

α_1 -Mikroglobulin ELISA

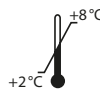
*Zur in-vitro-Bestimmung von α_1 -Mikroglobulin
in Serum, Plasma und Urin*

α_1 -microglobulin ELISA

*For the in vitro determination of α_1 -microglobulin
in serum, plasma and urine*

Gültig ab / Valid from 2019-01-03

REF K 6710



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	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Serum und Plasma</i>	4
<i>Urin</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	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
<i>Spezifität</i>	8
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	9
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von α_1 -Mikroglobulin aus Serum, Plasma und Urin geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

α_1 -Mikroglobulin tritt in Körperflüssigkeiten als Monomer von 31 kDa, aber auch als 90 kDa-Komponente in kovalenter Assoziation mit einer der beiden α -Ketten des monomeren Immunglobulins A auf. α_1 -Mikroglobulin wird in der Leber synthetisiert und gehört zu den Proteinen mit kleinem Molekulargewicht. Diese Proteine werden hauptsächlich in der Niere abgebaut und bei gesunden Menschen werden nur Spuren im Harn nachgewiesen.

Bei einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate liegt einer Erhöhung des α_1 -Mikroglobulins im Serum vor. Ist das Verhältnis der Summe der Albumin-IgGs und des α_1 -Mikroglobulins im Vergleich zum Gesamteiweiß im Urin gestört, deutet das auf eine prärenale Proteinurie hin.

Indikationen

- Frühdiagnostik entzündlicher Nierenerkrankungen
- akutes Nierenversagen
- renale parenchymatös bedingte und postrenale Proteinurien

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6710	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 6710	CONJ	Konjugatkonzentrat (Kaninchen-anti- α_1 -Mikroglobulin, peroxidase markiert)	1 x 400 μ l
K 6710	STD	Standards, lyophilisiert (0; 0,019; 0,055; 0,166; 0,5; 1,5 mg/l)	1 x 6 vials
K 6710	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 6710	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6710	NACL	0,9%ige NaCl-Lösung, 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 μ l
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)
- bei Bedarf 1 N NaOH-Lösung zur Lagerung von Urinproben
- bei Bedarf 1 % BSA in PBS zur Verdünnung von Urinproben

* 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 $> 0,2 \mu$ m) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,055 \mu$ 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 4 x 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 (100 ml WASH-

BUF + 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 **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 Kontrollen** (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 **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (200 µl CONJ + 20 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

Serum und Plasma

Frisch abgenommenes Plasma bzw. Serum kann 14 Tage bei 2–8 °C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:500** mit 0,9%iger NaCl-Lösung (NACL) verdünnt, z. B.

10 µl Probe + 990 µl NACL, gut mischen = **1:100 (Verdünnung I)**

100 µl Verdünnung I + 400 µl NACL, gut mischen = **1:5 (Verdünnung II)**. Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von 1:500.

Für eine Bestimmung in Doppelwerten werden **2 x je 10 µl** der Verdünnung II im Test eingesetzt.

Urin

Urin kann 14 Tage bei 2–8°C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20°C zu lagern. Urine sind zur Lagerung mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6 und 8 einzustellen.

Urine werden vor dem Einsatz im Test **1:20** mit 1 % BSA in PBS verdünnt, z. B.

50 µl Probe + **950 µl** 1 % BSA in PBS, gut mischen.

Für eine Bestimmung in Doppelwerten werden **2 x je 10 µl** der vorbereiteten Urinprobe im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung des α_1 -Mikroglobulins aus Plasma, Serum und Urin. In diesem ELISA wird α_1 -Mikroglobulin aus den Proben an die auf der Mikrotiterplatten fixierten Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen α_1 -Mikroglobulins erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines peroxidasemarkierten Antikörpers. Die Enzymmenge ist dem α_1 -Mikroglobulin-Gehalt direkt proportional. Als Substrat wird Tetramethylbenzidin eingesetzt. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die α_1 -Mikroglobulin-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.	200 μl 0,9%ige NaCl-Lösung (NACL) in jede Vertiefung pipettieren.
3.	10 μl Standards/Kontrollen/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.

Serum- und Plasmaproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 500** 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.

Urin

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 20** 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, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, können stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

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

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden wurden folgende Referenzwerte ermittelt.

Seren oder Plasmen: < 60 mg/l

Urine: < 12 mg/l

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Inter-Assay (n = 17)

Probe	α_1 -Mikroglobulin [mg/l]	VK [%]
1	0,262	8,96

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 3 \text{ SD}$. Gemessen wurde 10-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,006 mg/l.

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu MPO und Calprotectin gefunden.

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 Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- 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 den 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 im 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 Pipettiervolumina 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:

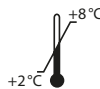
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

α_1 -microglobulin ELISA

*For the in vitro determination of α_1 -microglobulin
in serum, plasma and urine*

Valid from 2019-01-03

REF K 6710



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	13
2. INTRODUCTION	13
3. MATERIAL SUPPLIED	13
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	14
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	14
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	15
<i>Plasma and serum</i>	15
<i>Urine</i>	15
7. ASSAY PROCEDURE	16
<i>Principle of the test</i>	16
<i>Test procedure</i>	16
8. RESULTS	17
9. LIMITATIONS	18
10. QUALITY CONTROL	18
<i>Reference range</i>	18
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	19
<i>Precision and reproducibility</i>	19
<i>Analytical Sensitivity</i>	19
<i>Specificity</i>	19
12. PRECAUTIONS	19
13. TECHNICAL HINTS	19
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	20

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of α_1 -microglobulin in serum, plasma and urine. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

α_1 -microglobulin, a glycoprotein heterogeneous in charge, was reported to occur both as a monomer of 31 kDa as well as a polymer of 90 kDa formed by a covalent binding with one of two alpha chains of the monomeric immunoglobulin A.

α_1 -microglobulin is a protein with a small molecular weight produced in the liver. In healthy persons it is metabolised in the kidneys and only minor amounts can be detected in the urine.

Increased α_1 -microglobulin concentration in serum is detected when the glomerular filtration rate is limited. In addition, when the ratio of total protein to the sum of albumin and α_1 -microglobulin is disordered, a prerenal proteinuria should be suspected.

Indications

- Early diagnosis of inflammatory renal diseases
- Acute renal failure
- Renal and post renal proteinuria

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6710	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 6710	CONJ	Conjugate concentrate (rabbit-anti- α_1 -microglobulin, peroxidase-labelled)	1 x 400 μ l
K 6710	STD	Standards, lyophilised (0, 0.019, 0.055, 0.166, 0.5, 1.5 mg/l)	2 x 6 vials
K 6710	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	1 x 1 vial
K 6710	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	1 x 1 vial
K 6710	NACL	0.9% NaCl-solution, ready-to-use	2 x 100 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 μ l single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)
- 1 N NaOH-solution for storage of urine samples, if necessary
- 1 % BSA in PBS for dilution of urine samples, if necessary

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

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- 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. 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 **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **250 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 until the expiry date stated on the label. Avoid repeated thawing and freezing.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (200 µl CONJ + 20 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the 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

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

Plasma or serum samples must be diluted **1:500** with 0.9% NaCl-solution (NACL) before performing the assay, e.g.

10 µl sample + 990 µl NACL, mix well = 1:100 (dilution I)

100 µl dilution I + 400 µl NACL, mix well = 1:5 (dilution II)

For testing in duplicates, pipette **2 x 10 µl** of each dilution II per well.

Urine

Urine should be adjusted to a pH of 6 to 8 with 1 N NaOH. Adjusted samples can be stored at 2–8 °C for 14 days. For longer storage, non-treated samples should be frozen at -20 °C.

Dilute all urine samples **1:20** with 1 % BSA in PBS, e.g.

50 µl urine + 950 µl 1 % BSA in PBS, mix well.

For testing in duplicates, pipette **2 x 10 µl** of each dilution per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of α_1 -microglobulin in serum, plasma and urine. The α_1 -microglobulin in the samples is bound to an excess of polyclonal rabbit anti- α_1 -microglobulin antibodies immobilised to the surface of the microtitre plate. After a washing step to remove all foreign substances, the quantification of the bound α_1 -microglobulin is carried out by adding a peroxidase labelled antibody, which also binds to the α_1 -microglobulin. The amount of converted peroxidase substrate is directly proportional to the amount of bound α_1 -microglobulin. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. α_1 -microglobulin, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

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

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

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

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

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	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 solution (NaCl) into each well.
3.	Add each 10 µl standards/controls/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.

Serum and plasma

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 500** to get the actual concentrations.

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

Urine

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 20** to get the actual concentrations.

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

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard can be further diluted and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

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

Based on Immundiagnostik AG in-house studies of samples of apparently healthy persons, the following mean values were estimated.

Plasma or serum: < 60 mg/l

Urine: < 12 mg/l

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Inter-Assay (n = 17)

Sample	α_1 -microglobulin [mg/l]	CV [%]
1	0.262	8.96

Analytical Sensitivity

The zero standard was measured 10 times. The detection limit was set as $B_0 + 3 \text{ SD}$ and estimated to be 0.006 mg/l.

Specificity

No cross reactivity to MPO and calprotectin was observed.

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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS












- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.

- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent 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		