

# $\beta_2$ -Mikroglobulin ELISA

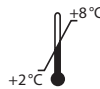
*Zur In-vitro-Bestimmung von  $\beta_2$ -Mikroglobulin  
in Plasma, Serum und Urin*

# $\beta_2$ -Microglobulin ELISA

*For the in vitro determination of  $\beta_2$ -microglobulin  
in plasma, serum and urine*

Gültig ab / Valid from 2025-06-20

**REF** K 6210



**IVD** **CE**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>3</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<i>Probenlagerung</i>	4
<i>Probenverdünnung</i>	4
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>5</b>
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>6</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>7</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>7</b>
<i>Referenzwerte</i>	8
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>8</b>
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Spike-Wiederfindung</i>	8
<i>Linearität</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>9</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>10</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>10</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von  $\beta_2$ -Mikroglobulin aus Plasma, Serum und Urin geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

$\beta_2$ -Mikroglobulin wird auf der Zellmembran aller kernhaltigen Zellen gefunden.  $\beta_2$ -Mikroglobulin hat ein Molekulargewicht von 11,8kD und ist ein Leichtkettenprotein der HLA-Klasse-I-Antigene.

Die Ausscheidung von  $\beta_2$ -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. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6210	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 6210	NACL	0,9%ige NaCl-Lösung, gebrauchsfertig	1 x 25 ml
K 6210	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig (Kaninchen-anti- $\beta_2$ -Mikroglobulin, peroxidasemarkiert)	1 x 25 ml
K 6210	STD	Standards, lyophilisiert (0; 0,6; 1,2; 2,5; 5; 10 mg/l)	1 x 6 vials
K 6210	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 6210	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6210	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000  $\mu\text{l}$
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

\* 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  $> 0,2 \mu\text{m}$ ) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von  $0,055 \mu\text{S/cm}$  bei  $25^\circ\text{C}$  ( $\geq 18,2 \text{M}\Omega\text{cm}$ ).

#### 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (z. B. 100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der

**Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **250  $\mu$ l Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **können 4 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden**. Für die **Langzeitlagerung bis zu 3 Monaten** müssen sie **bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### *Probenlagerung*

#### **Plasma und Serum**

Plasma- bzw. Serumproben sind 14 Tage bei 2–8 °C stabil. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

#### **Urin**

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. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

### *Probenverdünnung*

Serum-, Plasma- und Urinproben werden vor dem Einsatz im Test **1:50** verdünnt und gemischt. Z.B.

**10  $\mu$ l Probe + 490  $\mu$ l Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF).**

Proben mit einem  **$\beta_2$ -Mikroglobulin-Gehalt > 10 mg/l** müssen **1:10 mit Probenverdünnungspuffer** weiter verdünnt werden.

**10  $\mu$ l** der Verdünnung werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### Testprinzip

Der vorliegende ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Im ersten Inkubationsschritt wird  $\beta_2$ -Mikroglobulin von einem immobilisierten Antikörper gebunden. Dann wird das Konjugat, ein peroxidasemarkierter anti- $\beta_2$ -Mikroglobulin-Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper –  $\beta_2$ -Mikroglobulin – Peroxidase-Konjugat. Als Substrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der Farbe ist dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Gehalt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30°C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8°C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen <b>vor Gebrauch 5 x mit je 250 <math>\mu</math>l Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	<b>200 <math>\mu</math>l 0,9%ige NaCl-Lösung</b> (NaCl) in jede Vertiefung pipettieren.
3.	<b>10 <math>\mu</math>l Standards/Kontrollen/verdünnte Proben</b> in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
4.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30°C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.

5.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 <math>\mu</math>l Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6.	<b>200 <math>\mu</math>l Konjugat</b> (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
7.	Streifen abdecken und <b>15 min</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.
8.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 <math>\mu</math>l Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9.	<b>200 <math>\mu</math>l Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
10.	<b>5–15 min**</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
11.	<b>100 <math>\mu</math>l Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
12.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

\* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

\*\* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

## 8. 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. 0,001).

## 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 und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

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, Plasma und Urin

Da die Probenverdünnung in der Standardkurve bereits berücksichtigt wurde, ist der Verdünnungsfaktor gleich 1.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*höchste Konzentration der Standardkurve*  $\times$  *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*Analytische Sensitivität*  $\times$  *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kon-

trollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### Referenzwerte

Plasma bzw. Serum:	< 2,5 mg/l
Urin	< 0,4 mg/l

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Präzision und Reproduzierbarkeit

#### Intra-Assay (n = 12)

Die Reproduzierbarkeit von zwei Ergebnissen innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Je eine Urin- und Plasmaprobe wurden 12-mal im  $\beta_2$ -Mikroglobulin ELISA von einer Person angesetzt.

Probe	$\beta_2$ -Mikroglobulin [mg/l]	VK [%]
Urin	5,7	9
Plasma	1,1	11

#### Inter-Assay (n = 12)

Die Reproduzierbarkeit von zwei Ergebnissen an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft. Je eine Urin- und Plasmaprobe wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im  $\beta_2$ -Mikroglobulin ELISA gemessen.

Probe	$\beta_2$ -Mikroglobulin [mg/l]	VK [%]
Urin	5,9	15
Plasma	1,0	12

### Spike-Wiederfindung

Je eine Urin- und Plasmaprobe wurden mit je 5 mg  $\beta_2$ -Mikroglobulin versetzt und gemessen. Die Wiederfindungsrate beträgt für die Plasmaprobe 98% und für die Urinprobe 93%.

### Linearität

Die Linearität wurde durch Verdünnen einer  $\beta_2$ -Mikroglobulin Probe in Verdünnungspuffer ermittelt. Der lineare Bereich erstreckt sich von 0,2–10 mg/l.

### Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 + 2 \text{ SD}$ . Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,1 mg/l.

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

**Achtung:** Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

### 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina 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, zurückzusenden.

**Verwendete Symbole:**

Chargenbezeichnung



Bestellnummer

*In-vitro*-Diagnostikum

Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen

Temperaturbegrenzung



Verwendbar bis

Produktspezifikationsdatenblatt  
beachtenGebrauchsanweisung  
beachten

Europäische Konformität



Reizend



Eindeutige Produktidentifizierung



# $\beta_2$ -Microglobulin ELISA

*For the in vitro determination of  $\beta_2$ -microglobulin  
in plasma, serum and urine*

Valid from 2025-06-20

REF K 6210



IVD CE



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>15</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>16</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>17</b>
<i>Sample storage</i>	17
<i>Dilution of samples</i>	17
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>17</b>
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	18
<b>8. RESULTS</b>	<b>19</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>20</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>20</b>
<i>Reference range</i>	20
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>21</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Spiking Recovery</i>	21
<i>Dilution recovery</i>	21
<i>Analytical Sensitivity</i>	21
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>22</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>23</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>23</b>

## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of  $\beta_2$ -microglobulin in serum, plasma and urine. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

$\beta_2$ -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. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6210	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 6210	NACL	0.9 % NaCl-solution, ready-to-use	1 x 25 ml
K 6210	CONJ	Conjugate, ready-to-use (rabbit-anti- $\beta_2$ -microglobulin, peroxidase-labelled)	1 x 25 ml
K 6210	STD	Standards, lyophilised (0; 0.6; 1.2; 2.5; 5; 10 mg/l)	1 x 6 vials
K 6210	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	1 x 1 vial
K 6210	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	1 x 1 vial
K 6210	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

#### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water\*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000  $\mu\text{l}$  single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

\* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles  $> 0.2 \mu\text{m}$ ) with an electrical conductivity of  $0.055 \mu\text{S}/\text{cm}$  at  $25^\circ\text{C}$  ( $\geq 18.2 \text{M}\Omega\text{cm}$ ).

#### 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (e.g. 100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be re-dissolved at room temperature or in a water bath at  $37^\circ\text{C}$ . The **WASHBUF** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8°C for 1 month**.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **250  $\mu\text{l}$  of ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at 2–8°C for 4 weeks. For long term storage up to 3 months they can be stored at -20°C. Avoid repeated thawing and freezing.**
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8°C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *Sample storage*

#### **Serum and Plasma**

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

#### **Urine**

Urines 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.

### *Dilution of samples*

Plasma, serum and urine samples must be diluted **1:50** before performing the assay, mix well. For example

**10  $\mu$ l** sample + **490  $\mu$ l** sample dilution buffer (SAMPLEBUF).

Samples with a  **$\beta_2$ -microglobulin content higher than 10 mg/l** should be **further diluted 1:10 with sample dilution buffer**.

For analysis, pipet **10  $\mu$ l** of the dilution per well.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This ELISA is designed for the quantitative determination of  $\beta_2$ -microglobulin.

In a first incubation step,  $\beta_2$ -microglobulin is bound to an immobilised antibody. Then a peroxidase-labelled anti- $\beta_2$ -microglobulin-antibody is added and a sandwich of capture antibody –  $\beta_2$ -microglobulin – peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the colour is directly proportional to the concentration of  $\beta_2$ -microglobulin. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standards.  $\beta_2$ -microglobulin, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

### Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	<b>Before use</b> , wash the wells <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add <b>200 µl 0.9% NaCl-solution</b> (NACL) into each well.
3.	Add each <b>10 µl standards/controls/diluted samples</b> into the respective wells.
4.	Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
5.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
6.	Add <b>200 µl conjugate</b> (CONJ) into each well.
7.	Cover the strips and incubate for <b>15 min</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
8.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
9.	Add <b>200 µl substrate</b> (SUB) into each well.
10.	Incubate for <b>5–15 min**</b> at room temperature (15–30 °C) in the <b>dark</b> .
11.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.

12.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> against 620 nm as a reference.
-----	---

\* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

\*\* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

## 8. 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 standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

### 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 linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

### Serum, plasma and urine

Since the sample dilution is already considered in the calibration curve, the dilution-factor is 1.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

*highest concentration of the standard curve  $\times$  sample dilution factor to be used*

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

*Analytical sensitivity  $\times$  sample dilution factor to be used*

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed 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

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

#### **Intra-Assay (n = 12)**

The reproducibility of two results in one measurement series was evaluated. A plasma and a urine sample were analysed 12 times by one person using the  $\beta_2$ -microglobulin ELISA.

Sample	$\beta_2$ -microglobulin [mg/l]	CV [%]
urine	5.7	9
plasma	1.1	11

#### **Inter-Assay (n = 12)**

The reproducibility of two results at different days was evaluated. A plasma and a urine sample were analysed at different days by different persons using the  $\beta_2$ -microglobulin ELISA.

Sample	$\beta_2$ -microglobulin [mg/l]	CV [%]
urine	5.9	15
plasma	1.0	12

### *Spiking Recovery*

A plasma and a urine sample each were spiked with 5 mg  $\beta_2$ -microglobulin and measured using this assay. The recovery-rate for plasma was 98% and for urine 93%.

### *Dilution recovery*

The linearity of this assay was estimated by dilution of a  $\beta_2$ -microglobulin sample in sample dilution buffer. The linearity extends from 0.2 to 10 mg/l.

### *Analytical Sensitivity*

The detection limit was set as  $B_0 + 2 \text{ SD}$  and estimated to be 0.1 mg/l.

## 12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are 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 ProClin as bactericides. Sodium azide or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

**Warning:** Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, 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 up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

### 13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

### 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding 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:**

Lot number



Catalogue number

*In Vitro* Diagnostic  
Medical Device

To be used with



Manufacturer

Contains sufficient for  
<n> tests

n



Temperature limitation



Use by

Consult product specification  
data sheetConsult instructions  
for use

European Conformity



Irritant



Unique Device Identification