

Immunglobulin G ELISA

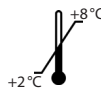
*Zur In-vitro-Bestimmung des Immunglobulin G
in Serum, Plasma und Urin*

Immunglobulin G ELISA

*For the in vitro determination of Immunglobulin G
in serum, plasma and urine*

Gültig ab / Valid from 2025-09-15

REF K 6510A



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

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Probenlagerung</i>	4
<i>Probenverdünnung</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Wiederfindung</i>	10
<i>Linearität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	12
<i>Publikationen mit dem Immunglobulin G ELISA Kit [K6510A]</i>	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Immunglobulin G (IgG) aus Serum, Plasma und Urin geeignet. Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Immunglobulin G (IgG) ist eine Unterklasse von Antikörpern, die den Großteil der Antikörper im Blut ausmacht. Es handelt sich um Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa. IgGs sind Teil der humoralen Immunabwehr und werden von B-Lymphozyten oder Plasmazellen nach Kontakt mit einem Antigen produziert.

Indikationen / Mögliche Forschungsgebiete

- Monoklonalen Gammopathien (Serum, Plasma)
- Chronischen oder akuten Infekten (Serum, Plasma)
- Autoimmunhepatitis (Serum, Plasma)
- Leberzirrhose (Serum, Plasma)
- Primären oder sekundären Immundefekten (Serum, Plasma)
- Glomeruläre Proteinurie (Urin)

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6510A	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6510A	CONJ	Konjugatkonzentrat (Kaninchen anti Immunglobulin G), peroxidase markiert	1 x 200 µl
K 6510A	CONJBUF	Konjugatverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 30 ml
K 6510A	STD	Standards, lyophilisiert, (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	2 x 5 vials
K 6510A	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6510A	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6510A	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 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 10–1 000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3 000 x g
- 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 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ 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 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.

- **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°C auf. Das bei **2–8°C gelagerte WASHBUF** kann 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** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben, sowie die Konzentrationen und Bereiche** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **können 1 Woche bei 2–8°C** oder **4 Wochen bei -20°C** gelagert werden. **Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Konjugatverdünnungspuffer** verdünnt (z. B. 100 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Das **CONJ** ist, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung

Serum und Plasma

Frisch abgenommenes EDTA-Plasma bzw. Serum kann bis zu 2 Wochen bei 2–8°C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20°C zu lagern.

Urin

Urin wird zur Lagerung mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6 und 8 eingestellt, die Proben sind bei 2–8°C, bei längerer als 14-tägiger Lagerung tiefgefroren bis zur Messung aufzubewahren.

Probenverdünnung

Serum und Plasma

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:200 000** in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt, z. B.

- **10 µl** Probe + **990 µl** SAMPLEBUF, gut mischen = **1:100 (Verdünnung I)**
- **10 µl Verdünnung I** + **990 µl** SAMPLEBUF, gut mischen = **1:100 (Verdünnung II)**
- **50 µl Verdünnung II** + **950 µl** SAMPLEBUF, gut mischen = **1:20 (Verdünnung III)**. Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von 1:200 000.

100 µl der Verdünnung III werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

Urin

Urin wird vor dem Einsatz im Test **1:25** in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt, z. B.

- **40 µl** Probe + **960 µl** SAMPLEBUF, gut mischen = **1:25**

100 µl der Verdünnung wird pro Vertiefung im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von humanen Immunglobulin G (IgG) aus Plasma, Serum und Urin.

Das IgG aus den Proben wird in einem einstündigen Inkubationsschritt mit Hilfe der im Überschuss an die Mikrotiterplatten immobilisierten polyklonalen Kaninchen-anti-IgG gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen IgG erfolgt nach einem Waschschrift zur Beseitigung aller Fremdstoffen durch Zugabe eines Peroxidase-markierten Antikörpers, der sich ebenfalls an das IgG bindet. Die Substratumsetzung ist direkt proportional zum gebundenen IgG. 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.

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 vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln* inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30°C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm 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 405 nm 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 und Plasma

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 200 000** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Urin

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 25** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

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** mit Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) 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 × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Analytische Sensitivität × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

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

Referenzwerte

Plasma oder Serum: 8–18 g/L

24-Stunden-Urin: 0,5–3,2 mg/24 Std

Spontanurin: < 10 mg IgG/g Kreatinin im Urin

Bei Spontanurin werden die IgG-Ergebnisse auf die Kreatininkonzentration im Urin bezogen.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren. Die oben genannten Daten dienen zur Orientierung und können von anderen Veröffentlichungen abweichen.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 20

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

Probe	Mittelwert [mg/l]	VK [%]
Urin 1	4,18	3,94
Urin 2	1,94	4,13

Probe	Mittelwert [g/l]	VK [%]
Plasma 1	26,7	4,57
Plasma 2	11,3	2,67

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 12

Die Reproduzierbarkeit von zwei Plasmaproben wurde an unterschiedlichen Tagen 12-mal von verschiedenen Personen gemessen.

Probe	Mittelwert [g/l]	VK [%]
Plasma 1	14,00	6,48
Plasma 2	17,94	3,85

Analytische Sensitivität

Der im Folgenden aufgeführten Wert wurde in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 1,645 \text{ SD}$. Gemessen wurde 84-mal der Standard null. Die Ergebnisse wurden ermittelt in Bezug auf die Konzentration der Kalibrationskurve und ergaben

Leerwert (*limit of blank, LoB*) = 1,9 ng/ml.

Wiederfindung

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Zwei Immunglobulin G-haltige Plasmaproben wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Immunglobulin G versetzt und gemessen.

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
15,2	250,0	265,2	284,7
15,2	125,0	140,2	119,6
15,2	62,5	77,7	69,9
15,2	31,3	46,5	49,5
15,2	15,6	30,8	31,0
22,0	250,0	272,0	258,9
22,0	125,0	147,0	124,5
22,0	62,5	84,5	80,3
22,0	31,3	53,3	48,4
22,0	15,6	37,6	39,0

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Zwei Plasmaproben wurden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und gemessen.

Probe	Verdünnung	Erwartet [g/l]	Gemessen [g/l]
A	1:100 000	32,4	32,4
	1:200 000	16,2	15,8
	1:400 000	8,1	8,0
B	1:100 000	17,1	17,1
	1:200 000	8,6	9,6
	1:400 000	4,3	5,5

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 (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der 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 Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immunodiagnostik 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.

15. LITERATUR

Publikationen mit dem Immunglobulin G ELISA Kit [K6510A]

1. Cook S, Ladich E, Nakazawa G, Eshtehardi P, Neidhart M, Vogel R, Togni M, Wenaweser P, Billinger M, Seiler C, Gay S, Meier B, Pichler WJ, Jüni P, Virmani R, Windecker S (2009). Correlation of intravascular ultrasound findings with histopathological analysis of thrombus aspirates in patients with very late drug-eluting stent thrombosis. *Circulation* 4;120(5):391-9.

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



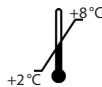
Eindeutige Produktidentifizierung

Immunglobulin G ELISA

*For the in vitro determination of Immunglobulin G
in serum, plasma and urine*

Valid from 2025-09-15

REF K 6510A



IVD



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
<i>Sample storage</i>	19
<i>Sample dilution</i>	19
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Test procedure</i>	20
8. RESULTS	21
9. LIMITATIONS	22
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Accuracy – Precision</i>	23
<i>Analytical Sensitivity</i>	24
<i>Recovery</i>	24
<i>Linearity</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	27
<i>Literature using Immunglobulin G ELISA Kit [K6510A]</i>	27

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of Immunoglobulin G (IgG) in plasma, serum and urine. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Immunoglobulin G (IgG) is a subclass of antibodies which makes up the majority of antibodies found in blood. IgGs are glycoproteins with a molecular weight of about 150 kDa. They are part of the humoral immunity and are produced by B lymphocytes and plasma cells after contact with an antigen.

Indications / Possible research areas

- Detecting or monitoring of
- IgG monoclonal gammopathies (serum, plasma)
- Chronic or acute infections (serum, plasma)
- Autoimmune hepatitis (serum, plasma)
- Liver cirrhosis (serum, plasma)
- Primary or secondary immune deficiencies (serum, plasma)
- Glomerular proteinuria (urine)

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6510A	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 6510A	CONJBUF	Conjugate dilution buffer, ready-to-use	1 x 30 ml
K 6510A	CONJ	Conjugate concentrate (rabbit-anti-IgG), peroxidase-labelled	1 x 200 µl
K 6510A	STD	Standards, lyophilised (see specification for concentrations)	2 x 5 vials
K 6510A	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6510A	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6510A	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	2 x 100 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 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 10–1 000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3 000 g
- 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 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ 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.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **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 redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **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)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **Reconstitution details** as well as **concentrations and ranges** are given in the **specification data sheet**. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at 2–8 °C for 1 week or at -20 °C for 4 weeks. Avoid repeated thawing and freezing.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in **conjugate dilution buffer** (e.g. 100 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The **CONJ** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **Conjugate (1:101 diluted CONJ) is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Plasma or serum

Freshly collected EDTA plasma or serum can be stored for 2 weeks at 2–8 °C or for longer storage at -20 °C.

Urine

Adjust the urine to a pH of 6 to 8 with 1 N NaOH and store samples at 2–8 °C until testing. For longer storage, samples should be frozen at -20 °C.

Sample dilution

Plasma or serum

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:200 000** in sample dilution buffer (SAMPLEBUF), before performing the assay. Dilution in three steps is recommended, e.g.:

- **10 µl** sample + **990 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:100 (dilution I)**
- **10 µl** dilution I + **990 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:100 (dilution II)**
- **50 µl** dilution II + **950 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:20 (dilution III)**. This results in a final dilution of 1:200 000.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution III** per well.

Urine

Urine must be diluted **1:25** in sample dilution buffer (SAMPLEBUF) before performing the assay, e.g.:

e.g. **40 µl** sample + **960 µl** SAMPLEBUF, mix well.

100 µl of the dilution are used in the test.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of Immunglobulin G (IgG) in plasma, serum and urine.

In a first incubation step, the Immunglobulin G in the samples is bound to polyclonal rabbit antibodies (in excess) immobilised to the surface of the microtiter wells. After removal of all unbound substances, a peroxidase-labelled anti Immunglobulin G antibody is added. The second washing step is followed by incubation with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). The reaction is terminated by an acidic stop solution converting the colour from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of Immunglobulin G in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the results obtained from the calibrators. Immunglobulin G, 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.

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.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal shaker* .

4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
11.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm 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 405 nm 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.

Plasma and serum

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor 200 000** to get the actual concentrations.

Urine

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor 25** to get the actual concentrations.

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 with sample dilution buffer (SAMPLEBUF) 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 × sample dilution factor to be used

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

LoB × sample dilution factor to be used

Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

LoB 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: 8–18 g/L

24-hours urine: 0.5–3.2 mg/24 hours

Spontaneous urine: < 10 mg IgG/g creatinine in urine

For spontaneous urine samples, the IgG - values are normalised to the creatinine concentration in the urine.

We recommend each laboratory to establish its own reference range. Above mentioned values are only for orientation and may vary from other published data.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 20

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

Sample	Mean value [mg/l]	CV [%]
Urine 1	4.18	3.94
Urine 2	1.94	4.13

Sample	Mean value [g/l]	CV [%]
Plasma 1	26.7	4.57
Plasma 2	11.3	2.67

Reproducibility (Inter-Assay); n = 12

The inter-assay variation was calculated from data on 2 plasma samples on different days. The samples have been measured by different technicians in 12 different assays.

Sample	Mean value [g/l]	CV [%]
1	14.00	6.48
2	17.94	3.85

Analytical Sensitivity

The following value has been estimated based on the concentrations of the standard without considering possibly used sample dilution factors.

The detection limit was set as $B_0 + 1.645 \text{ SD}$. The Zero-standard was measured 84 times. The values were estimated in relation to the concentration of the calibration curve and resulted in

Limit of blank, $\text{LoB} = 1.9 \text{ ng/ml}$

Recovery

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Two Immunglobulin G-containing plasma samples were spiked with different Immunglobulin G-concentrations and measured.

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]
15.2	250.0	265.2	284.7
15.2	125.0	140.2	119.6
15.2	62.5	77.7	69.9
15.2	31.3	46.5	49.5
15.2	15.6	30.8	31.0
22.0	250.0	272.0	258.9
22.0	125.0	147.0	124.5
22.0	62.5	84.5	80.3
22.0	31.3	53.3	48.4
22.0	15.6	37.6	39.0

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. Two plasma samples were diluted with sample dilution buffer and measured with the assay.

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]
A	1:100 000	32.4	32.4
	1:200 000	16.2	15.8
	1:400 000	8.1	8.0
B	1:100 000	17.1	17.1
	1:200 000	8.6	9.6
	1:400 000	4.3	5.5

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 should 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.

15. REFERENCES

Literature using Immunglobulin G ELISA Kit [K6510A]

1. Cook S, Ladich E, Nakazawa G, Eshtehardi P, Neidhart M, Vogel R, Togni M, Wenaweser P, Billinger M, Seiler C, Gay S, Meier B, Pichler WJ, Jüni P, Virmani R, Windecker S (2009). Correlation of intravascular ultrasound findings with histopathological analysis of thrombus aspirates in patients with very late drug-eluting stent thrombosis. *Circulation* 4;120(5):391-9.

Used symbols:



Lot number



Catalogue number



In-Vitro-Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for
<n> tests



Temperature limitation



Use by



Consult product specification
data sheet



Consult
instructions for use



European Conformity



Irritant



Unique Device Identification