Arbeitsanleitung / Manual

MPO ELISA Kit

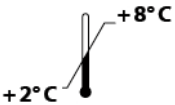
Zur in vitro Bestimmung von Myeloperoxidase (MPO) in Serum und Plasma

MPO ELISA Kit

For the in vitro determination of Myeloperoxidase (MPO) in serum and plasma

Gültig ab / Valid from 31.03.2010

REF **K 6631A**



IVD

Immundiagnostik AG

CE

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK 2
2. EINLEITUNG 2
3. INHALT DER TESTPACKUNG 3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL 4
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN 4
6. PROBENVORBEREITUNG 5
Probenverdünnung 5
7. TESTDURCHFÜHRUNG 6
Testprinzip 6
Pipettierschema 7
8. ERGEBNISSE 8
9. EINSCHRÄNKUNGEN 9
10. QUALITÄTSKONTROLLE 9
Erwartete Ergebnisse 9
11. TESTCHARAKTERISTIKA 10
Präzision und Reproduzierbarkeit 10
Wiederfindung 10
Sensitivität 10
Linearität 11
Kreuzreaktivität 11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN 12
13. TECHNISCHE MERKMALE 12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST 13
15. LITERATUR 13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von MPO (Myeloperoxidase) in Serum und Plasma geeignet. Nur zur in vitro Diagnostik.

2. EINLEITUNG

MPO ist Teil des Abwehrmechanismus der polymorphnukleären Leukozyten gegen körperfremde Stoffe. Wenn es zu einer bakteriellen Infektion kommt, wandern diese Leukozyten, stimuliert durch chemotaktisch wirksame Substanzen (Leukotriene, Komplementfaktoren, Bakterientoxine u.a.), zum Infektionsort. Dort lagern sie sich an die Fremdkörper an und umschließen diese. Befindet sich der Fremdkörper in einer Vakuole, werden verschiedene Stoffe zur intrazellulären Verdauung eingesetzt: Dazu zählen MPO, kationische Proteine, Lysozym, Lactoferrin und einige saure Hydrolasen. Ein starker Schub des oxidativen Stoffwechsels findet statt, wobei in erhöhtem Maß Sauerstoffradikale entstehen. Durch diese Moleküle wird der Fremdstoff zerstört. Bei diesem Vorgang gelangen einige dieser Abwehrstoffe in den extrazellulären Raum. Dies geschieht besonders dann, wenn die Leukozyten den Fremdkörper aufgrund der Größe nicht umschließen können oder wenn sie selbst zerstört werden (durch Bakterientoxine, kristalline Substanzen u.a.).

MPO bildet mit Wasserstoffperoxid und einem Halogen ein sehr starkes antimikrobielles System, das eine Vielzahl von Mikroorganismen wirksam bekämpfen kann. MPO ist in den neutrophilen Leukozyten in hoher Konzentration vorhanden, während Wasserstoffperoxid erst durch den Stoffwechselschub in stärkerem Maß gebildet oder durch die angegriffenen Mikroorganismen freigesetzt wird. Das MPO-System wird durch Katalase, überschüssiges H_2O_2 und einige andere Reduktionsmittel (z.B. Ascorbinsäure, Glutathion) gehemmt. Fehlen diese Substanzen, so kann das MPO-System im extrazellulären Raum auch andere Zellen angreifen. Dazu gehören Spermatozyten, Erythrozyten, Leukozyten und Tumorzellen.

Auch bei nicht-infektiösen Krankheiten spielt die MPO eine Rolle, z.B. bei der Atherosklerose (MPO wurde in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen), bei Lungenkrebs, der Alzheimer-Krankheit oder bei der Multiplen Sklerose. Verschiedene Untersuchungen lassen vermuten, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen MPO, Inflammation und akuten wie auch chronischen Manifestationen bei kardiovaskulären Erkrankungen besteht.

Brennan et al. (2003) zeigten anhand von 604 Patienten mit Brustschmerzen, dass eine einzige initiale Messung von MPO im Serum eine unabhängige, frühe Voraussage des unmittelbaren Myokardinfarktrisikos sowie eine prognostische Abschätzung für das nächste halbe Jahr ermöglicht. Im Gegensatz zu Troponin T, der Kreatinkinase-MB-Isoform und CRP ist MPO bereits erhöht, ohne dass zuvor eine Myokardnekrose stattgefunden hat.

Fazit: Die Messung von MPO könnte künftig der Risikostratifizierung kardiovaskulärer Krankheiten sowohl bei chronischer Erkrankung als auch der Identifizierung von Risikopatienten dienen.

Indikationen

- Marker für Entzündungsaktivitäten im gastrointestinalen Bereich (Stuhl)
- Nierentransplantat-Abstoßung (Urin)
- Oxidativer Stress (Serum)
- Zur Differenzierung von allergischem und infektbedingtem Asthma (Bronchiallavage, Atemluftkondensat, Sputum)
- Verbesserte Risikoabschätzung bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (Serum)

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K 6631AMTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6631AWP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 6631APV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	50 ml
K 6631AST	STD	MPO Standard, lyophilisiert (Konzentration s. Spezifikation)	4 vials
K 6631AKO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 vials
K 6631AKO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 vials
K 6631AA2	AB	Detektionsantikörper (2. Antikörper, monoklonaler Maus anti-MPO, biotinyliert), Konzentrat	150 µl
K 6631AK	CONJ	Konjugat (Streptavidin, Peroxidase markiert), Konzentrat	150 µl
K 6631ATMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6631AAC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 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)

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 Haltbarkeitsdatums verwendet werden.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 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 **WASHBUF** 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.
- Der lyophilisierte **STD** (Standard) und die lyophilisierten **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) rekonstituiert (Volumen und Konzentration siehe entsprechende Produktspezifikation) und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierter Standard und Kontrollen sind **nicht stabil** und können nicht aufbewahrt werden.

Die Verdünnungen für die Standardkurve werden aus dem **MPO-STD** (Standard; S6) mit

SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) in **1:2 Verdünnungsschritten** wie folgt hergestellt.

S6
250 µl S6 + **250 µl** SAMPLEBUF = **S5**
250 µl S5 + **250 µl** SAMPLEBUF = **S4**
250 µl S4 + **250 µl** SAMPLEBUF = **S3**
250 µl S3 + **250 µl** SAMPLEBUF = **S2**
Als Standard S1, 0 ng/ml, wird SAMPLEBUF verwendet.

- Der **AB** (Detektionsantikörper, biotinyliert) wird **1:100** in **Waschpuffer** verdünnt (z.B. 100 µl AB + 9900 µl Waschpuffer). Unverdünnter AB ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). **Verdünnter Antikörper ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:100** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 9900 µl Waschpuffer). Unverdünntes CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Probenverdünnung

Serum/Plasma Proben
Präanalytik

Bei den Untersuchungen von Plasma oder Serum können sich die ermittelten MPO-Werte deutlich unterscheiden. Die Ursachen dafür sind:

- Im Serum werden während des Gerinnungsprozesses die Granulozyten zur kompletten Freisetzung der Granulozyten-Aktivierungsmarker angeregt. Die Standzeit der Proben sowie wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen führen zu keiner Werteverschiebung.
- Anders im Plasma: je länger die Probe vor dem Zentrifugationsschritt steht und je mehr Einfrier- und Auftauzyklen die Probe durchlebt, desto höhere MPO Konzentrationen werden ermittelt. Bei Verwendung von Plasma muss die Präanalytik konstant sein. Das gilt generell und unabhängig von dem verwendeten Testsystem.
- Frisch abgenommenes Serum/Plasma sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden. Es kann entweder am gleichen Tag im Test eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen

führen. Vor dem Einsatz im Test Proben gut mischen. Wir empfehlen alle Werte in Doppelbestimmungen zu ermitteln.

Die Präanalytk ist entscheidend für akkurate und stabile/reproduzierbare MPO-Messergebnisse.

- Shih et al. (2008) berichten über immer höhere MPO-Konzentrationen in Serum und Heparin-Plasma-Proben im Vergleich zu EDTA- oder Citrat-Plasma-Proben und empfehlen die Analyse von EDTA-Plasma-Proben. Ferner untersuchten die Autoren den Einfluss der Präanalytik, der Lagerungs-Temperatur und -Zeit auf die MPO-Messergebnisse von EDTA-, Lithium-Heparin- und Citrat-Plasma-Proben. Alle Proben ergaben einen Unterschied von weniger als 10% nach Lagerung bei Raumtemperatur für 2 Tage, bei 2–8 °C für 8 Tage und nach 3 Zyklen Einfrieren/Auftauen.
- Videm (1996) beschreibt bei Heparin-Konzentrationen, wie bei klinischer Dosierung verwendet werden, eine dosisabhängige Erhöhung der Granulozyten-Aktivität, die durch quantitative ELISA Bestimmung der MPO-Freisetzung untersucht wurde. Daher sollte bei der Auswertung der MPO-Ergebnisse für Proben von Patienten unter systematischer Heparintherapie der direkte Einfluss von Heparin auf Granulozyten bzw. auf die MPO-Freisetzung und -Konzentration berücksichtigt werden.

Serumproben
Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:40** in **SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) verdünnt.
Zum Beispiel: **25 µl** Probe + **975 µl** SAMPLEBUF.

EDTA-Plasmaproben
Plasmaproben werden vor dem Einsatz im Test **1:10** in **SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) verdünnt.
Zum Beispiel: **100 µl** Probe + **900 µl** SAMPLEBUF.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik.
Teststandards, Kontrollen und verdünnte Proben, die MPO enthalten, werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, deren Vertiefungen mit einem hochaffinen polyklonalen anti-human MPO Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird die MPO aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird der Detektionsantikörper, ein Biotin markierter monoklonaler anti-MPO Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplat-

te: Fängerantikörper - humanes MPO – Biotinylierter Detektionsantikörper. Anschließend wird Peroxidase-markiertes Streptavidin pipettiert. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch folgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem MPO-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen
Markieren Sie die Positionen für STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrollen) im Protokollblatt
Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden
Waschen Sie die Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
Pipettieren Sie 100 µl STD /SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen. Als STD 0 ng/ml wird der Verdünnungspuffer der Proben eingesetzt
Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
Pipettieren Sie 100 µl verdünnten AB (Detektionsantikörper, biotinyliert) pro Vertiefung
Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
Pipettieren Sie 100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen

Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
Pipettieren Sie 100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen
10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen, gut mischen
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 gelesen. 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 Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion
   Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.001).
2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung
   Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.
3. Gewichtete Spline-Funktion
   Für die optische Dichte 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).

   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/Plasma Proben

Um die Konzentration in **Serum** zu bestimmen, wird der ermittelte MPO-Wert mit **40** multipliziert.

Um die Konzentration in **Plasma** zu bestimmen, wird der ermittelte MPO-Wert mit **10** multipliziert.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Serum/Plasma mit MPO Konzentrationen, die größer als der höchste Standard sind werden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und nochmals bestimmt.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegt einer oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

MPO aus Serum (n = 42):	Mittelwert 340 ng/ml	(SD 176.7)
MPO aus EDTA-Plasma (n = 41):	Mittelwert 98.31 ng/ml	(SD 62.9)

Anhand einer laborinternen Studie mit Serum- bzw. Plasmaproben von augenscheinlich Gesunden wurden die Mittelwerte berechnet.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Die Proben wurden 19 mal in einem MPO ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay (n=19)		
Probe	**MPO (ng/ml)**	**Vk (%)**
1	148.844	4.7
2	426.382	3.1

Es wurde die Reproduzierbarkeit von einer Plasmaprobe an mehreren Tagen und von unterschiedlichen Personen angesetzt und im MPO ELISA gemessen.

Inter-Assay (n=24)		
Probe	**MPO (ng/ml)**	**Vk (%)**
1	9.374	9.7

Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen MPO Konzentrationen versetzt und gemessen.

Probe (ng/ml)	Spike (ng/ml)	MPO erwartet (ng/ml)	MPO gemessen (ng/ml)
2.7	10.0	12.7	12.8
2.9	5.0	7.9	8.9
2.9	7.5	10.4	12.0
2.9	20	22.9	21.3

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als B_0 + 2 SD festgelegt. Gemessen wurde 20 mal der Standard null.

Probe	MPO Mittelwert (OD)	Standard-abweichung (SD)	Nachweisgrenze (ng/ml)
1	0.015	0.021	1.077

Linearität

Zwei Proben wurden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

n=2

Probe	Verdünnung	Erwartet (ng/ml)	Gemessen (ng/ml)
A	1:20	151.99	148.93
	1:40	75.99	75.22
	1:80	38.00	37.88
	1:160	19.00	19.34
B	1:40	130.52	120.11
	1:80	65.26	64.41
	1:160	32.63	33.58
	1:320	16.31	16.71

Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen im Serum/Plasma gefunden.

Alpha-1-Antitrypsin	0 %
Albumin	0 %
CRP	0 %
Lysozym	0 %
sIgA	0 %
PMN-Elastase	0 %
Calprotectin	0 %

Es wurde keine Kreuzreaktivität mit MPO im Mausserum gefunden.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur in vitro Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. 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 Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- 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.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur in vitro Diagnostik 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 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 zurück zu senden.

15. LITERATUR

Publikationen zum Immundiagnostik MPO-ELISA:

- Exner M et al. (2006) JACC 47 (11) 2212-2218
- Holz O et al. (2005) J Clin Pharmacol 45(5):498-503
- Stepan H et al. (2003) Hypertens Pregnancy 22(3):239-45
- Stepan H et al. (2002) Poster zum 10. Kongress der DGPG

Allgemeine Publikationen:

- Klebanoff SJ (1999) Proc Assoc Am Physicians 111(5):383-9
- Oremek et al. (1995) MTA 4: 273-278
- Markant et al. Pharmazeutische Zeitung 26/1995, 140. Jahrgang: 9-25
- Saiki (1998) Kurume Med J 45: 69-73
- Zhang R et al. (2001) JAMA 286 : 2136-2142
- Brennan M et al. (2003) N Engl J Med 349 : 1595-1604
- Baldus S et al. (2003) Circulation 108 : 1440-1445
- Shih et al. (2008) Affect of Collection Tube Type and Preanalytical Handling on Myeloperoxidase Concentrations Clinical Chemistry 54:6 1076–1079
- Videm V. (1996) Heparin in clinical doses ‚primes' granulocytes to subsequent activation as measured by myeloperoxidase release. Scand J Immunol. Apr;43(4):385-90

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung

Bestellnummer

In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

Hersteller

Verwendbar bis

Chargenbezeichnung

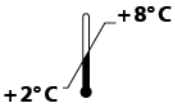
Manual

MPO ELISA Kit

For the in vitro determination of Myeloperoxidase (MPO) in serum and plasma

Valid from 31.03.2010

REF **K 6631A**



IVD

Immundiagnostik AG

CE

Content

1. INTENDED USE 17
2. INTRODUCTION 17
3. MATERIAL SUPPLIED 18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED 19
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS 19
6. SAMPLE PREPARATION 20
Dilution of samples 20
7. ASSAY PROCEDURE 21
Principle of the test 21
Test procedure 22
8. RESULTS 23
9. LIMITATIONS 24
10. QUALITY CONTROL 24
Expected values 24
11. PERFORAMANCE CHARACTERISTICS 25
Precision and reproducibility 25
Recovery 25
Sensitivity 25
Linearity 26
Cross reactivity 26
12. PRECAUTIONS 27
13. TECHNICAL HINTS 27
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE 28
15. REFERENCES 28

1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of MPO (Myeloperoxidase) in serum and plasma. It is for in vitro diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

MPO is part of the defence mechanism of the polymorphonuclear leukocytes against exogenic substances. During bacterial infection, these leukocytes, are stimulated by chemotactically effective substances (leukotrienes, complement factors, bacterial toxins etc.). They move to the site of the infection and encapsulate the foreign substances. If the foreign agent is located in an intracellular vacuole, different substances are used for the intracellular digestion. Amongst these are MPO, cationic proteins, lysozyme, lactoferrin and some acidic hydrolases. A strong surge of oxidative metabolism takes place, producing a high number of oxygen radicals which leads to the destruction of foreign proteins. Some of these molecules can leak into the extracellular space during this process. This happens to a greater extent, when the leukocytes cannot encapsulate the foreign body because of its size or in cases where the neutrophils are destroyed (by bacterial toxins, crystalline substances etc.).

MPO, together with hydrogen peroxide and a halogen, forms a very strong anti microbial system, which can effectively combat a number of microorganisms. MPO is present at high concentration in neutrophil granulocytes, whereas hydrogen peroxide is produced during infection/ inflammation. The MPO system is inhibited by catalase, excess of hydrogen peroxide and other reducing substances (e.g. ascorbic acid, glutathione). In the absence of these agents other cells in the extracellular space can be affected (e.g. spermatocyte, erythrocytes, leukocytes, and tumor cells)

Apart from its implications in host defence, involvement of MPO has been described in numerous non-infectious diseases such as atherosclerosis, lung cancer, Alzheimer´s disease, and multiple sclerosis. MPO is present and active within atherosclerotic lesions. Numerous lines of evidence suggest mechanistic links between myeloperoxidase, inflammation and both acute and chronic manifestations of cardiovascular disease.

Brennan et al. (2003) showed that in 604 sequentially ascertained patients presenting with chest pain, a single initial measurement of plasma myeloperoxidase was an independent early predictor of myocardial infarction, as well as the risk of major adverse cardiac events in ensuing 30-day and 6-month periods. In contrast to troponin T, creatine kinase MB isoform, and C-reactive protein levels, MPO levels may identify patients at risk for cardiac events in the absence of myocardial necrosis.

Summary: The inflammatory protein myeloperoxidase is present, active and mechanistically poised to participate in the initiation and progression of cardiovascular disease. The many links between myeloperoxidase, oxidation and cardiovascular disease suggest this leukocyte protein may have clinical utility in risk stratification for cardiovascular disease status and outcomes.

Indications

- Marker for inflammatory activities in the gastrointestinal tract (Stool)
- Renal transplant rejection (Urine)
- Oxidative stress (Serum)
- For the differentiation between allergic and infectious asthma (bronchial lavage, respiratory condensate, sputum)
- Prediction of risk in patients with acute coronary syndromes (Serum)

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalotue No	Content	Kit Components	Quantity
K 6631AMTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6631AWP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K 6631APV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	50 ml
K 6631AST	STD	MPO-Standard, lyophilized (see specification for concentration)	4 vials
K 6631AKO1	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 vials
K 6631AKO2	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 vials
K 6631AA2	AB	Detection antibody (2^{nd} antibody, mouse monoclonal anti-MPO antibody, biotinylated), concentrate	150 µl
K 6631AK	CONJ	Conjugate (streptavidin peroxidase labeled), concentrate	150 µl
K 6631ATMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6631AAC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm
  (reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, make sure that the reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- The **ELISA WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml a. bidest.), 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 of the buffer solutions. 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** (standard) and the lyophilized **CTRL** (controls) are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Standard and controls have to be reconstituted with **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) (volume and concentration see product specification). Allow the vial content to solve for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted standard and controls are **not stable**.

  Prepare a series of dilutions for the standard curve from the **MPO STD** (standard; S6) in **1:2** dilution steps by adding SAMPLEBUF (sample dilution buffer) as follows:

S6
250 µl S6 + **250 µl** SAMPLEBUF = **S5**
250 µl S5 + **250 µl** SAMPLEBUF = **S4**
250 µl S4 + **250 µl** SAMPLEBUF = **S3**
250 µl S3 + **250 µl** SAMPLEBUF = **S2**
SAMPLEBUF is used as standard S1, 0 ng/ml.

- The **AB** (detection antibody, biotinylated) must be diluted **1:100** in **wash buffer** (e.g. 100 µl AB + 9900 µl wash buffer). The undiluted AB is stable at 2-8 °C until the expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1:100** in diluted **wash buffer** (100 µl CONJ + 9900 µl wash buffer). The conjugate is stable at **2-8 °C** until expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored**.
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

6. SAMPLE PREPARATION

Dilution of samples

Serum/plasma samples
Preanalytic handling

Significant differences in the MPO levels can be observed due to different sample preparation procedures, e.g. analysis of plasma or serum samples. The reasons are as follows:

- The granulocytes are activated during the serum clotting and release granulocyte-activating markers. The time between serum collecting and analysis as well as repeated freeze-thaw cycles don‘t cause a MPO concentration shift.
- On the contrary, in the case of plasma samples, varying the time between sampling and analysis or the number of freeze-thaw cycles will cause variation in the observed MPO levels. Therefore, the preanalytical conditions of plasma samples should be held constant. This is a general requirement independent of the test-system used.
- Fresh collected Serum/Plasma should be centrifuged within one hour. Store samples at -20 °C if not assayed on the same day. Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicate analyses for each sample.

The preanalytical handling is critical for accurate and consistent/reproducible MPO measurement results.

- Shih et al. (2008) report that MPO concentrations were consistently higher in serum

and heparin plasma samples than in samples in EDTA or citrate and recommend the analysis of EDTA plasma samples. Furthermore, the authors investigated the effects of preanalytical handling, storage temperature and time for EDTA plasma, lithium-heparin and citrate preparation. Less than 10% differences were found after storage of samples at room temperature for 2 days, after storage at 2–8 °C for 8 days, and after 3 freeze-thaw cycles for all sample types

- Videm (1996) describes at heparin concentrations, as applied in clinical practice, a dose-dependent increase in granulocyte activation as measured by MPO release, quantitated in enzyme-immunoassay. Thus, direct effects of heparin on granulocytes, e.g. MPO release and concentration, should be taken into consideration for the evaluation of MPO results of samples from patients receiving systemic heparin therapy.

Serum samples
Prior to analyses the serum samples should be diluted **1:40** with **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer).
For example: **25 µl** sample + **975 µl** SAMPLEBUF.

EDTA-plasma samples
Prior to analyses the EDTA-plasma samples should be diluted **1:10** with **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer).
For example: **100 µl** sample + **900 µl** SAMPLEBUF.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the two-site "sandwich" technique.
Assay standards, controls and prediluted patient samples containing human MPO are added to wells of microplate that was coated with a high affine polyclonal anti-human MPO antibody. After the first incubation period, antibody immobilized on the wall of microtiter wells captures human MPO in the sample. Then a biotinylated detection antibody, a monoclonal anti-human MPO antibody, is added to each microtiter well and a "sandwich" of capture antibody - human MPO – biotinylated detection antibody is formed. In the next step, a peroxidase labeled streptavidin is added. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of MPO in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. MPO present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well.
Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Controls) on a protocol sheet.
Take the required microtiter strips out of the kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label.
Wash each well 5 times by dispending 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Controls) in duplicate into respective wells. Use sample dilution buffer as STD 0 ng/ml.
Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer
Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispending 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
Add 100 µl of AB (detection antibody solution) into each well.
Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer.
Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispending 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
Add 100 µl CONJ (Conjugate) into each well.
Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer.
Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispending 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
Add 100 µl of SUB (Substrate) into each well.
Incubate for 10 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark.*
Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly.

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 to observe the procedure of the color change and to stop the reaction upon good differentiation

8. 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. 0.001).
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. 0.001).

   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 samples

For the calculation of the MPO concentration in **serum** samples the result has to be multiplied by **40**.

For the calculation of the MPO concentration in **plasma** samples the result has to be multiplied by **10**.

9. LIMITATIONS

Serum/plasma with MPO levels greater than the highest standard value should be diluted with sample dilution buffer and re-assayed.

10. 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 sample 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 ranges

MPO in serum (n = 42):	mean 340 ng/ml	(SD 176.7)
MPO in EDTA-plasma (n = 41):	mean 98.31 ng/ml	(SD 62.9)

Based on Immundiagnostik AG studies of evidently healthy persons a mean value was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

11. PERFORAMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

The precision (intra-assay variation) ot the Immundiagnostik MPO ELISA test was calculated from 19 replicate determinations on each one of two samples.

Intra-Assay (n=19)		
Sample	**MPO (ng/ml)**	**CV (%)**
1	148.844	4.7
2	426.382	3.1

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik MPO ELISA test was calculated from data on one sample obtained in 24 different assays by different technicians over a period of two months.

Inter-Assay (n=24)		
Sample	**MPO (ng/ml)**	**CV (%)**
1	9.374	9.7

Recovery

Two samples were spiked with different MPO concentrations and measured using this assay.

Sample (ng/ml)	Spike (ng/ml)	MPO expected (ng/ml)	MPO measured (ng/ml)
2.7	10.0	12.7	12.8
2.9	5.0	7.9	8.9
2.9	7.5	10.4	12.0
2.9	20	22.9	21.3

Sensitivity

The sensitivity was set as B_0 + 2SD. The zero-standard was measured 20 times.

Sample	MPO mean value (OD)	Standard variation (SD)	Detection limit (ng/ml)
1	0.015	0.021	1.077

Linearity

Two patient samples were diluted with sample buffer and analyzed. The results are shown below:

n=2

Sample	Dilution	Expected (ng/ml)	Measured (ng/ml)
A	1:20	151.99	148.93
	1:40	75.99	75.22
	1:80	38.00	37.88
	1:160	19.00	19.34
B	1:40	130.52	120.11
	1:80	65.26	64.41
	1:160	32.63	33.58
	1:320	16.31	16.71

Cross reactivity

No cross reactivity with other plasma proteins in serum/plasma was observed.

Alpha-1-Antitrypsin	0 %
Albumin	0 %
CRP	0 %
Lysozym	0 %
sIgA	0 %
PMN-Elastase	0 %
Calprotectin	0 %

No cross reactivity with MPO in mouse serum was observed.

12. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be observed.
- Human material used in the kit components was 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 kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulphuric acid, a strong acid. Even diluted, it still has to be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for in vitro diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from this.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

15. REFERENCES

Publications based on the Immundiagnostik MPO-ELISA:

- Exner M et al. (2006) JACC 47 (11) 2212-2218
- Holz O et al. (2005) J Clin Pharmacol 45(5):498-503
- Stepan H et al. (2003) Hypertens Pregnancy 22(3):239-45
- Stepan H et al. (2002) Poster zum 10. Kongress der DGPG

General Publications:

- Klebanoff SJ (1999) Proc Assoc Am Physicians 111(5):383-9
- Oremek et al. (1995) MTA 4: 273-278
- Markant et al. Pharmazeutische Zeitung 26/1995, 140. Jahrgang: 9-25
- Saiki (1998) Kurume Med J 45: 69-73
- Zhang R et al. (2001) JAMA 286 : 2136-2142
- Brennan M et al. (2003) N Engl J Med 349 : 1595-1604
- Baldus S et al. (2003) Circulation 108 : 1440-1445
- Shih et al. (2008) Affect of Collection Tube Type and Preanalytical Handling on Myeloperoxidase Concentrations Clinical Chemistry 54:6 1076–1079
- Videm V. (1996) Heparin in clinical doses ‚primes' granulocytes to subsequent activation as measured by myeloperoxidase release. Scand J Immunol. Apr;43(4):385-90

Used Symbols:

Store at

REF Catalog Number

IVD In Vitro Diagnostic Device

No. of tests

Manufacturer

Use by

LOT Lot number

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00
Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com