

Immunglobulin G ELISA Kit

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

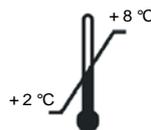
Immunoglobulin G ELISA Kit

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

Gültig ab/valid from 07.02.2013



K 6510A



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

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

1. INTENDED USE	14
3. MATERIAL SUPPLIED	14
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	15
6. PRECAUTIONS	16
7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	16
8. ASSAY PROCEDURE	17
PROCEDURAL NOTES	17
TEST PROCEDURE	17
9. RESULTS	18
10. LIMITATIONS	19
11. QUALITY CONTROL	19
EXPECTED VALUES	19
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	19
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	19
DETECTION LIMIT	20
RECOVERY	21
LINEARITY	22
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	22

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. TESTPRINZIP

Der vorliegende Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Erfassung des humanen Immunglobulin G (IgG) aus Plasma, Serum und Urin.

Das IgG aus den Proben wird in einem einstündigen Inkubationsschritt mit Hilfe der im Überschuss an die Mikrotiterplatten immobilisierten polyklonalen Kaninchen-anti IgG gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen IgG erfolgt nach einem Waschschrift zur Beseitigung aller Fremdstoffen durch Zugabe eines Peroxidase-markierten Antikörpers, der sich ebenfalls an das IgG bindet. Die Substratumsetzung ist direkt proportional zum gebundenen IgG und kann photometrisch bei 450 nm ausgewertet werden.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6510AMTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 6510AWP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6510AK	CONJ	Konjugat (Kaninchen anti Immunglobulin G, Peroxidase-markiert)	1 x 200 µl
K6510AKV	CONJBUF	Konjugatverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
K 6510AST	STD	Standards, lyophilisiert	2 x 5 vials
K 6510AKO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 6510AKO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 6510AVP	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 6510ATMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6510AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 5 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

*Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit < 0,055 µS/cm bei 25°C (≥18,2 MΩ cm).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Konzentrationen der Standards und Kontrollen und Rekonstitutionsvolumina sind den beiliegenden Datenblättern zu entnehmen. Rekonstituierte Standards und Kontrollen können 1 Woche bei 4°C oder 4 Wochen bei -20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

- Das **CONJ** (Konjugat, Peroxidase-markiert) wird **1:101** in **CONJBUF** (Konjugatverdünnungspuffer) (100 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Das **unverdünnte CONJ** ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Die verdünnte Konjugatlösung kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle Testreagenzien sind bei 2-8°C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen die Kitkomponenten immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid. Natriumazid ist giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H₂SO₄ verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

7. PROBENVORBEREITUNG

Serum und Plasma

Plasma oder **Serum**: Bei 2-8 °C sind die Proben bis zu 2 Wochen stabil, bei längerer Lagerung sollten Sie eingefroren werden.

Alle Plasmen und Seren sind **1:200000** mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) zu verdünnen.

Wir empfehlen eine Verdünnung in drei Schritten.

Zum Beispiel:

1. **990 µl** SAMPLEBUF + **10 µl** Probe (**1:100**), gut mischen
2. **990 µl** SAMPLEBUF + **10 µl** der 1. Verdünnung (**1:10000**), gut mischen
3. **950 µl** SAMPLEBUF + **50 µl** der 2. Verdünnung (**1:200000**), gut mischen

Urin

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

Urinproben werden vor der Messung **1:25** mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) verdünnt (960 µl SAMPLEBUF und 40µl Probe).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- 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.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettierolumina 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 vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch **5x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl STD** (Standards), **CTRL** (Kontrollen) und **Patientenproben** (Plasma, Serum oder Urin verdünnt, siehe oben) zugeben.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur (18-26°C) auf Horizontalmischer unter Schütteln inkubieren.
3. Inhalt der Platte verwerfen und die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.
4. **100 µl CONJ** (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.

5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur (18-26°C) auf Horizontalmischer unter Schütteln inkubieren.
6. Inhalt der Platte verwerfen, und die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.
7. **100 µl SUB** (TMB-Substratlösung) pro Vertiefung pipettieren.
8. **10-20 min.** bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren bis ausreichend große Farbdifferenzen eingetreten sind.
9. **100 µl STOP** (Stopplösung) pro Vertiefung pipettieren.
10. 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.

9. 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. 0.01).

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 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. 0.01).

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 ermittelte Serumkonzentration wird mit **200.000** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

Urin

Die ermittelte Urinkonzentration wird mit **25** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

10. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer IgG Konzentration größer als der höchste Standard sollten mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

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 Proben nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Normbereich

Plasma oder Serum: 8-18 g/L

24-Stunden-Urin: 0.5-3.2 mg/24 Std

Spontanurin: < 10 mg IgG/g Kreatinin im Urin

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

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay

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

Intra-Assay Vk n= 20

Urin

Probe	Mittelwert [mg/L]	Vk [%]
1	4.18	3.94
2	1.94	4.13

Plasma

Probe	Mittelwert [g/L]	Vk [%]
1	26.7	4.57
2	11.3	2.67

Inter-Assay

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

Inter-Assay Vk n= 12

Plasma

Probe	Mittelwert [g/L]	Vk [%]
1	14.00	6.48
2	17.94	3.85

Nachweisgrenze

Die berechnete Nachweisgrenze (LoB; Limit of Blank) wurde festgelegt als $B_0 + 1.645 \cdot SD$. Gemessen wurde 84 mal der Standard 1 (Leerwert).

LoB = 1.9 ng/ml

Die Nachweisgrenze wurde ermittelt in Bezug auf die Konzentration der Kalibrationskurve ohne Berücksichtigung des Probenverdünnungsfaktors.

Wiederfindung

Zwei Immunglobulin G-haltige Plasmaproben wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Immunglobulin G versetzt und gemessen.

Wiederfindung n=5

Probe 1	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
15.2	250.0	265.2	284.7
15.2	125.0	140.2	119.6
15.2	62.5	77.7	69.9
15.2	31.3	46.5	49.5
15.2	15.6	30.8	31.0
Probe 2	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
22.0	250.0	272.0	258.9
22.0	125.0	147.0	124.5
22.0	62.5	84.5	80.3
22.0	31.3	53.3	48.4
22.0	15.6	37.6	39.0

Linearität

Zwei Plasmaproben wurden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und gemessen.

Plasma

Probe	Verdünnung	Erwartet [g/L]	Gemessen [g/L]
A	1:100000	32,4	32,4
	1:200000	16,2	15,8
	1:400000	8,1	8,0
B	1:100000	17,1	17,1
	1:200000	8,6	9,6
	1:400000	4,3	5,5

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- 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. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet 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 abgestimmte 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

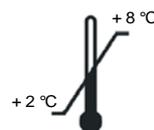
Immunglobulin G ELISA Kit

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

Valid from 07.02.2013



K6510A



1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik Assay* is intended for the quantitative determination of **Immunoglobulin G (IgG)** in plasma, serum and urine. For *in vitro* diagnostic use only.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

In a first incubation step, the Immunoglobulin G in the samples is bound to polyclonal rabbit antibodies (in excess) immobilized to the surface of the microtitre wells. After removal of all unbound substances, a Peroxidase-labeled anti Immunoglobulin G antibody is added. The second washing step is followed by incubation with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). The reaction is terminated by an acidic stop solution converting the color from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of Immunoglobulin G 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. Immunoglobulin G in the patient samples is determined directly from this curve.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K6510AMTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8
K6510AWB	WASHBUF	ELISA wash concentrate, 10x	2 x 100 ml
K6510AK	CONJ	Conjugate, (rabbit-anti-IgG, Peroxidase-labeled)	1 x 200 µl
K6510AKV	CONJBUF	Conjugate dilution buffer, ready-to-use	1 x 22 ml
K6510AST	STD	Calibrators, lyophilized	2 x 5 vials
K6510AKO1	CTRL	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K6510AKO2	CTRL	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K6510APV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer ready-to-use	2 x 100 ml
K6510ATMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine) ready-to-use	1 x 15 ml
K6510AAC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 10-1000 µl
- Covering foil for the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker with
- 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 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

*Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity < 0.055 µS/cm at 25°C (≥18.2 MΩ cm).

5. 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 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals can occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution. The **WASHBUF** 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 lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (controls) are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Standards and controls have to be reconstituted with **ultra pure water** (for standard and control concentrations as well as volume of ultra pure water, see product specification). Reconstituted calibrators and controls can be stored for one week at 4°C or for four weeks at -20°C. Repeated thawing and freezing should be avoided.

- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1: 101** in **CONJBUF** (Conjugate dilution buffer) (100 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The undiluted **CONJ** (conjugate) is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready for use. The test reagents are stable up to the date of expiry (see label of test package) when stored at 2–8°C.

6. 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.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- 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.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma or serum

Samples can be stored for two weeks at 2-8°C. For longer storage, samples should be frozen at –20°C.

Dilute all plasma and serum samples **1:200000** with SAMPLEBUF (sample dilution buffer)

Dilution in three steps is recommended.

For example:

1. **990 µl** SAMPLEBUF + **10 µl** sample (**1:100**), mix well
2. **990 µl** SAMPLEBUF + **10 µl** of 1. dilution (**1:10000**), mix well
3. **950 µl** SAMPLEBUF + **50 µl** of 2. dilution (**1:200000**), mix well

Urine

Adjust the urine to a pH of 6 to 8 with 1 N NaOH and store samples at 2-8°C until testing. For longer storage, samples should be frozen at –20°C. Urine must be diluted **1:25** with SAMPLEBUF (sample dilution buffer) (960 µl SAMPLEBUF + 40 µl sample).

8. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not mix different lot numbers of any kit component. Furthermore, do not assemble cavities of different microplates for analyses, even if the microplates are of the same charge.
- Quality control guidelines 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 wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Wash the pre-coated microtiter plate **5 x with 250 µl ELISA wash buffer**. Carry out the tests in duplicate. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess liquid.

1. Add **100 µl STD** (standard) **CTRL** (control) and **patient samples** (urine, plasma and serum diluted, see above).
2. Incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature (18-26°C).
3. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl ELISA wash buffer**. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess liquid.
4. Add **100 µl** of diluted **CONJ** (conjugate).
5. Incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature (18-26°C).

6. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess liquid.
7. Add **100 µl** of **SUB** (TMB substrate solution).
8. Incubate for **10-20 minutes** at room temperature (18-26°C).
9. Add **100 µl** of **STOP** (stop solution) and mix shortly.
10. Determine 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.

9. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Serum/Plasma

The result must be multiplied by **200000** to calculate the serum value.

Urine

The result must be multiplied by **25** to obtain the IgG concentration in urine.

10. LIMITATIONS

Samples with IgG concentration greater than the highest standard value should be further diluted with sample dilution buffer and re-assayed.

11. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed 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.

Expected values

Normal range

Plasma or serum: **8-18 g/L**

24-hours urine: **0.5 – 3.2 mg/24 hours**

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

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

It is recommended that each laboratory should establish its own normal range. Above mentioned values are only for orientation and may vary from other published data.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay

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

Intra-Assay CV n= 20

Urine

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

Plasma

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

Inter-Assay

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

Inter-Assay CV n= 12

Plasma

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

Detection limit

The calculated detection limit (LoB; Limit of Blank) was set as $B_0 + 1.645 \cdot SD$. Standard 1 (blank) was measured 84 times.

LoB = 1.9 ng/ml

The detection limit was estimated based on the concentration from the calibration curve without considering the sample dilution factor.

Recovery

Two Immunglobulin G-containing plasma samples were spiked with different Immunglobulin G-concentrations and measured.

Recovery n=5

Sample 1	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
15.2	250.0	265.2	284.7
15.2	125.0	140.2	119.6
15.2	62.5	77.7	69.9
15.2	31.3	46.5	49.5
15.2	15.6	30.8	31.0
Sample 2	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
22.0	250.0	272.0	258.9
22.0	125.0	147.0	124.5
22.0	62.5	84.5	80.3
22.0	31.3	53.3	48.4
22.0	15.6	37.6	39.0

Linearity

Two plasma samples were diluted with sample dilution buffer and measured with the assay.

Plasma

Sample	Dilution	Expected [g/L]	Measured [g/L]
A	1:100000	32.4	32.4
	1:200000	16.2	15.8
	1:400000	8.1	8.0
B	1:100000	17.1	17.1
	1:200000	8.6	9.6
	1:400000	4.3	5.5

13. 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.
- All reagents in the test 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. Furthermore we recommend not to assemble wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- 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.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number