11. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>9</b>
<b>12. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>9</b>
ERWARTETE ERGEBNISSE	9
<b>13. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	10
WIEDERFINDUNG	11
SENSITIVITÄT	11
LINEARITÄT	12
<b>14. REFERENCES</b>	<b>12</b>
<b>15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>13</b>

---

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

## 1. VERWENDUNGSZWECK

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

## 2. EINLEITUNG

$\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -1-Antitrypsin und  $\alpha$ -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 ( $\alpha$ -2-M) in Plasma, Serum und Urin.

In diesem ELISA wird  $\alpha$ -2-Makroglobulin aus den Proben in einem einstündigen an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen  $\alpha$ -2-Makroglobulin erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines Peroxidase-markierten Antikörpers (PO-AK). Dieser markiert spezifisch das gebundene  $\alpha$ -2-Makroglobulin. Die Enzymmenge ist direkt proportional dem  $\alpha$ -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
K 6610MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6610WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 6610K	CONJ	Konjugat, (Kaninchen anti $\alpha_2$ -Makroglobulin, Peroxidase-markiert)	1 x 20 $\mu$ l
K 6610VP	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 6610ST	STD	Standard, lyophilisiert	6 vials
K 6610KO	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	1 vial
K 6610NaCl	NACL	0.9 % ige NaCl-Lösung, gebrauchsfertig	25 ml
K 6610TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 6610AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

#### 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000  $\mu$ l
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 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 µl** 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.
- Der **Konjugat** (CONJ; Peroxidase-markierte Antikörper) ist vor Gebrauch **1:2000** in Waschpuffer zu verdünnen (10 µl PO-Antikörper + 20 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 Kontrolle (CTRL) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Standards und Kontrolle werden mit **250 µl** aqua bidest. Rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards sind **bei -20°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.

## 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  $H_2SO_4$ .  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muß auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden.  $H_2SO_4$  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 und Serum sind vor der Analyse **1:2000** mit Probenverdünnungspuffer zu verdünnen (z.B. 990  $\mu$ l Puffer zu 10  $\mu$ l Probe geben und aus dieser Verdünnung 40  $\mu$ l zu 760  $\mu$ l Puffer geben).

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

### Urin

Urine können direkt eingesetzt 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 abzarbeiten.

### *Pipettierschema*

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

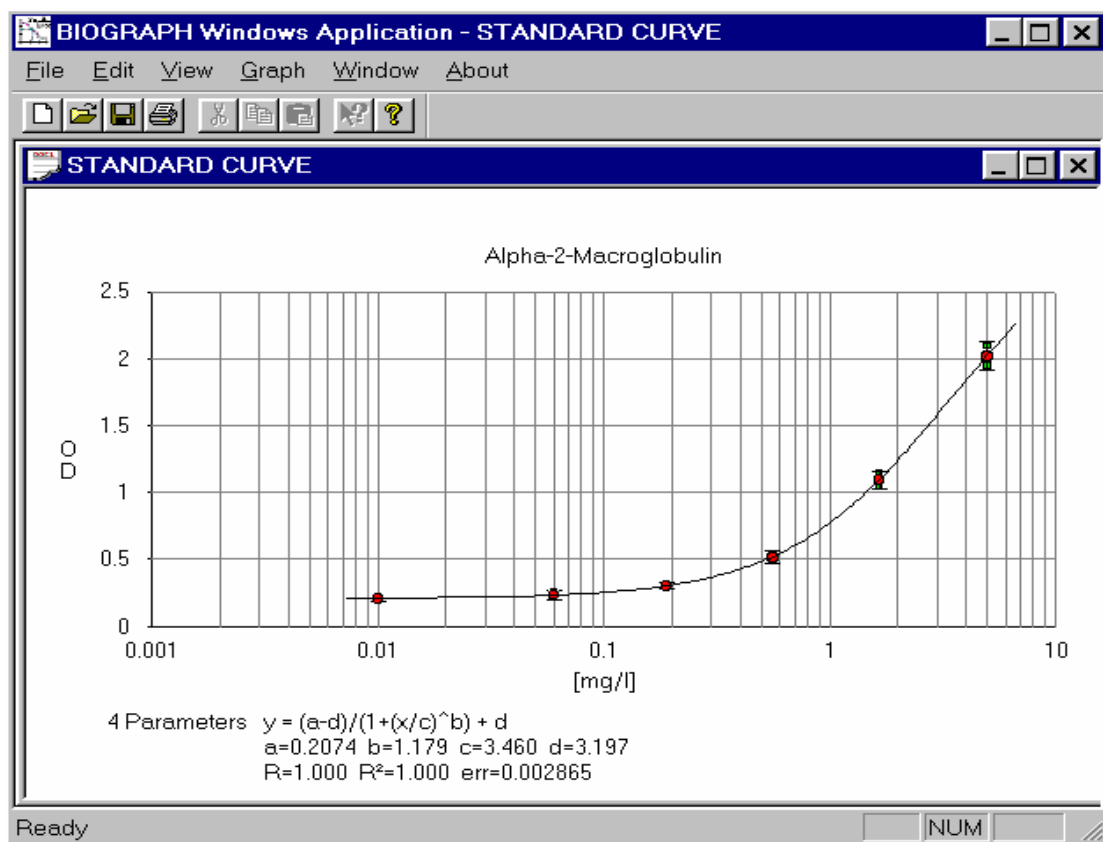
Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **200  $\mu$ l** 0.9% NaCl (NaCl) in alle Vertiefungen vorlegen.
2. **10  $\mu$ l** STD (Standards), CTRL (Kontrollen) und SAMPLE (Patientenproben) zugeben.
3. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter stetem Schütteln inkubieren.
4. Den Inhalt der PLATE (Platte) verwerfen und **5 x mit je 250  $\mu$ l** WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
5. **200  $\mu$ l** vorverdünntes CONJ (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
6. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubieren.
7. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250  $\mu$ l** WASHBUF waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8. **200  $\mu$ l** SUB (Substrat) in jede Vertiefung pipettieren.
9. **5-10 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis ausreichend große Farbdifferenzen eingetreten sind.
10. **50  $\mu$ l** STOP (Stopplösung) zusetzen und kurz mischen.
11. 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

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

### Mustereichkurve



Konzentration [mg/l]	5	1.66	0.56	0.19	0.07	0
OD Mittelwert	1.711	1.021	0.501	0.260	0.160	0.148

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Assays verwendet werden.

### Serum-und Plasmaproben:

Die ermittelte Serum- oder Plasmakonzentration wird mit **2.000** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

## 11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer  $\alpha_2$ -Makroglobulin Konzentration größer dem größten Standard sollten mit Verdünnungspuffer 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

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

## 13. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

#### Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Meßserie wurde geprüft. Zwei Proben wurden 32-mal in einem  $\alpha_2$ -Makroglobulin ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 32

Probe	$\alpha_2$ -Makroglobulin Mittelwert [mg/L]	Intra-Assay Vk [%]
1	1125.53	6.20
2	676.92	7.96

#### Inter-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft. Die Proben wurden 10 mal von verschiedenen Personen im  $\alpha_2$ -Makroglobulin ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 10

Probe	$\alpha_2$ -Makroglobulin Mittelwert [mg/L]	Inter-Assay Vk [%]
1	1937.12	9.23
2	1298.07	8.85

### Wiederfindung

Zwei  $\alpha_2$ -Makroglobulin-haltige Proben wurden mit unterschiedlichen Spikes gemessen.

Wiederfindung n=3

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	$\alpha_2$ -Makroglobulin erwartet [ng/ml]	$\alpha_2$ -Makroglobulin gemessen [ng/ml]
344	521	865	736
344	415	759	730
344	293	637	585
176	521	697	571
176	415	591	540
176	293	469	420

### Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 + 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 22 mal der Standard null.

Probe	$\alpha_2$ -Makroglobulin Mittelwert [OD]	Standardabweichung	Nachweisgrenze [mg/L]
1	0.019	0.011	0.058

## Linearität

n= 2

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

Probe	Verdünnung	Erwartet [mg/L]	Gemessen [mg/L]
A	1:2000	2528.3	2528.3
	1:4000	1264.2	1346.1
	1:8000	632.1	675.9
	1:16000	316.0	343.4
B	1:2000	2036.8	2036.8
	1:4000	1018.4	1046.6
	1:8000	509.2	509.2
	1:16000	254.6	285.4

## 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 Immun- diagnostik zurück zu senden.

**Verwendete Symbole:**

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



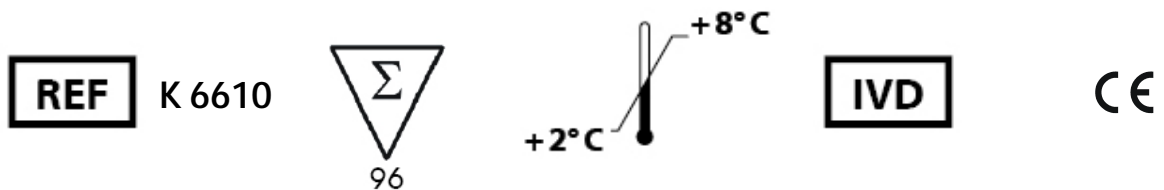
Chargenbezeichnung

Manual

# $\alpha_2$ -Macroglobulin ELISA Kit

*For the in vitro determination of  $\alpha_2$ -Macroglobulin in urine,  
serum and plasma*

Valid from 12.12.2007



## 1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of  $\alpha$  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  $\beta$ -Lipoproteins and  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  2-Macroglobulin in the samples is bound to polyclonal rabbit antibodies (in excess), which are immobilized to the surface of the microtitre wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a Peroxidase-labeled anti  $\alpha$  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  $\alpha$  2-Macroglobulin in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. Concentration is generated, using results obtained from the calibrators.  $\alpha$  2-Macroglobulin, **present in the patient samples, is determined directly from this curve.**

### 4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 6610MTP	PLATE	One holder with pre-coated strips	12 x 8 wells
K 6610WB	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate (10x)	1 x 100 ml
K 6610K	CONJ	Conjugate, (rabbit anti $\alpha$ -2-Macroglobulin peroxidase-labeled)	1 x 20 $\mu$ l
K 6610ST	STD	Calibrators, lyoph.	6 vials
K 6610KO	CTRL	Control, lyoph.	1 vial
K6610VP	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 6610NaCl	NACL	0.9 % NaCl-solution, ready-to-use	25 ml
K 6610TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	2 x 15 ml
K 6610AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

## 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors calibrated to deliver 10-200  $\mu$ l
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Microplate reader 450 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 calibrators (STD) and control (CTRL) must be reconstituted with **250 $\mu$ l** 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 control are stable at -20°C until the expiry date stated on the label.
- The **Conjugate** (CONJ; POD antibody) has to be diluted **1:2000** in ELISA wash buffer (10  $\mu$ l POD antibody and 20 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 could not be stored.**

## 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 must be diluted **1:2000** with sample dilution buffer (e.g. 10  $\mu$ l sample + 990  $\mu$ l sample dilution buffer. Take 40  $\mu$ l of this dilution and add 760  $\mu$ l dilution buffer to get the final dilution.)

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

### Urine

Urine samples can be measured directly.

## 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  $\mu$ l ELISA wash buffer (WASHBUF). Carry out the tests in duplicate.

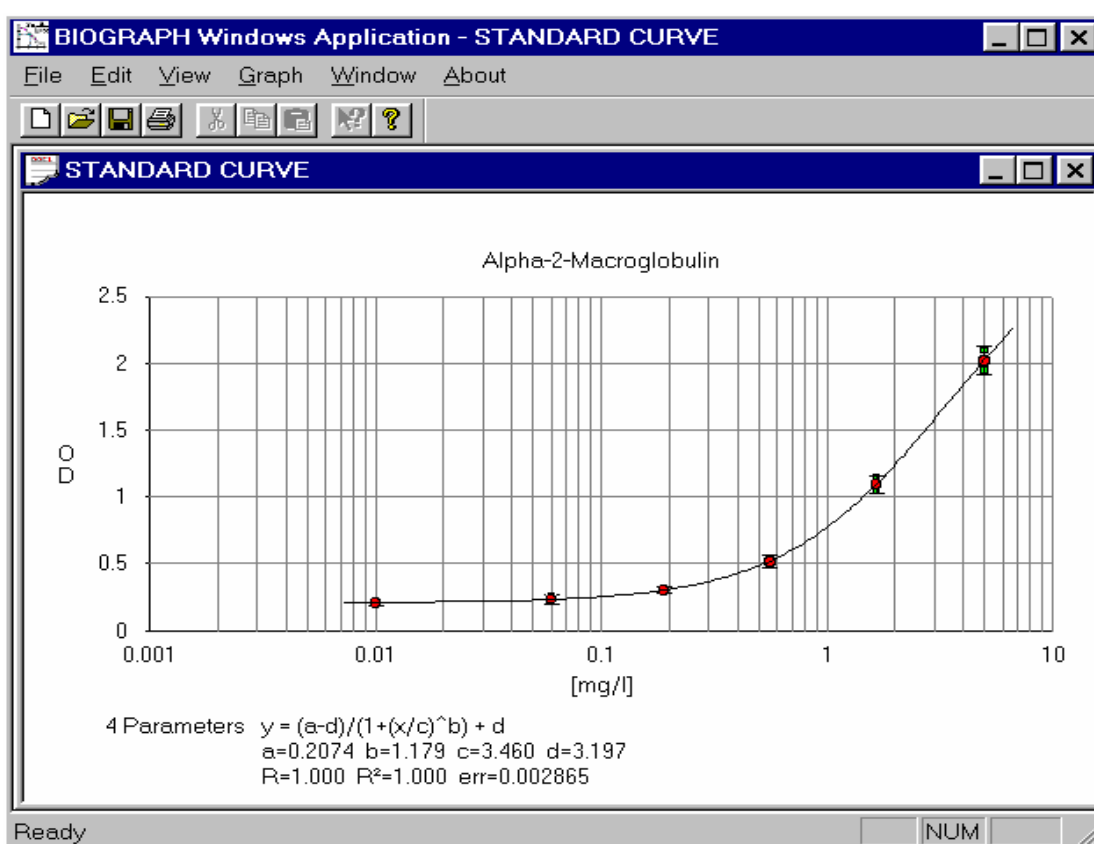
1. Add **200  $\mu$ l** 0.9% NACL (NaCl) solution into each well.
2. Add **10  $\mu$ l** of each STD (standard), CTRL (controls) and SAMPLE (patient samples).
3. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
4. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 $\mu$ l** ELISA WASHBUF (wash buffer).
5. Add **200  $\mu$ l** prediluted CONJ (Conjugate).
6. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
7. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 $\mu$ l** ELISA WASHBUF.
8. Add **200  $\mu$ l** SUB (TMB substrate) solution.
9. Incubate for **5-10 minutes** at room temperature.
10. Add **50  $\mu$ l** STOP (stop solution) and mix shortly.
11. 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

A calibration curve is constructed from the standards. Commercially available software can be used as well as graph paper. Results of the samples are read from this calibration curve.

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a spline- or 4PL algorithm is recommended.

### *Typical calibration curve*



Concentration [mg/l]	5	1.66	0.56	0.19	0.07	0
OD mean value	1.711	1.021	0.501	0.260	0.160	0.148

The data is for demonstration only and cannot be used in place of data generations at the time of the assay.

## Plasma and Serum

The measured plasma and serum concentration have to be multiplied with 2000 to get the right concentration.

## 11. LIMITATIONS

Samples with  $\alpha_2$ -Macroglobulin levels greater than the highest calibrator, should be diluted and re-assayed.

## 12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercial control samples for internal 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

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

## 13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

The intra-assay variation of the Immundiagnostik  $\alpha_2$ -Makroglobulin ELISA test was calculated from 32 determinations on each one of two samples.

Intra-Assay CV n= 32

Sample	$\alpha_2$ -Makroglobulin mean value [mg/L]	Intra-Assay CV [%]
1	1125.53	6.20
2	676.92	7.96

The inter-assay variation of the Immundiagnostik  $\alpha_2$ -Makroglobulin ELISA test was calculated from data on 2 samples obtained in 10 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of three months.

Inter-Assay CV n= 10

Sample	$\alpha_2$ -Makroglobulin mean value [mg/L]	Inter-Assay CV [%]
1	1937.12	9.23
2	1298.07	8.85

### Recovery

Two samples were spiked with three different  $\alpha_2$ -Makroglobulin-concentrations and measured with the assay.

Recovery n=3

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	$\alpha_2$ -Makroglobulin expected [ng/ml]	$\alpha_2$ -Makroglobulin measured [ng/ml]
344	521	865	736
344	415	759	730
344	293	637	585
176	521	697	571
176	415	591	540
176	293	469	420

### Sensitivity

The sensitivity was set as  $B_0 + 2SD$ . The zero-standard was measured 22 times.

Sample	$\alpha_2$ -Makroglobulin mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [mg/L]
1	0.019	0.011	0.058

*Sample dilution*

Linearity n= 2

Two patient serum samples were diluted with sample dilution buffer. The results are shown below:

Sample	Dilution	Expected [mg/L]	Measured [mg/L]
A	1:2000	2528.3	2528.3
	1:4000	1264.2	1346.1
	1:8000	632.1	675.9
	1:16000	316.0	343.4
B	1:2000	2036.8	2036.8
	1:4000	1018.4	1046.6
	1:8000	509.2	509.2
	1:16000	254.6	285.4

**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 different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from

**Used symbols:**



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number