

# $\alpha_1$ -Mikroglobulin ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung des  $\alpha_1$ -Mikroglobulin in Serum, Plasma und Urin

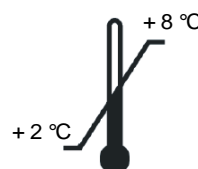
# $\alpha_1$ -Microglobulin ELISA Kit

For the in vitro determination of  $\alpha_1$ -Microglobulin in serum, plasma and urine

Gültig ab / Valid from 29.10.2013



K 6710



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of contents	2
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>3</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>4</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>4</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>6</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>6</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
HINWEISE	6
PIPETTIERSHEMA	7
<b>10. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
MUSTEREICHKURVE	8
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>9</b>
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	9
SENSITIVITÄT	9
KREUZREAKTIVITÄT	9
<b>12. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>9</b>
<b>13. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>10</b>
ERWARTETE ERGEBNISSE	10
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>10</b>

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>13</b>
<b>2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST</b>	<b>13</b>
<b>3. TEST PRINCIPLE</b>	<b>13</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>14</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>14</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>15</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>15</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>16</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>16</b>
PROCEDURAL NOTES	16
TEST PROCEDURE	17
<b>10. RESULTS</b>	<b>18</b>
TYPICAL CALIBRATION CURVE	18
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>19</b>
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	19
SENSITIVITY	19
CROSS REACTIVITY	19
<b>12. LIMITATIONS</b>	<b>19</b>
<b>13. QUALITY CONTROL</b>	<b>20</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>20</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von  **$\alpha$ -1-Mikroglobulin** aus Serum, Plasma und Urin. Nur zur in vitro Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

**Alpha-1-Mikroglobulin** tritt in Körperflüssigkeiten als Monomer von 31 kDa , aber auch als 90 kDa-Komponente in kovalenter Assoziation mit einer der beiden  $\alpha$ -Ketten der monomeren Immunglobulins A auf. **Alpha-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 **Alpha-1-Mikroglobulins** im Serum vor. Ist das Verhältnis der Summe der Albumin-IgGs und des Alpha-1-Mikroglobulins im Vergleich zum Gesamteiweiß im Urin gestört, deutet das auf eine prärenale Proteinurie hin.

### Indikation

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

## 3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des **Alpha-1-Mikroglobulins ( $\alpha$ -1-M)** aus Plasma, Serum und Urin. In diesem ELISA wird  $\alpha$ -1-M aus den Proben an die auf der Mikrotiterplatten fixierten Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen  **$\alpha$ -1-M** erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines Peroxidase-markierten Antikörpers. Die Enzymmenge ist direkt proportional dem  **$\alpha$ -1-M** Gehalt. Als Substrat wird TMB eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm bzw. 405 nm gemessen werden.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6710MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 6710WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 6710K	CONJ	Konjugat (Kaninchen-anti $\alpha$ -1-Mikroglobulin; POD-markiert)	1 x 400 $\mu$ l
K 6710ST	STD	Standards, lyophilisiert (0; 0.019; 0.055; 0.166; 0.5; 1.5 mg/l)	6 x 250 $\mu$ l
K 6710KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	1 x 250 $\mu$ l
K 6710KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	1 x 250 $\mu$ l
K 6710NaCl	NACL	0.9 % ige NaCl-Lösung, gebrauchsfertig	200 ml
K 6710TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 6710AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

#### 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000  $\mu$ l
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler mit Inkubator für 37 °C
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm  
(Referenzfilter 620 oder 690 nm)

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Beim Mehrfachansatz der Platte ist bitte darauf zu achten, daß die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert werden und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden** (z.B. Peroxidase-markierter Antikörper ist in der größten Verdünnungsstufe nicht haltbar). Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen (innerhalb des angegebenen Verfallsdatums) verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100  $\mu$ l** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muß vor Gebrauch **1:10** in aqua dest. verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua dest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei 37° C im Wasserbad auf. Das **Pufferkonzentrat** (WASHBUF) kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C 1 Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) werden mit **250  $\mu$ l** aqua dest. rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards und Kontrollen können bei -20°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum gelagert werden, wobei wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden ist.
- Das **CONJ** (Konjugat , POD-markierter AK) wird **1:100** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 200  $\mu$ l Konjugat + 20 ml Waschpuffer). Das **CONJ** (Konjugat) ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Konjugatlösung kann nicht aufbewahrt werden**.

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter  $H_2SO_4$ .  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. PROBENVORBEREITUNG

### Serum- und Plasmaproben

Plasma bzw. Serum ist 14 Tage bei 2-8°C stabil; ansonsten bei -20°C lagern. Plasma oder Serum ist **1:500 in NAACL** (0,9% NaCl) vorzuverdünnen (10  $\mu$ l Probe + 990  $\mu$ l 0,9% NaCl = 1:100 Verdünnung; danach 100  $\mu$ l dieser 1:100 Verdünnung + 400  $\mu$ l 0,9% NaCl).

### Urin

Die Proben sind 14 Tage bei 2-8°C stabil, ansonsten bei -20°C lagern. Urine sind zur Lagerung mit 1 N NaOH auf einen pH Wert zwischen 6 und 8 einzustellen. Urin ist **1:20 mit 1% BSA in PBS** vorzuverdünnen (50  $\mu$ l Probe + 950  $\mu$ l 1% BSA in PBS).

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumen sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer, nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

## Pipettierschema

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

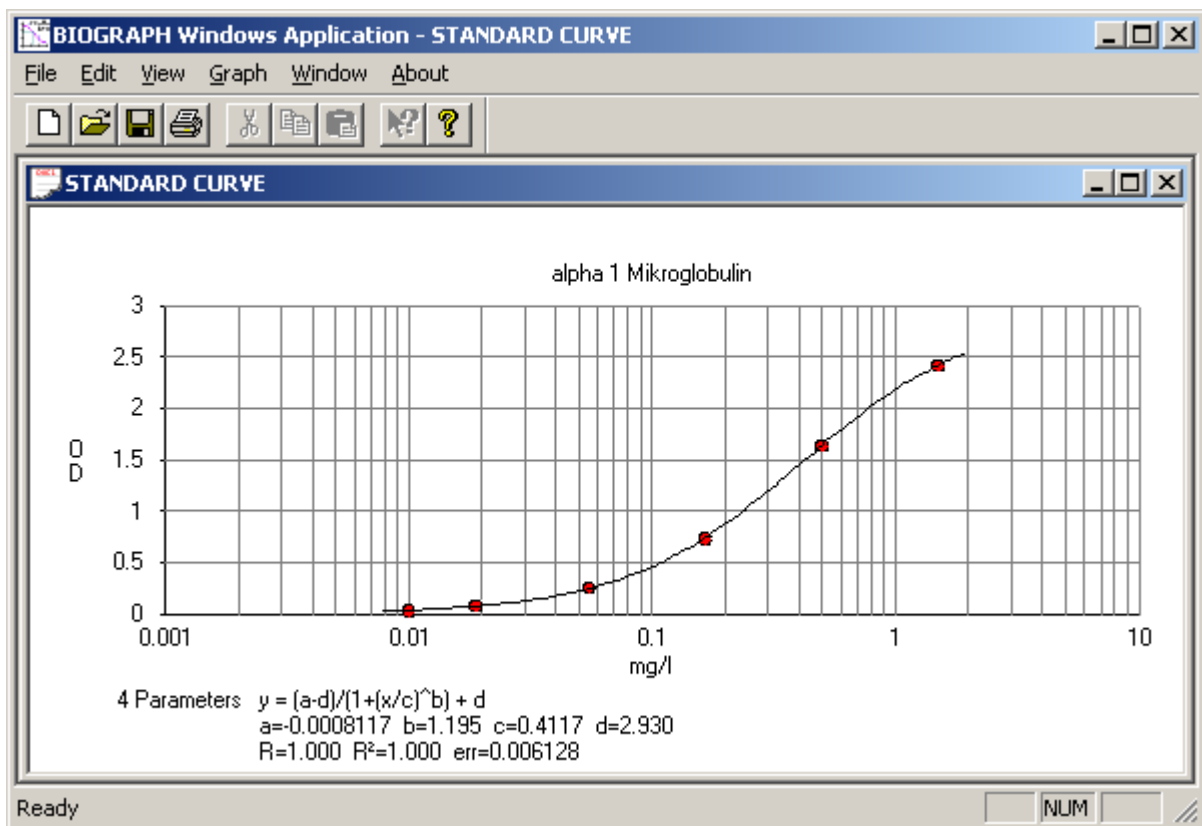
1. Die **PLATE** (Platte) **5 x mit je 250  $\mu$ l** Waschpuffer waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
2. **200  $\mu$ l NACL** (0.9% NaCl) pro Vertiefung pipettieren.
3. **10  $\mu$ l STD** (Standard), **CTRL** (Kontrollen) und **Patientenproben** pro Vertiefung in Doppelbestimmungen pipettieren.
4. Streifen abdecken und **1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln** oder, falls keine Schüttelvorrichtung vorhanden ist, **2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) ohne Schütteln** inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells verwerfen **5 x mit je 250  $\mu$ l** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
6. **200  $\mu$ l verdünntes Konjugat** pro Vertiefung pipettieren.
7. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
8. Den Inhalt der Wells verwerfen und **5 x mit je 250  $\mu$ l** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
9. **200  $\mu$ l SUB** (TMB-Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
10. **10-20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis eine ausreichend große Farbdifferenz auftritt.
11. **50  $\mu$ l STOP** (Stopplösung) in jede Vertiefung pipettieren.
12. Die Extinktion wird **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) gemessen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Meßbereich des Photometers übersteigen, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.



## 10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

### Mustereichkurve



<b>Konzentration [mg/l]</b>	0	0.019	0.055	0.166	0.5	1.5
<b>OD Mittelwert</b>	0.025	0.076	0.250	0.732	1.638	2.414

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Assays verwendet werden.

## Serumproben

Die ermittelte  $\alpha$ -1-Mikroglobulin-Konzentration in Serum und Plasma wird mit **500** multipliziert um die Konzentration der Proben zu bestimmen.

## Urin

Die ermittelte  $\alpha$ -1-Mikroglobulin-Konzentration in Urin wird mit **20** multipliziert um die Konzentration der Proben zu bestimmen.

# 11. TESTCHARAKTERISTIKA

## Präzision und Reproduzierbarkeit

Inter-Assay (n=17)		
Probe	$\alpha$ -1-Mikroglobulin Mittelwert [mg/l]	VK [%]
1	0.262	8.96

## Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 + 3 \text{ SD}$  (Standardabweichung) und ermittelt als 0.006 mg/l. Der Null-Standard wurde 10 mal vermessen.

Probe	$\alpha$ -1-Mikroglobulin Mittelwert [OD]	Standardabweichung	Nachweisgrenze [mg/l]
1	0,0023	0,002	0,006

## Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu MPO und Calprotectin gefunden.

# 12. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer  **$\alpha$ -1-Mikroglobulin** Konzentration größer dem größten Standard sollten mit dem entsprechenden Verdünnungsmedium verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

### 13. QUALITÄTSKONTROLLE

Für die Qualitätskontrolle empfehlen wir die Verwendung unabhängiger externer Kontrollen.

#### Erwartete Ergebnisse

##### Referenzwerte

Seren oder Plasmen: < 60 mg/l

Urine: < 12 mg/l

### 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.

- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik 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 zurück zu senden.

**Verwendete Symbole:**

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

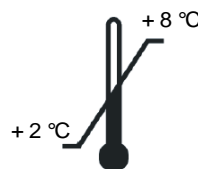
# $\alpha_1$ -Microglobulin ELISA Kit

For the in vitro determination of  $\alpha_1$ -Microglobulin in serum,  
plasma and urine

Valid from 29.10.2013



K 6710



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## 1. INTENDED USE

The Immundiagnostik Assay is intended for the quantitative determination of  $\alpha_1$ -Microglobulin in serum, plasma and urine. For in vitro diagnostic use only.

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

**Alpha 1 Microglobulin**, a glycoprotein heterogeneous in charge, was reported to occur both as a monomer of 31kDa as well as a polymer of 90kDa formed by a covalent binding with one of two alpha chains of the monomeric Immunoglobulin A.

**Alpha-1-Mikroglobulin** is a protein with a small molecular weight produced in the liver. In healthy persons it is metabolized in the kidneys and only minor amounts can be detected in the urine.

Increased **Alpha-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 **a1-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. TEST PRINCIPLE

This Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) allows the quantitative determination of human  $\alpha_1$ -Microglobulin from plasma, serum and urine.

The  $\alpha_1$ -Microglobulin in the samples is bound to an excess of polyclonal rabbit anti- $\alpha_1$ -Microglobulin antibodies immobilized to the surface of the microtitre plate.

After a washing step to remove all foreign substances, the quantification of the bound  $\alpha_1$ -Microglobulin is carried out by adding a peroxidase labeled antibody, which also binds to the  $\alpha_1$ -Microglobulin. The amount of converted peroxidase substrate is directly proportional to the amount of bound  $\alpha_1$ -Microglobulin and can be determined photometrically at 450 nm or at 405 nm if the extinction is out of range.

**4. MATERIAL SUPPLIED**

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 6710MTP	PLATE	one holder with strips, break apart	96
K 6710WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate (10x)	1 x 100 ml
K 6710K	CONJ	Conjugate (rabbit-anti- $\alpha_1$ microglobulin)	1 x 400 $\mu$ l
K 6710ST	STD	Calibrators, (0, 0.019, 0.055, 0.166, 0.5, 1.5 mg/l)	6 x 250 $\mu$ l
K 6710KO1	CTRL	Control, lyophilized	1 x 250 $\mu$ l
K 6710KO2	CTRL	Control, lyophilized	1 x 250 $\mu$ l
K 6710NaCl	NACL	0.9 % NaCl-solution, ready-to-use	200 ml
K 6710TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml
K 6710AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

**5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED**

- Bidistilled (aqua bidest.) and sterile water
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 5-1000  $\mu$ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 nm  
(reference wave length 620 or 690 nm)

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100  $\mu$ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua dest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua dest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature at 37°C using a water bath **before dilution of the buffer solutions.** The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- The **STD** (Calibrators) and the **CTRL** (controls) must be reconstituted with **250  $\mu$ l** aqua dest. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted calibrators and controls can be stored at – 20 °C until the expiry date given on the label. Repeated thawing and freezing should be avoided.
- The **CONJ** (conjugate, POD-Antibody) must be diluted **1:100** in ELISA wash buffer (e.g. 200  $\mu$ l CONJ + 20 ml wash buffer). The antibody is stable at 2 -8 °C until expiry date given on the label. **Diluted antibody is not stable and could not be stored.**

## 7. PRECAUTIONS

- 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.



- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### Plasma or serum

Samples can be stored for two weeks at 4°C. They should be frozen when stored longer.

Dilute all plasma and serum samples **1:500 with NAACL (0.9% NaCl)** (e.g. 10  $\mu$ l sample + 990  $\mu$ l 0.9% NaCl = 1:100 dilution; and then 100  $\mu$ l from the 1:100 dilution + 400  $\mu$ l 0.9% NaCl).

### 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  $\mu$ l urine + 950  $\mu$ l 1% BSA in PBS).

## 9. ASSAY PROCEDURE

### Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.
- 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 wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

## Test procedure

Carry out the tests in duplicate in the supplied microtitre plate.

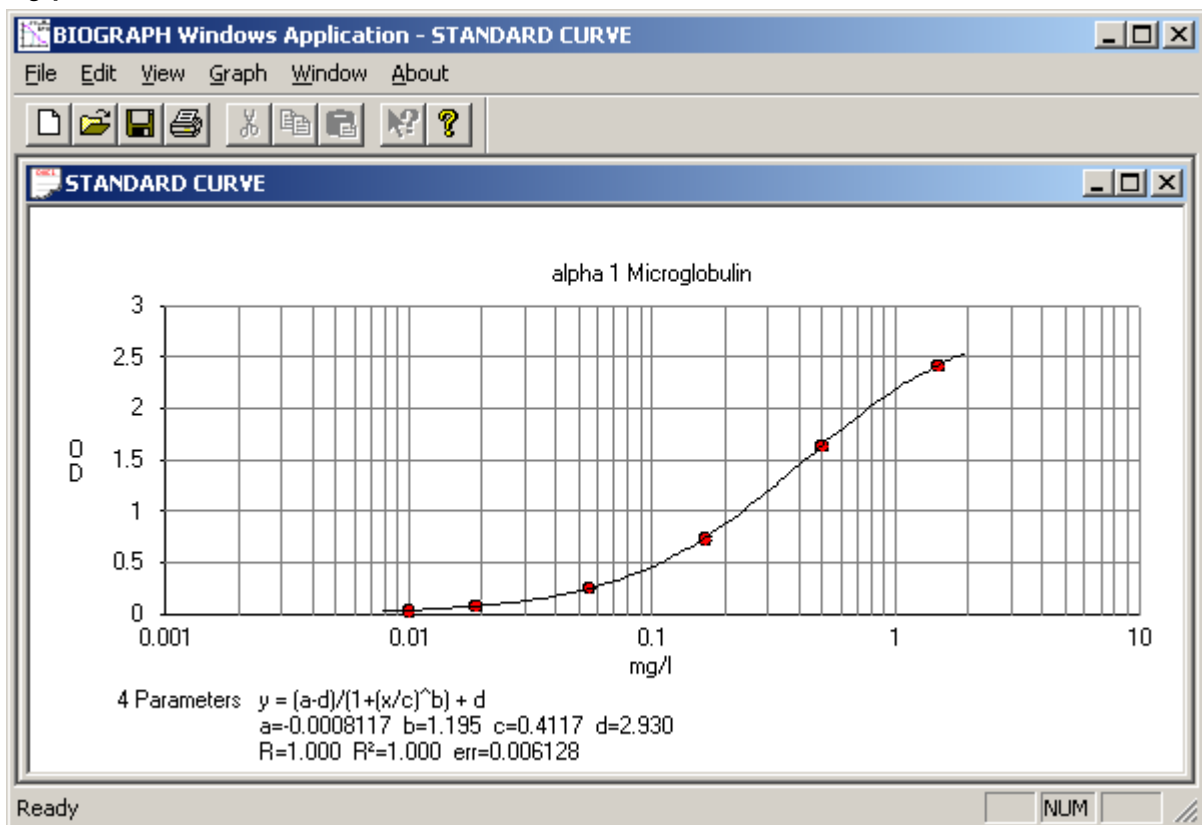
1. Wash the cavities **5 x with 250  $\mu$ l** of washing buffer.
2. Add **200  $\mu$ l of NACL** (0.9% NaCl solution).
3. Add **10  $\mu$ l** of **STD** (standard), **CTRL** (controls) and **patient sample** into each well in duplicate.
4. Cover the plate tightly and incubate for **1 hour at room temperature (18-26°C) shaking** on a horizontal mixer or for **2 hours at room temperature (18-26°C) without any shaking**.
5. Decant the contents of the wells and wash the cavities **5x with 250  $\mu$ l** of washing buffer.
6. Add **200  $\mu$ l pre-diluted conjugate**.
7. Incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature.
8. Decant the contents of the wells and wash the cavities **5x with 250  $\mu$ l** of washing buffer.
9. Add **200  $\mu$ l SUB** (TMB-substrate solution).
10. Incubate for **10 - 20 minutes** at room temperature until colour differences are sufficient.
11. Add **50  $\mu$ l of STOP** (stop solution) and mix shortly.
12. Determine **immediately** absorption with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as reference.

## 10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the standards. Commercially available software can be used as well as graph paper. Results of the samples are read from this calibration curve.

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a spline- or 4PL algorithm is recommended.

### Typical calibration curve



<b>Concentration [mg/l]</b>	0	0.019	0.055	0.166	0.5	1.5
<b>OD mean value</b>	0.025	0.076	0.250	0.732	1.638	2.414

The data is for demonstration only and cannot be used for the evaluation of test results.

**Serum, Plasma**

The result must be multiplied by **500** to calculate the concentration of the sample.

**Urine**

The result must be multiplied by **20** to calculate the concentration of the sample.

**11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

## Precision and reproducibility

Inter-Assay (n=17)		
Sample	$\alpha$ -1-Microglobulin Mean value [mg/l]	VC [%]
1	0.262	8.96

## Sensitivity

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

Sample	$\alpha$ -1-Microglobulin Mean value [OD]	Standard deviation	Detection limit [mg/l]
1	0,0023	0,002	0,006

## Cross reactivity

No cross reactivity with MPO and calprotectin was observed.

**12. LIMITATIONS**

Samples with alpha-1-Microglobulin levels greater than the highest calibrator should be further diluted and re-assayed.

## 13. QUALITY CONTROL

The use of independent external controls is recommended for quality control purposes.

### Reference values

Plasma or serum: < 60 mg/l

Urine: < 12 mg/l

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

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- 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 color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- All reagents in the kit package are for in-vitro diagnostics only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

**Used symbols:**

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for &lt;n&gt; tests



Manufacturer



Use by



Lot number