



EIASON[®] β 2 Microglobulin



Enzyme immunoassay for the quantitative determination β 2 microglobulin in human urine, serum or plasma

Kit instruction

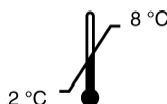
For in-vitro use only

Product of







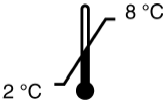











IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-4
Email: office@iason.eu
www.iason.eu

REF E06-001-96



Used IFU-Symbols

Symbol	English	Symbol	English
	In vitro diagnostic device		Sample buffer
	Order number		Conjugate
	Product of		Wash buffer
	Storage		Batch code
	European Conformity		Substrate
	Expiry date		Stop solution
	Calibrators		Microplate
	Positive control		Negative control

Intended Use

For in-vitro use only.

The EIASON® β 2 Microglobulin kit is an indirect solid phase enzyme immunoassay (ELISA) for the quantitative measurement of β 2-microglobulin in human urine, serum or plasma.

Summary

Proteins passing the glomerular basal membrane of the kidney undergo differentiated filtering. The permeability is inversely proportional to the molecular weight (Albumin about 0.6 %, Myoglobin about 75 %). Nevertheless, only minimal quantities of protein are detectable in urine, because big quantities of protein are reabsorbed by the tubuli.

Elevated glomerular protein permeability and high tubular plasma protein elimination can be differentiated by measuring the molecular weight distribution of the eliminated proteins.

The pattern of eliminated proteins in urine gives information about:

- elevated protein elimination
- differentiation of proteinuria
- prediagnosis of a kidney defect
 - glomerular or tubular proteinuria

Diagnostically relevant proteins:

- IgG (mw 150 kD)
- albumin (mw 66 kD)
- β 1-microglobulin (mw 33 kD)
- β 2-microglobulin (mw 12 kD)
- retinol binding protein (mw 21 kD)
- immunoglobulin light chains (Bence-Jones protein) (22 kD)

β 2-microglobulin has a molecular weight of 12 kD and belongs to the light chain part of membrane bound HLA antigens. It consists of two polypeptide chains, a heavy chain with antigenic structures and a light chain.

The determination of β 2-microglobulin in serum or plasma is an aid in the clinical assessment of activation of the cellular immune system and a tumor marker. β 2-microglobulin urine values indicate renal filtration disorders.

β 2-microglobulin is synthesized in the lymphatic system. In Multiple Myeloma, Morbus Hodgkin, chronic lymphatic Leukemia and other malignant Non-Hodgkin Lymphoma elevated β 2-microglobulin concentrations are detectable due to elevated cell biosynthesis. In these cases β 2-microglobulin levels are a helpful indicator for disease development and therapy estimation. Other diseases with activation of the cellular immune system induce an elevation of β 2-microglobulin in serum, too.

In the kidney β 2-microglobulin is filtered glomerularly and reabsorbed tubularly. The molecule is not stable in urine with acid pH-values for a long time. A measurement of β 2-microglobulin in serum and urine allows a differentiation between an activation of the lymphatic system and a disturbance of the kidney function.

Indications:

- changing of the glomerular and the tubular filtration
- lymphatic diseases
- renal tubular damage by heavy metals (Cd, Hg)
- repulsion of a kidney transplantate

Assay principle

Highly purified anti-human- β 2-microglobulin antibodies are bound to microwells. β 2-microglobulin, if present in diluted serum, plasma or urine, bind to the respective antibody. Washing of the microwells removes unspecific components. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-human β 2-microglobulin immunologically detects the bound patient beta-2-microglobulin forming a conjugate/ β 2-microglobulin/antibody complex. Washing of the microwells removes unbound conjugate. An enzyme substrate in the presence of bound conjugate hydrolyzes to form a blue colour. The addition of an acid stops the reaction forming a yellow end-product. The intensity of this yellow colour is measured photometrically at 450 nm.

The amount of colour is directly proportional to the concentration of β 2-microglobulin present in the original sample.

Warnings and precautions

The EIASON® Beta-2-Microglobulin kit is for in vitro diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in the Package Insert. IASON will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

CAUTION: this kit contains material of human and/or animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.

Source material from Human origin which is used in this kit was tested and found negative for HBsAg and HIV as well as for HCV antibodies. However, since there is no diagnostic procedure that excludes these agents with 100 percent certainty all components should be handled as potentially hazardous material.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

Shelf life and storage of reagents

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified. Upon receipt, store all reagents at 2-8°C. Diluted WASH and BU are stable for at least 30 days when stored at 2-8°C.

Storage and preparation of specimen

1. Collect either morning urine or whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
2. Allow blood to clot and separate the serum by centrifugation.
3. Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia is best avoided, but does not interfere with this assay.
4. Specimens may be refrigerated at 2-8 °C for up to five days or stored at -20 °C up to six months.
5. Avoid repetitive freezing and thawing of serum and urine samples. This may result in variable loss of protein activity.
6. Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

Materials provided

Allow all reagents 1-8 to reach room temperature before use.

1. **MPL** Microplate consisting of divisible ELISA strip wells coated with highly purified anti-human- β 2-microglobulin IgG, ready to use (96 wells in total, 8 wells per strip). Before opening the packet of strip wells, allow it to stand at room temperature (20-25°C) for at least 30 minutes. After opening, keep any unused wells in the original foil packet (reseal with adhesive tape) and in the self-seal plastic bag with the desiccant provided. Store at 2-8°C and use within 3 months. However, we recommend that strip wells are used on the same day the foil packet is opened. A frame for holding the wells during assays is also provided.
2. **CAL 0-5** Calibrators 0 – 5 containing β 2 microglobulin, 6 vials, 1.5 mL each, ready to use (0; 0.75; 1.5; 3; 6 and 12 μ g/mL)
3. **PC** **NC** Positive and Negative Control, 2 vials; 1.5 mL each, for concentrations see the QC-certificate, ready to use
4. **WASH** Wash Solution, 1 vial, 20 mL, concentrate 50 x; dilute to 1 litre with distilled water before use. (PBS, $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ w/w)
5. **CONJ** Enzyme Conjugate Solution, (PBS, Proclin 300 < 0.5% v/v), light red, 1 vial, 15 mL, containing polyclonal rabbit anti-human β 2-microglobulin IgG, labelled with horseradish peroxidase, ready to use
6. **BU** Sample Buffer, 1 vial, 20 mL, (TRIS, $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ w/w), yellow, concentrate 5x, dilute to 100 mL with aqua dest.
7. **SUB** Substrate tetramethyl benzidine (TMB), 1 vial, 15 mL, ready to use
8. **STOP** Stop solution, 1 vial, 15 mL, contains acid, ready to use

Materials required but not provided in the kit

- Pipettes capable of dispensing 10, 100 and 1000 μ L
- Distilled water
- ELISA plate reader suitable for 96 well formats and capable of measuring absorbances at 450 and 405 nm

Assay procedure

General remarks

Calculate the number of individual **MPL** wells needed for the assay. Allow all the reagents supplied including the appropriate number of strips to reach room temperature, fit the number of strip wells required firmly into the frame provided. Kit controls should always be included in each assay run. Please note that the optical density depends on incubation time and temperature. Therefore, it is necessary to bring all reagents to work-ready state before the start of the assay; the caps should be opened and all required wells should be in strip holder. Only such preparation will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.

Dilute all **urine samples 1:10** with [BU] before assay.

Therefore combine 100 μ L of urine with 900 μ L of [BU] in a polystyrene tube. Mix well.

Dilute all **serum or plasma samples 1:100** with [BU] before assay. Therefore combine 10 μ L of sample with 990 μ L of [BU] in a polystyrene tube. Mix well.

[CAL] and [CO] are ready to use and need not to be diluted.

Assay procedure

1. Pipette 100 μ L of [CAL 0-5], [PC] [NC] and diluted samples into the wells (in duplicate).
2. Incubate for 30 min at room temperature (20-25°C).
3. Discard the samples by briskly inverting the frame of strip wells over a suitable receptacle. Wash 3 times with 300 μ L [WASH] per well and each time tap the inverted wells gently on a clean dry absorbent surface to remove any droplets of wash buffer.
4. Pipette carefully 100 μ L of [CONJ] into each well.
5. Incubate for 15 min at room temperature (20-25°C).
6. Discard the [CONJ] by briskly inverting the wells over a suitable receptacle, wash 3 times with [WASH] as described under point 3.
7. Pipette carefully 100 μ L of [SUB] into each well.
8. Incubate for 15 minutes at room temperature (20-25°C).
9. Stop the substrate reaction by careful addition of 100 μ L of [STOP] to each well (this will cause the blue colour to turn yellow) and shake the plate for about 5 seconds on a plate shaker to ensure uniformity of the solution in each well. It is most important to ensure that the substrate incubation time (i.e. time from addition of [SUB] to addition of [STOP]) is the same for each well.
10. Measure the absorbance of each well at 450 nm and 405 nm for overrange filter (reference 620 – 650 nm) within 30 minutes after adding the stop solution. The developed colour is stable during this time.

or fully automated on:

- **IASON® Quardette**
- **IASON® PersonalLab**
- **IASON® Gladiator**

Interpretation of results

Quality control

This test is only valid if the optical density at 450 nm for **PC** and **NC** as well as for the **CAL 0-5** complies with the respective range indicated on the Quality Control Certificate enclosed to each test kit. If any of these criteria is not fulfilled, the results are invalid and the test should be repeated.

Calculation of results

For EIASON® β 2 Microglobulin kit a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

Serum samples can be read directly from the standard curve!

Urine results have to be divided by 10 after calculation!

Expected Values

	$\mu\text{g/mL}$
Urine	0 – 0.3
Serum/Plasma	0 – 3.0

Each laboratory is recommended to determine ranges for their local population.

Performance characteristics

Calibration

This assay system is calibrated against the international reference preparation WHO B2M for Beta-2-Microglobulin.

Measuring range

The calculation range of this ELISA assay is 0 - 12 $\mu\text{g/mL}$

Linearity

Patient samples containing high levels of beta-2-microglobulin were serially diluted in sample buffer to demonstrate the dynamic range of the assay and the upper / lower end of linearity. Activity for each dilution was calculated from the calibration curve using a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates. The recovery % was more than 92%.

Precision (Reproducibility)

Statistics for coefficients of variation (CV) were calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run for Intra-Assay precision. Run-to-run precision was calculated from the results of 5 different runs with 6 determinations of each sample:

Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample No	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	Sample No	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)
1	1.6	4.2	1	1.7	4.9
2	7.2	2.6	2	7.5	3.8
3	12.5	3.6	3	13.1	4.9

Sensitivity

The lower detection limit for β 2-microglobulin has been determined at 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

Interfering Substances

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dL), lipemic (up to 3 g/dL triglycerides) or bilirubin (up to 40 mg/dL) containing sera.

Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants. However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

LEGAL ASPECTS**Reliability of results**

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact IASON.

Therapeutic consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under Reliability of Results. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point Therapeutic Consequences are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

Useful publications

1. Grützner, F.J. Diagnostik mit β 2-Mikroglobulin. *Inn. Med.* 1982; 9: 45-56.
2. Litam, P. et al. Prognostic value of serum β 2-microglobulin in low-grade lymphoma. *Ann. Int. Med.* 1990, 114: 855-860.
3. Wibell, L. et al. Serum β 2-microglobulin in renal disease. *Nephron* 1973, 10: 320-331.
4. Ljunggren, H.G. et al. Role of β 2-microglobulin in cancer. *Cancer J.* 1992, 5: 308-315.
5. Swan, F. et al. Beta 2 microglobulin cell surface expression as an indicator of resistance in lymphoma and its relation to the serum level. *Blood* 1988, 72: 258a.
6. Odell, R.A. et al. Beta 2 microglobulin kinetics in end-stage renal failure. *Kidney Int.* 1991, 39: 909-919.

Pipetting scheme

Allow all reagents to reach room temperature

1. Dilution	Urine 1:10 with BU Serum/Plasma 1:100 with BU
2. Pipetting	CAL 0-5 NC PC diluted samples 100 μL
3. Incubation	30 min at room temperature (20-25°C)
4. Washing	wash 3 x : aspirate or decant add 300 μ L WASH aspirate or decant and dry on an absorbent material
5. Pipetting	CONJ 100μL
6. Incubation	15 min at room temperature (20-25°C)
7. Washing	wash 3 x : see step 4
8. Pipetting	SUB 100μL
9. Incubation	15 minutes at room temperature (20-25°C)
10. Pipetting	STOP 100μL
11. Reading	450nm (RF 620nm) Optional Overrange Filter: 405nm, Factor: 3 (dependent on photometer), reading within 30 min. Calculation: 4-parameter

Expected Values

	μg/mL
Urine	0 – 0.3
Serum/Plasma	0 – 3.0



EIASON® β 2 Microglobulin



Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von β 2 Microglobulin im menschlichen Urin, Serum oder Plasma

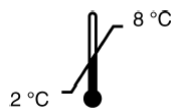
Anleitung

Nur für in-vitro Gebrauch







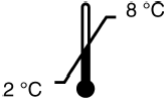









Produkt von



IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-4
Email: office@iason.eu
www.iason.eu



Verwendete IFU-Symbole

Symbol	Deutsch	Symbol	Deutsch
	In vitro Diagnostikum		Puffer
	Bestellnummer		Konjugat
	Hergestellt von		Waschpuffer
	Lagerung bei		Chargenbezeichnung
	Europäische Konformität		Substrat
	Verwendbar bis		Stopplösung
	Standards		Mikrotiterplatte
	Positiv Kontrolle		Negativ Kontrolle

Verwendungszweck

Nur für in-vitro Gebrauch.

Der EIASON® β 2 Microglobulin Kit ist ein indirekter Enzymimmunoassay (ELISA) für die quantitative Bestimmung von β 2-Mikroglobulin im Urin, Serum oder Plasma.

Zusammenfassung

Beta-2-Mikroglobulin (β 2-M) ist das Leichtkettenprotein der HLA-Klasse-I-Antigene und wird dementsprechend auf allen kernhaltigen Körperzellen gefunden. Die Peptidkette (MG von 11,8 kDa) besteht aus 100 Aminosäuren, ist außerhalb der Zellmembran gelegen und durch keine kovalente Bindung mit der schwere Kette des

HLA-Klasse-I-Antigens verbunden. Die Expression von HLA-Klasse-I-Antigenen und daher auch von β 2-M auf den Lymphozyten wird durch Zytokine stimuliert. Bei Erkrankungen, die mit einer Stimulierung des Immunsystems einhergehen, wie beispielsweise durch Bakterien verursachte Entzündungsreaktionen, Immunerkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis) und viralen Infekten ist die β 2-M-Biosynthese erhöht. Hauptsyntheseort des β 2-M sind die Lymphozyten.

Bei Gesunden wird β 2-M in einer relativ konstanten Rate gebildet (Gesunde Personen mit einem Körpergewicht von 70 kg bilden pro Stunde 9 mg β 2-M) und im Rahmen der natürlichen Zellregeneration in die Körperflüssigkeiten abgegeben (Die Halbwertszeit beträgt 40 min). In der Niere wird β 2-M glomerulär filtriert und zu 99,9 % im proximalen Tubulus rückresorbiert. Somit resultiert die Konzentration von β 2-M im Serum aus der Bildungs- und Ausscheidungsrate des Proteins und ist in der Regel bei Gesunden relativ stabil. Änderungen des Serumwertes oder der Ausscheidung sind daher bedingt durch eine vermehrte Produktion des Polypeptids, durch Störungen der glomerulären und tubulären Funktion.

Da β 2-M hauptsächlich durch das lymphatische System gebildet wird, kommt es zu einer Erhöhung der Serumkonzentration bei allen Erkrankungen, die mit einer erhöhten Proliferationsrate lymphozytärer Zellen einhergehen, wie beim multiplem Myelom, der chronisch lymphatischen Leukämie, dem Morbus Hodgkin und anderen malignen Non-Hodgkin-Lymphomen. Hier stellt die β 2-M-Bestimmung einen guten Indikator zur Verlaufsun- und Therapiebeurteilung dar. Auch andere Erkrankungen, bei denen es zu einer stärkeren Aktivierung des Immunsystems kommt, wie z.B. infektiöse Mononukleose und Transplantatabstoßung, bewirken eine Erhöhung der β 2-M-Konzentration im Serum. Des Weiteren wird β 2-M auch zur Verlaufsbeurteilung einer HIV-Infektion eingesetzt.

Die Ausscheidung von β 2-M erfolgt im Wesentlichen über die Nieren. Dementsprechend deuten Änderungen in der Serumkonzentration sowie in der Ausscheidung im Urin auf Beeinträchtigungen der glomerulären und tubulären Funktionen der Niere. So eignet sich die Bestimmung von β 2-M zur Beurteilung der glomerulären Filtrationsrate und zur Diagnostik und Verlaufsbeurteilung tubulointerstitieller Nierenschäden. Eine Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (< 80 mL/min) verlängert die Halbwertszeit des β 2-M und der obere Serumreferenzbereichswert wird überschritten. Es besteht eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Anstieg der β 2-M Konzentration im Serum und der glomerulären Filtrationsrate.

Die Differenzierung zwischen glomerulären und tubulären Nierenerkrankungen gelingt anhand der Bestimmung der β 2-M-Ausscheidung im Urin. Insbesondere bei Kindern ist die Bestimmung der fraktionellen β 2-M-Ausscheidung, die durch die gleichzeitige Bestimmung der Insulin- oder Kreatinin-Clearance ermittelt wird, ein gutes Kriterium. Schwermetallintoxikationen durch Cadmium und Quecksilber führen zu Nekrosen der proximalen Tubuluszellen.

Als frühestes Zeichen einer tubulären Schädigung werden β 2-M-Ausscheidungen > 200 μ g/g Kreatinin im Spontanurin gemessen. Bei Cadmium-exponierten Personen besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Expositionsdauer bzw. dem Produkt aus Expositionsdauer und der Cadmium-Konzentration im Blut und der β 2-M-Ausscheidung. Da β 2-M bei pH-Werten < 6 innerhalb von 2 Stunden denaturiert, sollte der pH-Wert des Urins kontrolliert werden und notfalls mit einigen Tropfen 2 N NaOH alkalisiert werden.

Testprinzip

Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sind mit gereinigtem humanem Beta-2-Microglobulin-Antikörper beschichtet.

Die Bestimmung basiert auf dem Prinzip eines indirekten ELISA mit den folgenden Schritten:

Beta-2-Microglobulin in einer Patientenprobe bindet an den in den Kavitäten beschichteten Antikörper. Ein auf die anschließende Inkubation folgender Waschschrift entfernt alle nicht gebundenen oder unspezifisch gebundenen Moleküle. Das zugegebene anti-beta-2-Mikroglobulin-Enzymkonjugat bindet an die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe.

Nach Inkubation wird in einem zweiten Waschschrift überschüssiges Konjugat entfernt. Das Enzymkonjugat setzt zugefügtes Substrat um. Durch Zugabe von Säure entsteht ein gelbgefärbtes Endprodukt.

Die Intensität der Gelbfärbung korreliert mit der Konzentration an Antigen-Antikörper-Komplexen und wird über ein optisches Modul bei 450 nm gemessen.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der EIASON® β 2 Microglobulin Kit ist nur zur in-vitro Diagnostik und nicht zur Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben, eingesetzt werden. IASON kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden, (sofern nicht gesetzlich etwas anderes festgelegt ist), haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material menschlichen und/oder tierischen Ursprungs. Die Kitreagenzien sind so zu handhaben, als ob eine Übertragung einer Infektionskrankheit möglich sei. Rohmaterial humanen Ursprungs, das in diesem Kit zum Einsatz kommt ist negativ auf HBsAg, HCV und HIV-Antikörper geprüft. Da es kein diagnostisches Verfahren gibt, welches derartige Erreger mit 100%iger Sicherheit ausschließt, sind die entsprechenden Komponenten wie potentiell infektiöse Proben handzuhaben.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis sollten beim Gebrauch und der Entsorgung angewendet werden. Die Entsorgung der Kitreagenzien hat nach den örtlichen Vorschriften zu erfolgen.

Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Dieser Kit ist bei vorschriftsgemäßer Lagerung bis zum Ablauf des Verfallsdatum stabil.

Nach Erhalt sind alle Reagenzien bei 2-8°C zu lagern. Verdünnte **WASH** - und **BU** - Lösung sind für ca. 30 Tage stabil, wenn sie bei 2-8°C gelagert werden.

Lagerung und Vorbereitung der Patientenproben

1. Morgenurin verwenden oder Blutproben sind nach den geltenden Verfahren zu gewinnen.
2. Blut gerinnen lassen und Serum durch Zentrifugation gewinnen.
3. Proben sollten klar und nicht hämolytisch sein. Die Verwendung hämolytischer oder lipämischer Proben sollte vermieden werden, stört diesen Test jedoch nicht.

4. Serum- und Plasmaproben können gekühlt bei 2 °C - 8 °C bis zu 5 Tage aufbewahrt werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtigt, sollten die Proben aliquotiert und bei -20 °C tiefgefroren werden.
5. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden! Verlust an Antikörperaktivität möglich.
6. Die Verwendung hitzeinaktivierter Seren wird nicht empfohlen.

Kitbestandteile

Alle Reagenzien 1-8 vor dem Start auf Raumtemperatur bringen.

1. **MPL** Eine Mikrotiterplatte mit 12 Modulen mit jeweils 8 Kavitäten. Gebrauchsfertig. Mikrotiterplattenvials sind mit anti-Human- β 2 beschichtet. Vor dem Öffnen der Mikrotiterstreifenpackung sollten diese für mind. 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) lagern. Nicht benötigte Wells in die originale Folienverpackung zurückgeben, zukleben, in das Säckchen mit dem Trockenmittel geben und gut verschließen. Aufbewahren bei 2-8°C und innerhalb von 3 Monaten verbrauchen.
2. **CAL 0 - F** Kalibratoren A – F enthalten Beta-2-Mikroglobulin in Serum/Puffer-Matrix, (PBS, BSA, Detergens, NaN₃ 0,09%). Gebrauchsfertig. (0; 0.75; 1.5; 3; 6 und 12 μ g/mL)
3. **PC** **NC** Positive und Negative Kontrolle, je 1.5mL , gebrauchsfertig: Konzentration siehe Qualitätskontroll-Zertifikat
4. **WASH** Waschlösung, 20 mL, 50 x konzentriert: Vor Gebrauch mit Aqua dest. auf 1 Liter verdünnen. (PBS, NaN₃<0.1% w/w)
5. **CONJ** Enzymkonjugat; enthält anti-humane Beta-2-Mikroglobulin-Antikörper, POD markiert, in PBS, BSA, Detergens, Konservierungsmittel Proclin 0,05%, rosa, Gebrauchsfertig.
6. **BU** Probenpuffer; gelb; enthält PBS, BSA, Detergens, Konservierungsmittel NaN₃ 0,09%. Konzentrat 5x., auf 100mL Aqua Dest. verdünnen
7. **SUB** Substrate Tetramethyl benzidin(TMB), Gebrauchsfertig.
8. **STOP** Stopplösung, 15 mL, enthält Säure. Gebrauchsfertig.

Erforderliches Zubehör

- Pipetten für 10, 100 und 1000 μ L
- Destilliertes Wasser
- ELISA Photometer (450 nm und 620 nm – optional 405 nm)

Testdurchführung

Allgemeine Hinweise

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Die Anzahl der erforderlichen Streifen für die **MPL** berechnen. Die Streifen fest in den dafür vorgesehenen Rahmen drücken. Die Kitkontrolle sollte in jedem Assay mitgeführt werden.

Merken Sie bitte, dass die optische Dichte von Inkubationszeit und Temperatur abhängig ist. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle

Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen und alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Unterbrechungen.

Urinproben 1:10 verdünnen:

900 μ L Probenpuffer vorlegen und 100 μ L Urin zugeben. Mischen.

Serum-/Plasmaproben 1:100 verdünnen:

990 μ L verdünnten Probenpuffer im Polystyrolröhrchen vorlegen und 10 μ L Probe zugeben. Mischen.

Beachten: Standards und Kontrollen sind bereits gebrauchsfertig.

Testdurchführung

1. Jeweils 100 μ L der **CAL 0-5**, **PC NC** und vorverdünnten Patientenproben in die Kavitäten pipettieren
2. 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
3. Kavitäten entleeren und 3-mal waschen mit jeweils 300 μ L **WASH**. Kavitäten gut ausklopfen.
4. Jeweils 100 μ L **CONJ** in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettieren.
5. 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
6. Kavitäten entleeren und 3-mal waschen mit jeweils 300 μ L **WASH**. Kavitäten gut ausklopfen.
7. Jeweils 100 μ L **SUB** in die Kavitäten pipettieren.
8. 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
9. Jeweils 100 μ L **STOP** in jede Kavität dazu pipettieren. Kurz in etwa 5 Sekunden auf einem Schüttler schütteln.
10. Optische Dichte bei 450 nm (Referenz 600-690 nm) messen und die Ergebnisse berechnen. Die Farbentwicklung ist mindestens 30 Minuten stabil.

oder vollautomatisiert auf:

- **IASON® Quardette**
- **IASON® Personallab**
- **IASON® Gladiator**

Qualitätskontrolle

Dieser Test ist nur gültig, wenn die bei 450 nm gemessenen optischen Dichten der **CAL 0-5**, sowie die Testergebnisse der **PC** und **NC** mit den Referenzbereichen des Analysenzertifikates übereinstimmen.

Trifft eine dieser Qualitätskriterien nicht zu, sind die Testergebnisse ungültig und der Test sollte wiederholt werden.

Ergebnisberechnung

Für quantitative Resultate erstellt man eine Standardkurve durch Auftragen der gemessenen optischen Dichte der Standards gegen die Standardkonzentrationen. Eine Auswertesoftware mit 4-Parameter-Kurvenanpassung und lin-log Koordinaten für optische Dichte und Konzentration ist die Methode für den EIASON® Beta-2-Mikroglobulin Kit.

Die Probenkonzentration kann durch Interpolation auf der Standardkurve abgelesen werden.

Urinwerte müssen auf Grund der unterschiedlichen Verdünnung nach der Berechnung durch 10 dividiert werden!

Normalwerte

	$\mu\text{g/mL}$
Urin	0 – 0,3
Serum/Plasma	0 – 3,0

Wir empfehlen jedem Anwender, den Normbereich aus dem aktuellen Patientengut abzuleiten.

Testcharakteristika

Kalibrierung

Das Testsystem ist gegen die internationale Referenzpräparation WHOB2M Beta-2-Mikroglobulin kalibriert.

Messbereich

Der Messbereich dieses ELISAs beträgt: 0 - 12 $\mu\text{g/mL}$

Linearität

Patientenproben mit hoher spezifischer Beta-2-Mikroglobulin-Konzentration wurden in Probenpuffer linear verdünnt, um den dynamischen Messbereich des Assays darzustellen. Die Antikörperaktivität jeder Verdünnungsstufe wurde auf einer Standardkurve mit 4-Parameter-Kurvenanpassung abgelesen. Die Wiederfindung % war mehr als 92%.

Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Präzision: Der Variationskoeffizient (VK) wurde berechnet für drei Proben mit je 24 Bestimmungen in einem Lauf. Ergebnisse der Präzision in der Serie sowie die Ergebnisse der Präzision von Lauf-zu-Lauf sind in der Tabelle zusammengefasst.

Inter-Assay Präzision: Der Variationskoeffizient (CV) wurde berechnet für drei Proben aus jeweils 6 Bestimmungen in 5 Läufen. Ergebnisse der Präzision von Lauf-zu-Lauf sind in der Tabelle zusammengefasst.

Intra-Assay			Inter-Assay		
Proben Nr	Mittelwert ($\mu\text{g/mL}$)	VK (%)	Proben Nr	Mittelwert ($\mu\text{g/mL}$)	VK (%)
1	1,6	4,2	1	1,7	4,9
2	7,2	2,6	2	7,5	3,8
3	12,5	3,6	3	13,1	4,9

Nachweisgrenze

Die funktionale Sensitivität wurde mit 0,1 $\mu\text{g/mL}$ getestet und bestimmt

Interferenzen

Es konnten keine Interferenzen mit hämolytischen (bis 1000 mg/dL), lipämischen (bis 3 g/dL Triglyceride) oder Seren mit erhöhten Bilirubinwerten (bis 40 mg/dL) beobachtet werden. Wir empfehlen jedoch aus praktischen Gründen die Verwendung von stark hämolytischen oder lipämischen Proben zu vermeiden.

Des Weiteren wurden keine interferierende Effekte mit Antikoagulantien (EDTA, Heparin, Citrat) beobachtet.

RECHTLICHE GRUNDLAGEN

Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in „Zuverlässigkeit der Ergebnisse“ genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt „Therapeutische Konsequenzen“ erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

Literatur

1. Grützner, F.J. Diagnostik mit β 2-Mikroglobulin. *Inn. Med.* 1982; 9: 45-56.
2. Litam, P. et al. Prognostic value of serum β 2-microglobulin in low-grade lymphoma. *Ann. Int. Med.* 1990, 114: 855-860.
3. Wibell, L. et al. Serum β 2-microglobulin in renal disease. *Nephron* 1973, 10: 320-331.
4. Ljunggren, H.G. et al. Role of β 2-microglobulin in cancer. *Cancer J.* 1992, 5: 308-315.
5. Swan, F. et al. Beta 2 microglobulin cell surface expression as an indicator of resistance in lymphoma and its relation to the serum level. *Blood* 1988, 72: 258a.
6. Odell, R.A. et al. Beta 2 microglobulin kinetics in end-stage renal failure. *Kidney Int.* 1991, 39: 909-919.

Arbeitsschema

Alle Reagenzien vor dem Start auf Raumtemperatur bringen.

1. Verdünnen	Urin 1:10 mit BU Serum/Plasma 1:100 mit BU
2. Pipettieren	CAL 0-5 , NC PC + verdünnte Proben 100 μL
3. Inkubation	30 min bei Raumtemperatur (20-25°C)
4. Waschen	Waschschritt 3x : Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 300 μL WASH pipettieren Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, auf Zellstoff abtropfen
5. Pipettieren	CONJ 100μL
6. Inkubation	15 min bei Raumtemperatur (20-25°C)
7. Waschen	Waschschritt 3x : Siehe Punkt 4
8. Pipettieren	SUB 100μL
9. Inkubation	15 min bei Raumtemperatur (20-25°C)
10. Pipettieren	STOP 100μL
11. Messen	450 nm (RF 620nm) Optional Overage Filter: 405 nm, Faktor: 3 (vom Photometer abhängig), innerhalb von 5 Min. Messen Berechnung: 4-Parameter oder Punkt für Punkt

Normalwerte

	μ g/mL
Urin	0 – 0,3
Serum/Plasma	0 – 3,0
