

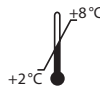
α_2 -Makroglobulin ELISA

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

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

Gültig ab / Valid from 2021-12-15

REF K 6610A



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

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Plasma und Serum</i>	5
<i>Urin</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	10
<i>Linearität</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13
15. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von α_2 -Makroglobulin aus Serum, Plasma und Urin geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Alpha-2-Makroglobulin (α_2 M) ist eines der größten Plasmaproteine mit einem von der Glykosylierung abhängigen Molekulargewicht von 650–900 kDa. Es besteht aus vier identischen Untereinheiten. α_2 M inhibiert alle bekannten Endopeptidaseklassen durch Bindung und damit einhergehender Blockierung der aktiven Zentren. Der α_2 M-Endopeptidase-Komplex wird dann durch den endozytischen Proteinase-Clearance-Stoffwechselweg rasch aus der Zirkulation entfernt. α_2 M bindet, transportiert und reguliert auch viele andere Moleküle wie z. B. Defensine, basisches Myelinprotein und viele weitere Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone.

Die Messung von Urinproteinen ermöglicht die Diagnose der Proteinurie, die durch eine Proteinausscheidung von > 150 mg Protein/Tag definiert wird. Je nach Lokalisation des Nierenschadens kann die Proteinurie in prärenale, renale (glomeruläre oder tubuläre) oder postrenale Proteinurie unterteilt werden. Durch die Messung bestimmter Markerproteine unterschiedlichen Molekulargewichts kann eine Differentialdiagnose gestellt werden. Sehr große Proteine wie α_2 M sind vollständig von der glomerulären Filtration in den Nieren ausgenommen. Daher ist der Nachweis von α_2 M in Urinproben ein Zeichen für postrenalen Nierenschaden, bei dem Serumproteine ungefiltert in den Urin übergehen. Gründe für postrenale Nierenschädigungen sind beispielsweise Entzündungen oder Hämaturie in Folge von Nierensteinen oder Karzinomen.

Indikationen

- Detektion und Differenzierung von Proteinurie gemäß Nierenschadenlokalisierung
- Differenzierung von renaler und postrenaler Hämaturie

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6610A	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6610A	CONJ	Konjugatkonzentrat, Kaninchen anti α_2 -Makroglobulin, peroxidasemarkiert	1 x 200 μ l
K 6610A	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	2 x 6 vials
K 6610A	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6610A	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6610A	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 10–1000 μ l
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 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 $> 0,2 \mu\text{m}$) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,055 \mu\text{S/cm}$ bei 25°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.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 μ l** 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 (100ml 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 Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **500 μ 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 -20°C gelagert und nach dem Auftauen einmal wieder verwendet werden**.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 μ l CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das **CONJ** ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **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 Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Plasma und Serum

Lagerung

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

Probenverdünnung

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

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

20 µl der Verdünnung I + **980 µl** SAMPLEBUF, gut mischen =
1:1 000 (Verdünnung II)

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

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

Urin

Lagerung

Urin sollte bis zur Messung bei -20°C gelagert werden. Alpha-2-Makroglobulin ist im Urin für 4 Wochen bei -20°C stabil.

Probenverdünnung

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

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

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

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung des α_2 -Makroglobulins (α_2 M) in Plasma, Serum und Urin.

In diesem ELISA wird α_2 -Makroglobulin aus den Proben in einem einstündigen Inkubationsschritt an polyklonale, auf die Mikrotiterplatte fixierte Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen α_2 -Makroglobulin erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines peroxidasemarkierten Antikörpers (PO-AK). Dieser markiert spezifisch das gebundene α_2 -Makroglobulin. Die Enzymmenge ist direkt proportional dem α_2 -Makroglobulin-Gehalt. Als Substrat wird TMB eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden. 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 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 Plasmaproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 50 000** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Urinproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 5** 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.

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

Referenzwerte

Plasma bzw. Serum: 1,3–3,0g/l

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

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 27

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Serum- und 2 Urinproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [g/l]	VK [%]
Serum 1	3,92	2,4
Serum 2	2,15	7,8

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
Urin 1	163,65	2,3
Urin 2	84,84	3,5

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 13

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Serum- und 2 Urinproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [g/l]	VK [%]
Serum 1	3,82	12,7
Serum 2	1,85	11,6

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
Urin 1	156,94	5,0
Urin 2	82,97	4,5

Analytische Sensitivität

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

Leerwert (*limit of blank*, LoB)

1,611 ng/ml

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 2 Serum- und 2 Urinproben wurden dafür mit bekannten α_2 -Makroglobulin-Konzentrationen versetzt und gemessen. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ermittelt:

Urinprobe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
19,13	200	219,13	199,25	90,93
	100	119,13	118,39	99,38
	50	69,13	64,02	92,61
34,74	200	234,74	223,79	95,34
	100	134,74	118,59	88,02
	50	84,74	80,46	94,95

Serumprobe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
17,29	200	217,29	191,95	88,34
	100	117,29	107,00	91,23
	50	67,29	64,04	95,17
31,77	200	231,77	227,51	98,16
	100	131,77	123,34	93,61
	50	81,77	80,40	98,33

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 einer Serum- und einer Urinprobe nachgewiesen.

Für α_2 -Makroglobulin in Serum, Plasma und Urin wurde Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung der Probenverdünnungsfaktoren ein lineares Verhalten im Bereich von 16,13 bis 297,07 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
Urin	1:5	297,07	297,07	100,00
	1:10	148,53	162,45	109,37
	1:12.5	118,83	112,15	94,38
	1:20	74,27	83,58	112,55
	1:25	59,41	62,28	104,83
	1:40	37,13	42,54	114,57
	1:50	29,71	34,74	116,93
Serum	1:10 000	258,00	258,00	100,00
	1:20 000	129,00	133,00	103,10
	1:40 000	64,50	64,50	100,00
	1:80 000	32,25	31,13	96,51
	1:160 000	16,13	17,29	107,22

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 beigefügten 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.













15. LITERATUR

1. Sottrup-Jensen, L, T M Stepanik, T Kristensen, D M Wierzbicki, C M Jones, P B Lönblad, S Magnusson, and T E Petersen. 1984. "Primary Structure of Human Alpha 2-Macroglobulin. V. The Complete Structure." *The Journal of Biological Chemistry* **259** (13): 8318–27.
2. Steinhoff, J, U Bühner, R Preuss, and K Sack. 1994. "C-Reactive Protein and Alpha 2 Macroglobulin in Urine as Markers of Renal Transplant Rejection." *Transplantation Proceedings* **26** (3): 1768.
3. Steinhoff, J. 1995. "Differential Diagnosis of Rejection after Kidney Transplantation. Noninvasive Rapid Diagnosis by Determining Special Urinary Proteins." *Fortschritte der Medizin* **113** (35-36): 507–9.
4. Hoyer, J, R Preuss, R Riek, L Fricke, and J Steinhoff. 1995. "Quantitative Determination of Urine Proteins: A Rapid, Noninvasive, Sensitive, and Inexpensive Method to Monitor Renal Grafts." *Transplantation Proceedings* **27** (5): 2571–72.
5. Steinhoff, J, G Einecke, C Niederstadt, K de Groot, L Fricke, H Machnik, and K Sack. 1997. "Renal Graft Rejection or Urinary Tract Infection? The Value of Myeloperoxidase, C-Reactive Protein, and alpha2-Macroglobulin in the Urine." *Transplantation* **64** (3): 443–47.
6. Regeniter, Axel, Heike Freidank, Michael Dickenmann, Wolf H. Boesken, and Werner H. Siede. 2009. "Evaluation of Proteinuria and GFR to Diagnose and Clas-

sify Kidney Disease: Systematic Review and Proof of Concept." *European Journal of Internal Medicine* **20** (6): 556–61.

7. Rehman, Ahmed a., Haseeb Ahsan, and Fahim H. Khan. 2013. "Alpha-2-Macroglobulin: A Physiological Guardian." *Journal of Cellular Physiology* **228** (8): 1665–75.

Verwendete Symbole:

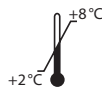
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

α_2 -Macroglobulin ELISA

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

Valid from 2021-12-15

REF K 6610A



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>Plasma and serum</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>Analytical sensitivity</i>	24
<i>Accuracy - Trueness</i>	24
<i>Linearity</i>	25
12. PRECAUTIONS	26
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27
15. REFERENCES	27

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik AG assay is intended for the quantitative determination of α_2 -macroglobulin in urine, serum and plasma. For *in vitro* diagnostic only.

2. INTRODUCTION

Alpha-2-Macroglobulin (α_2 M) is one of the biggest plasma proteins, with a molecular weight of 650–900 kDa, depending on the degree of glycosylation. It consists of 4 identical subunits. α_2 M inhibits all known classes of endopeptidases by binding them and thereby blocking their active sites. The α_2 M-endopeptidase complex is then cleared rapidly from the circulation by the endocytotic proteinase clearance pathway. α_2 M also binds, transports and regulates many other molecules like defensins, myelin basic protein, and a host of other cytokines, growth factors, and hormones.

Measuring urinary proteins allows the diagnosis of proteinuria, which is defined as > 150 mg protein/day. Proteinuria can be divided into prerenal, renal (glomerular or tubular), and postrenal proteinuria depending on the localisation of the kidney damage. Differential diagnosis can be achieved by measuring certain marker proteins of different molecular weights. Very large proteins, such as α_2 M, are completely restricted from glomerular filtration in the kidneys. Thus, detecting α_2 M in urine is evidence of postrenal damage, when unfiltered serum proteins leak into the urine. Causes of postrenal damage are inflammation or hematuria as a consequence of renal stones or carcinomas.

Indications

- Detection and differentiation of proteinuria according to kidney damage localisation
- Differentiation of renal and postrenal hematuria

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6610A	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 6610A	CONJ	Conjugate concentrate, rabbit anti α_2 -Macroglobulin, peroxidase-labelled)	1 x 200 μ l
K 6610A	STD	Standards, lyophilised (see specification for concentrations)	2 x 6 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6610A	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6610A	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6610A	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	2 x 100 ml
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 10–1000 μ l single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 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 μ m) with an electrical conductivity of 0.055 μ S/cm at 25 °C (\geq 18.2 M Ω 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 μ l** 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. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37°C before dilution of the buffer solutions. 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 one 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 **500 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 controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at -20°C for four weeks and used once after thawing**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8°C** until expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 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

Plasma and serum

Sample storage

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

Sample dilution

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

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

20 µl of dilution I + **980 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:1 000 (dilution II)**

20 µl of dilution II + **980 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:50 000 (dilution III)**

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

Urine

Sample storage

Urine samples should be stored at -20°C until the measurement. Alpha-2-macroglobulin in urine is stable for 4 weeks at -20°C .

Sample dilution

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

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

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

In a first incubation step, the α_2 -macroglobulin in the samples is bound to polyclonal rabbit antibodies (in excess), which are immobilised to the microtiter wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a peroxidase-labelled anti α_2 -macroglobulin antibody (POD-antibody) is added. After another washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stop solution is then added to stop the reaction. The colour converts from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of α_2 -macroglobulin in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the results obtained from the calibrators. α_2 -macroglobulin, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** ($15\text{--}30^{\circ}\text{C}$) and mix well.

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

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$. 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 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 calibrator 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 samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 50 000** to get the actual concentrations.

Urine samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 5** 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 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 and serum: 1.3–3.0 g/l

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

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy - Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 27

The repeatability was assessed with 2 serum and 2 urine samples under **constant** parameters (same operator, instrument, day and kit lot).

Sample	Mean value [g/l]	CV [%]
Serum 1	3.92	2.4
Serum 2	2.15	7.8
Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
Urine 1	163.65	2.3
Urine 2	84.84	3.5

Reproducibility (Inter-Assay); n = 13

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

Sample	Mean value [g/l]	CV [%]
Serum 1	3.82	12.7
Serum 2	1.85	11.6

Sample	Mean value [g/l]	CV [%]
Urine 1	156.94	5.0
Urine 2	82.97	4.5

Analytical sensitivity

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

Limit of blank, LoB

1.611 ng/ml

Accuracy - Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, α_2 -macroglobulin spikes with known concentrations were added to 2 serum and 2 urine samples. The results below were obtained without consideration of the sample dilution factor.

Urine sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
19.13	200	219.13	199.25	90.93
	100	119.13	118.39	99.38
	50	69.13	64.02	92.61
34.74	200	234.74	223.79	95.34
	100	134.74	118.59	88.02
	50	84.74	80.46	94.95

Serum sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
17.29	200	217.29	191.95	88.34
	100	117.29	107.00	91.23
	50	67.29	64.04	95.17
31.77	200	231.77	227.51	98.16
	100	131.77	123.34	93.61
	50	81.77	80.40	98.33

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

EP06-A with a serial dilution of a serum and a urine sample.

For α_2 -macroglobulin in serum and plasma, the method has been demonstrated to be linear from

16.13 to 297.07 ng/ml based on the standard curve without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
Urine	1:5	297.07	297.07	100.00
	1:10	148.53	162.45	109.37
	1:12.5	118.83	112.15	94.38
	1:20	74.27	83.58	112.55
	1:25	59.41	62.28	104.83
	1:40	37.13	42.54	114.57
	1:50	29.71	34.74	116.93
Serum	1:10 000	258.00	258.00	100.00
	1:20 000	129.00	133.00	103.10
	1:40 000	64.50	64.50	100.00
	1:80 000	32.25	31.13	96.51
	1:160 000	16.13	17.29	107.22

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 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 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 sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Sottrup-Jensen, L, T M Stepanik, T Kristensen, D M Wierzbicki, C M Jones, P B Lönblad, S Magnusson, and T E Petersen. 1984. "Primary Structure of Human Alpha 2-Macroglobulin. V. The Complete Structure." *The Journal of Biological Chemistry* **259** (13): 8318–27.
2. Steinhoff, J, U Bühner, R Preuss, and K Sack. 1994. "C-Reactive Protein and Alpha 2 Macroglobulin in Urine as Markers of Renal Transplant Rejection." *Transplantation Proceedings* **26** (3): 1768.
3. Steinhoff, J. 1995. "Differential Diagnosis of Rejection after Kidney Transplantation. Noninvasive Rapid Diagnosis by Determining Special Urinary Proteins." *Fortschritte der Medizin* **113** (35-36): 507–9.
4. Hoyer, J, R Preuss, R Riek, L Fricke, and J Steinhoff. 1995. "Quantitative Determination of Urine Proteins: A Rapid, Noninvasive, Sensitive, and Inexpensive Method to Monitor Renal Grafts." *Transplantation Proceedings* **27** (5): 2571–72.
5. Steinhoff, J, G Einecke, C Niederstadt, K de Groot, L Fricke, H Machnik, and K Sack. 1997. "Renal Graft Rejection or Urinary Tract Infection? The Value of Myeloperoxidase, C-Reactive Protein, and alpha2-Macroglobulin in the Urine." *Transplantation* **64** (3): 443–47.
6. Regeniter, Axel, Heike Freidank, Michael Dickenmann, Wolf H. Boesken, and Werner H. Siede. 2009. "Evaluation of Proteinuria and GFR to Diagnose and Classify Kidney Disease: Systematic Review and Proof of Concept." *European Journal of Internal Medicine* **20** (6): 556–61.

7. Rehman, Ahmed a., Haseeb Ahsan, and Fahim H. Khan. 2013. "Alpha-2-Macroglobulin: A Physiological Guardian." *Journal of Cellular Physiology* **228** (8): 1665–75.

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