

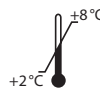
α_2 -Makroglobulin ELISA

*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 2015-07-28

REF K 6610A



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	12
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 6610A	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 6610A	CONJ	Konjugatkonzentrat, (Kaninchen anti α_2 -Makroglobulin, peroxidase markiert)	1 x 200 μ l
K 6610A	STD	Standards, lyophilisiert	2 x 6 vials
K 6610A	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 6610A	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 6610A	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 6610A	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6610A	STOP	ELISA-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 μ m) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 μ S/cm bei 25 °C (\geq 18,2 M Ω cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits 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 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 μ l** sollten vor Gebrauch kurz zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Der **WASH-BUF** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **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**.
- **Die lyophilisierten STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards und Kontrollen werden mit **500 μ l Reinstwasser** rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen** können **4 Wochen** bei **-20°C** gelagert und nach dem **Auftauen einmal** wieder verwendet werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Plasma und Serum

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

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

50 μ l Serum/Plasma + 950 μ l SAMPLEBUF, gut mischen (**1:20**)

20 μ l der 1:20 Verdünnung + 980 μ l SAMPLEBUF, gut mischen (**1:1000**)

20 μ l der 1:1000 Verdünnung + 980 μ l SAMPLEBUF, gut mischen (**1:50 000**)

100 μ l der letzten **Verdünnung** werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

Urin

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

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

100 μ l 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 STD/SAMPLE/CTRL (Standards/Proben/Kontrollen) im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt 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.	Mikrotiterplatte 5 x mit je 250 μl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 μl STD/CTRL/SAMPLE in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren, falls keine Schüttelvorrichtung vorhanden ist, 2 Stunden bei Raumtemperatur (15–30 °C) ohne 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 alle Vertiefungen 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 SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	10–20 min* bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 μl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen 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.
-----	--

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbschlag 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 ermittelte α_2 -Makroglobulin-Konzentration wird mit dem Verdünnungsfaktor **50 000** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Urinproben

Die ermittelte α_2 -Makroglobulin-Konzentration wird mit dem Verdünnungsfaktor **5** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

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) müssen 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*

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik 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: 1,3–3,0 g/l

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

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay Urin (n = 20)

Probe	α_2 -Makroglobulin [ng/ml]	VK [%]
1	163,98	2,53
2	84,17	3,27

Intra-Assay Serum (n = 20)

Probe	α_2 -Makroglobulin [ng/ml]	VK [%]
1	3,92	2,61
2	2,18	6,37

Inter-Assay Urin (n = 10)

Probe	α_2 -Makroglobulin [ng/ml]	VK [%]
1	153,46	3,67
2	83,65	3,43

Inter-Assay Serum (n = 10)

Probe	α_2 -Makroglobulin [ng/ml]	VK [%]
1	4,01	3,31
2	2,00	3,99

Spike-Wiederfindung

Zwei Urin bzw. Serumproben wurden mit unterschiedlichen α_2 -Makroglobulinmengen versetzt und gemessen ($n = 2$).

Urin

Probe	Ungespikte Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	α_2 -Makroglobulin erwartet [ng/ml]	α_2 -Makroglobulin gemessen [ng/ml]
A	19,1	200	219,1	199,3
		100	119,1	118,4
		50	69,1	64,0
B	34,7	200	234,7	223,8
		100	134,7	118,6
		50	84,7	80,5

Serum

Probe	Ungespikte Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	α_2 -Makroglobulin erwartet [ng/ml]	α_2 -Makroglobulin gemessen [ng/ml]
A	17,3	200	217,3	192,0
		100	117,3	107,0
		50	67,3	64,0
B	31,8	200	231,8	227,5
		100	131,8	123,3
		50	81,8	80,4

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 1,68 ng/ml.

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Patientenproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2)

Urin

Probe	Verdünnung	α_2 -Makroglobulin erwartet [ng/ml]	α_2 -Makroglobulin gemessen [ng/ml]
A	1:5	1485,30	1485,30
	1:10	742,65	812,30
	1:20	371,33	417,90
	1:40	185,66	212,70
B	1:5	1121,50	1121,50
	1:10	560,75	622,80
	1:20	280,38	347,40
	1:40	140,19	191,30

Serum

Probe	Verdünnung	α_2 -Makroglobulin erwartet [ng/ml]	α_2 -Makroglobulin gemessen [ng/ml]
A	1:50 000	2,58	2,58
	1:100 000	1,29	1,33
	1:200 000	0,65	0,65
	1:400 000	0,32	0,31
B	1:50 000	1,74	1,74
	1:100 000	0,87	0,92
	1:200 000	0,44	0,48
	1:400 000	0,22	0,26

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.
- 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.

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 Mindesthaltbarkeitsdatums 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 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 Lønblad, 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.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Chargenbezeichnung



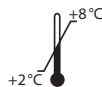
Verwendbar bis

α_2 -Macroglobulin ELISA

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

Valid from 2015-07-28

REF K 6610A



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Test procedure</i>	20
8. RESULTS	21
9. LIMITATIONS	22
10. QUALITY CONTROL	22
<i>Reference range</i>	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Precision and reproducibility</i>	23
<i>Spiking Recovery</i>	24
<i>Analytical Sensitivity</i>	24
<i>Dilution recovery</i>	25
12. PRECAUTIONS	26
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	27

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik 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 localization 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 localization
- Differentiation of renal and postrenal hematuria

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6610A	PLATE	Holder with pre-coated strips	12 x 8 wells
K 6610A	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate (10x)	1 x 100 ml
K 6610A	CONJ	Conjugate concentrate, (rabbit anti α_2 -Macroglobulin peroxidase-labeled)	1 x 200 μ l
K 6610A	STD	Calibrators, lyophilized	2 x 6 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6610A	CTRL1	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K 6610A	CTRL2	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K 6610A	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	2 x 100 ml
K 6610A	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 6610A	STOP	ELISA 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

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 μ l tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 *g*
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* 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 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 ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. 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 **lyophilized calibrators** (STD) and **controls** (CTRL) are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the standards and controls must be reconstituted with **500 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls 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 of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Plasma and serum

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

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

For example:

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

20 µl of the 1:20 dilution + 980 µl SAMPLEBUF, mix well (**1:1000**)

20 µl of the 1:1000 dilution + 980 µl SAMPLEBUF, mix well (**1:50 000**)

For analysis, pipet 100 µl of the final dilution per well.

Urine

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

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 immobilized to the microtiter wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a peroxidase-labeled 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 color converts from blue to yellow. The intensity of the yellow color 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** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (standards/sample/controls) on a protocol sheet.

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips covered 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.	Wash the precoated microtiter plate 5 times with 250 μl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
2.	Add 100 μl of STD/CTRL/SAMPLE into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) shaking on a horizontal mixer.
4.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 μl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
5.	Add 100 μl conjugate in each well.

6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C).
7.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	Add 100 µl SUB (TMB substrate) in each well.
9.	Incubate for 10–20 minutes* at room temperature (15–30°C) in the dark.
10.	Add 100 µl STOP (ELISA stop solution) 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.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color 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 estimated plasma and serum concentration must be multiplied by the dilution factor of **50 000**.

Urine samples

The estimated concentration must be multiplied by the dilution factor of **5**.

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

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater 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 × sample dilution factor to be used

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

Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik 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

Precision and reproducibility

Intra-Assay Urine (n = 20)

Sample	α_2 -macroglobulin [ng/ml]	CV [%]
1	163.98	2.53
2	84.17	3.27

Intra-Assay Serum (n = 20)

Sample	α_2 -macroglobulin [ng/ml]	CV [%]
1	3.92	2.61
2	2.18	6.37

Inter-Assay Urine (n = 10)

Sample	α_2 -macroglobulin [ng/ml]	CV [%]
1	153.46	3.67
2	83.65	3.43

Inter-Assay Serum (n = 10)

Sample	α_2 -macroglobulin [ng/ml]	CV [%]
1	4.01	3.31
2	2.00	3.99

Spiking Recovery

Two samples were spiked with different α_2 -macroglobulin concentrations and measured using this assay (recovery $n = 3$).

Urine

Sample	Unspiked Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	α_2 -macroglobulin expected [ng/ml]	α_2 -macroglobulin measured [ng/ml]
A	19.1	200	219.1	199.3
		100	119.1	118.4
		50	69.1	64.0
B	34.7	200	234.7	223.8
		100	134.7	118.6
		50	84.7	80.5

Serum

Sample	Unspiked Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	α_2 -macroglobulin expected [ng/ml]	α_2 -macroglobulin measured [ng/ml]
A	17.3	200	217.3	192.0
		100	117.3	107.0
		50	67.3	64.0
B	31.8	200	231.8	227.5
		100	131.8	123.3
		50	81.8	80.4

Analytical Sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 1.68 ng/ml.

Dilution recovery

Two patient urine or serum samples were diluted with sample dilution buffer and measured with the assay. The results are shown below:

Urine

Sample	Dilution	α_2 -macroglobulin expected [ng/ml]	α_2 -macroglobulin measured [ng/ml]
A	1:5	1485.30	1485.30
	1:10	742.65	812.30
	1:20	371.33	417.90
	1:40	185.66	212.70
B	1:5	1121.50	1121.50
	1:10	560.75	622.80
	1:20	280.38	347.40
	1:40	140.19	191.30

Serum

Sample	Dilution	α_2 -macroglobulin expected [ng/ml]	α_2 -macroglobulin measured [ng/ml]
A	1:50 000	2.58	2.58
	1:100 000	1.29	1.33
	1:200 000	0.65	0.65
	1:400 000	0.32	0.31
B	1:50 000	1.74	1.74
	1:100 000	0.87	0.92
	1:200 000	0.44	0.48
	1:400 000	0.22	0.26

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 color 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 analyzed 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 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 Lønblad, 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