

Immunglobulin G ELISA

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

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

Gültig ab / Valid from 2022-01-05

REF K 6510



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>EDTA-Plasma und Serum</i>	4
<i>Urin</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	9
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	9
<i>Linearität</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Analytische Spezifität</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

Immunglobulin G (IgG) ist der am häufigsten vorkommende Antikörpertyp in menschlichem Blut (ca. 75% der Serumantikörper). IgG-Moleküle schützen den Körper durch Immobilisation und Agglutination von Antigenen, Opsonisierung, Aktivierung des klassischen Komplementsignalwegs und anderen Mitteln vor Infektionen. IgG-Moleküle sind auch an der Regulation allergischer Reaktionen beteiligt, und ihre geringe Größe ermöglicht es ihnen, Gewebe leicht zu durchdringen.

IgG-Moleküle werden von Plasma-B-Zellen sezerniert. Ein IgG-Antikörper ist ein Monomer, das aus vier Peptidketten mit einem molekularen Gesamtgewicht von ca. 150 kDa besteht. Er ist aus zwei identischen schweren Ketten der Gamma-Klasse (jeweils ca. 50 kDa) und zwei identischen leichten Ketten von jeweils ca. 25 kDa zusammengesetzt. Sowohl die beiden schweren Ketten als auch je eine leichte und eine schwere Kette werden durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Das entstehende Tetramer hat zwei identische Hälften, die zusammen die Y-artige Form bilden. An jedem Ende der Gabelung befindet sich eine identische Antigenbindestelle.

Indikationen

- Autoimmunhepatitis
- monoklonale Gammopathie vom Typ IgG Kappa oder IgG Lambda
- Amyloidose
- chronische Infektionen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6510	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 6510	NACL	0.9 %-ige NaCl-Lösung	1 x 30 ml
K 6510	CONJ	Konjugatkonzentrat (Kaninchen anti Immunglobulin G, Peroxidase-markiert)	1 x 50 µl

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6510	STD	Standards, lyophilisiert (0; 0.32; 0.8; 2; 5 mg/l)	5 x 1 vial
K 6510	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 6510	CONJBUF	Konjugatverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
K 6510	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 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 µl
- 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 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 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (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 **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 die **lyophilisierte Kontrolle (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **250 µl 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 Kontrolle** (rekonstituierte STD und CTRL) **können bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:1000** in **Konjugatverdünnungspuffer** verdünnt (10 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Das **CONJ** ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:1000 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

EDTA-Plasma und Serum

Probenlagerung

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.

Probenverdünnung

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:10 000** in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt. Zum Beispiel:

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

10 µl der **Verdünnung II** werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

Urin

Probenlagerung

Urin wird zur Lagerung mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6 und 8 eingestellt. Urin kann bis zu 2 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

Probenverdünnung

Urinproben mit einem IgG-Gehalt >5 mg/l sind im Verhältnis **1:10** mit Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) zu verdünnen. Zum Beispiel

100 µl Probe + **900 µl** SAMPLEBUF, mischen

10 µl der **Verdünnung** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von humanen Immunglobulin G (IgG).

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 Fremdsbstanzan 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/Kontrolle/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 vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	200 µl 0.9 % NaCl (NaCl) in alle Vertiefungen vorlegen.
3.	10 µl Standards/Kontrollen/vorbereitete bzw. verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
4.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
5.	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.
6.	200 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
7.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
8.	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.
9.	200 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
10.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.

11.	50 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
12.	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.

EDTA-Plasma und Serum

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 10 000** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Urin (1:10 Verdünnung)

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 10** 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 stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

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
Urin:	0,5–3,2 mg/24 Std

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

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay)

Die Wiederholbarkeit wurde mit 3 Serumproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der Probenverdünnung ermittelt:

Probe	Mittelwert [mg/l]	VK [%]
1 (n = 26)	0,479	5,7
2 (n = 26)	0,396	6,3
3 (n = 28)	0,278	6,3

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 33

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [mg/l]	VK [%]
1	0,244	13,2
2	1,312	12,4

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Hierzu wurde eine Probe mit bekannter IgG-Konzentration 4-mal gemessen:

Probe [g/l]	Gemessen [g/l]	Wiederfindung [%]
9,17	9,35	101,92
	9,22	100,55
	9,22	100,56
	8,72	95,12

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung von 5 Serumproben nachgewiesen.

Für IgG in Serum, Plasma und Urin wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 0,079 bis 2,000 mg/l nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der Probenverdünnung ermittelt:

Probe	Verdünnung	Erwartet [mg/l]	Gemessen [mg/l]	Wiederfindung [%]
A	1:5 000	1,329	1,329	100,00
	1:12 500	0,532	0,493	92,80
	1:31 250	0,213	0,195	91,93
	1:78 125	0,085	0,073	85,91
B	1:5 000	1,234	1,234	100,00
	1:12 500	0,493	0,464	93,99
	1:31 250	0,197	0,175	88,84
	1:78 125	0,079	0,065	81,71
C	1:10 000	0,837	0,837	100,00
	1:25 000	0,335	0,347	103,53
	1:62 500	0,134	0,125	93,52
D	1:1 600	2,000	2,000	100,00
	1:4 000	0,800	0,763	95,43
	1:10 000	0,320	0,313	97,84
	1:25 000	0,128	0,132	102,76
E	1:1 600	1,900	1,900	100,00
	1:4 000	0,760	0,728	95,84
	1:10 000	0,304	0,304	99,92
	1:25 000	0,122	0,128	105,02

Analytische Sensitivität

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

Leerwert (*limit of blank*, LoB):

0,062 mg/l

Analytische Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu Maus- oder Ratten-IgG nachgewiesen.

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 giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- 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 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:

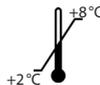
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

Immunoglobulin G ELISA

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

Valid from 2022-01-05

REF K 6510



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

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>EDTA plasma and serum samples</i>	19
<i>Urine</i>	20
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Test procedure</i>	20
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	22
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Accuracy – Precision</i>	23
<i>Accuracy – Trueness</i>	24
<i>Linearity</i>	24
<i>Analytical sensitivity</i>	25
<i>Analytical specificity</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26

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 the most common type of antibody found in human blood (~75% of serum antibodies). IgG molecules protect the body from infection by immobilisation and agglutination of antigens, opsonisation, activation of the classical complement pathway and other means. IgG molecules are also involved in the regulation of allergic reactions, and its small size allows it to easily perfuse tissues.

IgG molecules are secreted by plasma B cells. IgG is a monomer consisting of four peptide chains with a total molecular weight of about 150 kDa. It contains two identical class γ heavy chains of about 50 kDa and two identical light chains of about 25 kDa. The two heavy chains are linked to each other and to a light chain each by disulfide bonds. The resulting tetramer has two identical halves, which together form the Y-like shape. Each end of the fork contains an identical antigen binding site.

Indications

- autoimmune hepatitis
- monoclonal gammopathy type IgG kappa or IgG lambda
- amyloidosis
- chronic infections

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6510	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 6510	NACL	0.9 % NaCl solution	1 x 30 ml
K 6510	CONJBUF	Conjugate dilution buffer, ready-to-use	1 x 22ml
K 6510	CONJ	Conjugate concentrate, (rabbit-anti-IgG, peroxidase-labelled)	1 x 50 μ l
K 6510	STD	Standards, lyophilised (0; 0.32; 0.8; 2; 5 mg/l)	5 x 1 vial

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6510	CTRL	Control, lyophilised (see specification for range)	1 x 1 vial
K 6510	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	2x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	2x 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 µl 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 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 (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** 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 **control (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 µl 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 control** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at -20 °C until the expiry date given on the label. Avoid repeated thawing and freezing.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:1000** in **conjugate dilution buffer** (10 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The **CONJ** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:1000 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored.**
- 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

EDTA plasma and serum samples

Sample storage

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

Sample dilution

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:10 000** in sample dilution buffer (SAMPLEBUF) before performing the assay, 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). This results in a final dilution of 1:10 000.

10 µl of dilution II are used in the test per well.

Urine

Sample storage

Adjust the urine to a pH of 6 to 8 with 1 N NaOH. Samples can be stored at 2–8°C up to 2 weeks or at –20°C for longer storage.

Sample dilution

Samples with IgG-concentration higher than 5 mg/l must be diluted **1:10** with sample dilution buffer (SAMPLEBUF), e. g.

100 µl sample + **900 µl** SAMPLEBUF, mix well.

10 µl of the dilution are used in the test per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of immunoglobulin G.

In a first incubation step, the Immunoglobulin G in the samples is bound to polyclonal rabbit antibodies (in excess) immobilised to the surface of the microtitre wells. After removal of all unbound substances, a peroxidase-labelled anti Immunoglobulin G antibody is added. The second washing step is followed by incubation with the substrate, tetramethyl–benzidine (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 Immunoglobulin G in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Immunoglobulin 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/control/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.	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 200 µl 0.9 % NaCl (NACL) into each well.
3.	Add each 10 µl standards/control/prepared or diluted samples into the respective wells.
4.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
5.	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.
6.	Add 200 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
7.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
8.	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.
9.	Add 200 µl substrate (SUB) into each well.
10.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
11.	Add 50 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
12.	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.

EDTA-plasma and serum

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 10 000** to get the actual concentrations.

Urine (1:10 dilution)

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 10** 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 and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

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

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

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: 8–18g/l

Urine: 0.5–3.2mg/24 hours

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)

The repeatability was assessed with 3 serum samples under **constant** parameters (same operator, instrument, day and kit lot). The following values have been obtained without considering the sample dilution factors:

Sample	Mean value [mg/l]	CV [%]
1 (n = 26)	0,479	5,7
2 (n = 26)	0,396	6,3
3 (n = 28)	0,278	6,3

Reproducibility (Inter-Assay); n = 33

The reproducibility was assessed with 2 serum samples under **varying** parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [mg/l]	CV [%]
1	0,244	13,2
2	1,312	12,4

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, one sample with a known concentration was tested 4 times:

Sample [g/l]	Obtained [g/l]	Recovery [%]
9.17	9.35	101.92
	9.22	100.55
	9.22	100.56
	8.72	95.12

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. This was assessed according to CLSI guideline EP6-A with a serial dilution of 5 different serum samples.

For IgG in serum, plasma and urine, the method has been demonstrated to be linear from 0.079 to 2.000 mg/l showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [mg/l]	Obtained [mg/l]	Recovery [%]
A	1:5 000	1.329	1.329	100.00
	1:12 500	0.532	0.493	92.80
	1:31 250	0.213	0.195	91.93
	1:78 125	0.085	0.073	85.91
B	1:5 000	1.234	1.234	100.00
	1:12 500	0.493	0.464	93.99
	1:31 250	0.197	0.175	88.84
	1:78 125	0.079	0.065	81.71
C	1:10 000	0.837	0.837	100.00
	1:25 000	0.335	0.347	103.53
	1:62 500	0.134	0.125	93.52

Sample	Dilution	Expected [mg/l]	Obtained [mg/l]	Recovery [%]
D	1:1 600	2.000	2.000	100.00
	1:4 000	0.800	0.763	95.43
	1:10 000	0.320	0.313	97.84
	1:25 000	0.128	0.132	102.76
E	1:1 600	1.900	1.900	100.00
	1:4 000	0.760	0.728	95.84
	1:10 000	0.304	0.304	99.92
	1:25 000	0.122	0.128	105.02

Analytical sensitivity

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

Limit of blank, LoB

0.062 mg/l

Analytical specificity

There was no cross-reactivity observed with mouse or rat IgG.

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 and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant