

Arbeitsanleitung/Manual

PMN-Elastase ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung der PMN-Elastase in Serum, Plasma,
Seminalplasma und Stuhl

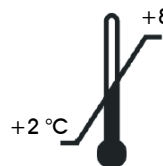
PMN-Elastase ELISA Kit

For the in vitro determination of PMN-Elastase in serum, plasma,
seminal plasma and stool

Gültig ab / Valid from 13.04.2010



K 6830



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

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von **PMN-Elastase** aus Serum, Plasma, Seminalplasma und Stuhl geeignet. Nur zur in vitro Diagnostik.

2. EINLEITUNG

PMN-Elastase aus humanen polymorphkernigen Granulozyten ist ein Glykoprotein von 30 kDa und gehört zur Gruppe der Serinproteasen. Die Freisetzung aktiver PMN-Elastase erfolgt nach entsprechender Reizung aus den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten oder beim Zerfall dieser Zellen. Die Bestimmung der PMN-Elastase aus Stuhl dient der Erfassung von Entzündungsreaktionen mit Beteiligung neutrophiler Granulozyten. Insbesondere bei Morbus Crohn gehen die Entzündungsvorgänge mit einer erhöhten Phagozytoseaktivität und dem Zerfall dieser Zellen einher und führen somit zu einer gesteigerten Freisetzung der PMN-Elastase und anderer lysosomaler Enzyme.

Indikationen

- Aktivitätsmarker bei Morbus Crohn
- Chronische Gelenkentzündungen
- Bakterielle Infektion, Sepsis

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6830MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6830WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6830EP	EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat 2.5 x	2 x 100 ml
K 6830K	CONJ	Konjugat, Ziege anti- Maus-Antikörper, Peroxidase-markiert, gebrauchsfertig	15 ml
K 6830A2	AB	Detektionsantikörper (2. Antikörper, Maus anti-PMN-Elastase, monoklonal), lyophilisiert	2 vials
K 6830CAL	CAL	Kalibrator, lyophilisiert	4 vials
K 6830KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 vials
K 6830KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 vials
K 6830TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6830AC	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)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 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 werden und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden** (z. B. 2. Antikörper (AB) ist in der größten Verdünnungsstufe nicht haltbar). Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen innerhalb des angegebenen Verfallsdatums verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** (WASHBUF) kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8°C** für **1 Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Als **BLANK** (Leerwert) werden **100 µl** des vorbereiteten und 1:10 verdünnten Waschpuffer pipettiert.
- Das **EXBUF** (Extraktionspufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:2,5** mit bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (90 ml Konzentrat + 135 ml aqua bidest.). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **EXBUF** (Extraktionspufferkonzentrat) kann bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnte Pufferlösung ist bei 2-8 °C vier Monate in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der lyophilisierte **AB** (2. Antikörper, Maus-anti-PMN-Elastase) wird bei 2-8°C gelagert. Vor gebrauch wird der AB in **600 µl aqua bidest. rekonstituiert**, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Der AB wird **1:20 in Waschpuffer verdünnt** (z.B. 500 µl AB + 9.5 ml Waschpuffer) im Test eingesetzt. Der **unverdünnte rekonstituierte AB** kann bei -20° C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. **Verdünnte Antikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden.**
- Der **CAL** (Kalibrator) wird mit **0.5 ml** bidestilliertem Wasser rekonstituiert (siehe Produktspezifikation).

- Die **CTRL** (Kontrollen) werden mit **0,5 ml** bidestilliertem Wasser rekonstituiert (siehe Produktspezifikation). Zur vollständigen Rekonstitution wird das Gefäß mit der Lösung mehrmals geschwenkt.

Rekonstituierte Kontrollen und Kalibrator sind nicht stabil und können 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

Stuhlproben

Der Extraktionspuffer wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

1. Es wird ein Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 745 804)) verwendet, das 100 mg dosiert. In dieses Stuhlaufarbeitungssystem wird die Stuhlprobe in 5 ml Puffer suspendiert.

Puffervolumen konstant - 5 ml

Verdünnungsfaktor konstant - 1:50

2. Alternativ kann eine Stuhlprobenmasse im Bereich von 80 - 120 mg manuell eingewogen werden. Bitte die exakte Menge für jede Probe notieren!
 - a. Jede einzelne Probe wird in 5 ml Puffer unabhängig von der eingewogenen Menge suspendiert.

Puffervolumen konstant - 5 ml

Verdünnungsfaktor variabel

Der Verdünnungsfaktor ändert sich entsprechend der folgenden Tabelle und muss bei der Auswertung berücksichtigt werden:

Einwaage [mg]	Verdünnungs- faktor
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
100	50

Einwaage [mg]	Verdünnungs- faktor
102	49.0
104	48.1
106	47.2
108	46.3
110	45.5
112	44.6
114	43.9
116	43.1
118	42.4
120	41.6

- b. Die Puffermengen** für die einzelnen Proben variieren in Abhängigkeit von den Stuhleinwaagen (siehe Tabelle). Dabei bleibt der Verdünnungsfaktor konstant.

Puffervolumen variabel

Verdünnungsfaktor konstant - 1:50

Somit kann der Verdünnungsfaktor für die Auswertung aller Proben einheitlich verwendet werden.

Puffervolumen variabel

Verdünnungsfaktor konstant - 1:50

Somit kann der Verdünnungsfaktor für die Auswertung aller Proben einheitlich verwendet werden.

Einwaage [mg]	Puffervolumen [ml]
80	4.0
82	4.1
84	4.2
86	4.3
88	4.4
90	4.5
92	4.6
94	4.7
96	4.8
98	4.9
100	5.0

Einwaage [mg]	Puffervolumen [ml]
102	5.1
104	5.2
106	5.3
108	5.4
110	5.5
112	5.6
114	5.7
116	5.8
118	5.9
120	6.0

Anschließend wird die Stuhlsuspension mit dem Puffer gut gemischt (z. B. Vortexer für mindestens 30 sec. je nach Stuhlkonsistenz).

Danach wird ca. 1 ml von der Suspension in ein verschließbares Einweggefäß (z. B. von Eppendorf) überführt und für 5 Minuten bei 13000 rpm (\approx 13000 g) zentrifugiert. **100 μ l** des Überstandes werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

Die Stuhlsuspension ist nicht haltbar. Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen.

Seminalplasma

Das **Plasmamaterial** sollte bei **-20°C** gelagert und direkt vor der Testdurchführung aufgetaut werden.

Nach dem Auftauen werden die Seminalplasmen **5 Minuten** bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Seminalplasmen müssen vor dem Einsatz im Test - in Abhängigkeit des Entzündungszustandes des Patienten - **1:10** bis **1:20** in Waschpuffer verdünnt werden.

Serum- und Plasmaproben

Präanalytik

Bei den Untersuchungen von Plasma oder Serum können sich die ermittelten PMN-Elastasewerte deutlich unterscheiden z. B. bis zu 10-fach höhere Serumwerte im Vergleich zu den Plasma Konzentrationen. 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 Werteververschiebung.

Anders im Plasma, je länger die Probe vor dem Zentrifugationsschritt steht und je mehr Einfrier- und Auftauzyklen die Probe durchlebt umso höhere PMN-Elastase Konzentrationen werden ermittelt. Bei Verwendung von Plasma muss die Präanalytik konstant sein. Das gilt generell und unabhängig von dem verwendeten Testsystem.

Immundiagnostik empfiehlt daher zur Bestimmung der PMN-Elastase Konzentration Serum zu verwenden.

Frisch abgenommenes Blut wird innerhalb einer Stunde abzentrifugiert. Es wird entweder am gleichen Tag im Test eingesetzt oder bei -20°C gelagert. 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.

Serumproben müssen vor dem Einsatz im Test **1:500** mit Waschpuffer verdünnt werden.

Plasmaproben müssen vor dem Einsatz im Test **1:100** mit Waschpuffer verdünnt werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Im ersten Inkubationsschritt wird PMN-Elastase aus den Proben von einem immobilisierten Schaf-anti-PMN-Elastase-Antikörper gebunden. Es folgt ein Waschschrift um alle ungebundenen Probenkomponenten zu entfernen. Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein monoklonaler Maus anti-PMN-Elastase-Antikörper dazu pipettiert, der sowohl die freie als auch die mit ihrem spezifischen Inhibitor (α 1-Proteinaseinhibitor= α 1-Antitrypsin) komplexierte PMN-Elastase Form erkennt. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugates. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem PMN-Elastase-Gehalt direkt proportional. Anhand eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Mustereichkurve lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen
2.	Positionen für BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Leewert / Kalibrator / Kontrollen / Probe) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren
3.	Benötigte PLATE (Mikrotiterstreifen) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden
4.	Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5.	100 µl für BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Leewert / Kalibrator / Kontrollen / Probe) in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
7.	Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8.	100 µl AB (Detektionsantikörper /2.Antikörper) in alle Wells pipettieren

9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
10.	Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11.	100 µl CONJ (Konjugat) in alle Wells pipettieren
12.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
13.	Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
14.	100 µl SUB (Substrat) in alle Wells pipettieren
15.	5 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren
16.	50 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells pipettieren, mischen
17.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

8. ERGEBNISSE

Für die Auswertung der Messwerte verwenden Sie bitte ein 4-parametrisches Logit-Log Model unter Verwendung der Angaben zu dem Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators (CAL), welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind.

Abhängig von der verwendeten Software kann der Kalibrationskurvenverlauf sowohl durch die Parameter A, B, C und D als auch durch die Wertepaare aus Konzentration und optischer Dichte der Standards beschrieben werden.

Achtung: Die Parameterwerte müssen genau eingegeben werden, da selbst geringe Abweichungen der Zahlenwerte zu massiven Störungen der Auswertung führen können.

Nach jeder Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

Stuhlproben:

Die ermittelte PMN-Elastase Konzentration der Stuhlprobe wird auf Grund der Probenvorbereitung wie im folgendem Beispiel berechnet:

Probenvorbereitung 1 und 2b: Verdünnungsfaktor konstant: 50

Die ermittelte PMN-Elastase Konzentration wird mit **50** multipliziert um die tatsächliche Konzentration im Stuhl zu bestimmen.

Probenvorbereitung 2a: Der Verdünnungsfaktor ist variabel.

Der entsprechende Verdünnungsfaktor jeder Probe wird der Tabelle entnommen und mit der ermittelten PMN-Elastase Konzentration multipliziert.

Seminalplasma:

Der ermittelte PMN-Elastase-Wert wird je nach gewählter Verdünnung bei der Probenvorbereitung mit **10** oder **20** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Serumproben:

Der ermittelte PMN-Elastase-Wert wird mit **500** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Plasmaproben:

Der ermittelte PMN-Elastase-Wert wird mit **100** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen PMN-Elastase Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, sollten mit Waschpuffer stärker verdünnt und nochmals bestimmt werden.

Das Vorliegen erhöhter PMN-Elastase-Konzentrationen im Seminalplasma unterstützt die Diagnose einer akuten bzw. chronischen Adnexitis. Bei gleichzeitig bestehender Urethritis anterior ist der Befund jedoch nicht verwertbar, da eine Kontamination des Ejakulats mit Granulozyten unvermeidbar ist. Eine eventuell vorliegende Urethritis anterior, die in der Regel leicht diagnostizierbar ist, muss daher ausgeschlossen oder behandelt werden bevor die PMN-Elastasebestimmung im Seminalplasma zu Aussagen über eine vorhandene Adnexitis herangezogen wird.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen die Kontrollen (wenn vorhanden auch externe) bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Proben nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse**Normwerte:**

(1 g Stuhl entspricht 1ml)

PMN-Elastase-Konzentration im Stuhl gesunder Personen (n=76):

< 62ng/ml

PMN-Elastase-Konzentration im Plasma gesunder Personen (n=37):

19–78ng/ml

PMN-Elastase-Konzentration im Serum gesunder Personen (n = 52):

Mittelwert = 688ng/ml (186 – 1991ng/ml)

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=20)		
Probe	PMN Elastase [ng/ml]	Vk [%]
1	2.3	14
2	0.72	4.5

Inter-Assay (n=20)		
Probe	PMN Elastase [ng/ml]	Vk [%]
1	4.9	4
2	27.8	10

Wiederfindung

Verschiedene Proben wurden mit unterschiedlichen PMN-Elastase Standardmengen versetzt und gemessen.

Probe [ng/ml]	Standard [ng/ml]	PMN-Elastase erwartet [ng/ml]	PMN-Elastase gemessen [ng/ml]
1.5	3	4.5	4.9
	6	7.5	7.7
0.75	5	5.8	5.7
	1.65	2.4	2.7
	0.65	1.4	1.5

Sensitivität

Der Null-Standard wurde mehrfach (n=20) vermessen. Von der ermittelten Optischen Dichte wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als Null-Standard + 2 Standardabweichungen.

Probe	PMN-Elastase Mittelwert [OD]	Standardab- weichung	Nachweis- grenze [ng/ml]
Blank	0.025	0.024	0.12

Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen im Stuhl gefunden.

Es wurde Kreuzreaktivität mit PMN-Elastase bzw. eine gute Korrelation zum PMN-Elastase-Gehalt im Mausserum gefunden.

Linearität

Zwei Proben mit bekannter PMN-Elastase Konzentration wurden seriell verdünnt und vermessen. Gegenübergestellt sind die erwartete (berechnete) und die gemessene PMN-Elastase Konzentration.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	unverdünnt	22	22
	1:2	11	10.3
	1:4	5.5	5.3
	1:8	2.7	2.7
B	unverdünnt	4.6	4.6
	1:2	2.3	2.4
	1:4	1.2	1.3
	1:8	0.6	0.9

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur in vitro Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV und Hepatitis B und C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme 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 der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure 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 Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller abgesprochen wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.

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 zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettivolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller - der Immundiagnostik zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Heinichen et al., 1995; Clin. Lab. 41, 539-545
2. Oremek et al., 1995; MTA 10, 273-278.

13.04.2010_PMN-Elastase.DOC

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Hersteller		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		

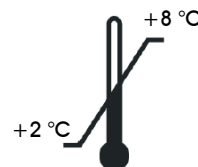
PMN-Elastase ELISA KIT

For the in vitro determination of PMN-Elastase in serum, plasma,
seminal plasma and stool

Valid from 13.04.2010



K 6830



1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of **PMN-Elastase** in serum, seminal plasma and stool. It is for in vitro diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

PMN-Elastase from human polymorphnuclear granulocytes is a glycoprotein of 30 kDa which belongs to the group of serine proteases. Active **PMN-Elastase** is released from azurophil granula of neutrophil granulocytes after irritation or disintegration. The determination of the **PMN-Elastase** in stool is used to record inflammatory reactions in which neutrophils are involved. Especially in Crohn's disease the inflammatory process goes hand in hand with an increased phagocytic activity and the biological decay of the phagocytic cells, thus, leading to an increased release of **PMN-Elastase** and other lysosomal enzymes.

Indication

- Activation marker for Morbus Crohn
- Chronic joint inflammation
- Bacterial infection, sepsis

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 6830MTP	PLATE	Microtiter plate, precoated	12 x 8 wells
K 6830WB	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6830EP	EXBUF	Extraction buffer concentrate 2.5 x	2 x 100 ml
K 6830A2	AB	Detection antibody (Second antibody, mouse anti-PMN-Elastase, monoclonal), lyophilized	2 vials
K6840K	CONJ	Peroxidase-labeled antibody (goat-anti-mouse-POD)	15 ml
K 6830CAL	CAL	Calibrator, lyophilized	4 vials
K 6830KO1	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 vials
K 6830KO2	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 vials
K 6830TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6830AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated to deliver 10-1000 µl
- Covering foil for the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- 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 450 nm

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay** (e.g. diluted antibody is not stable). The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagent with volumes **less than 100 µl** must be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) must be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.). Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C using a water bath **before dilution of the buffer solutions**. The buffer concentrate (WASHBUF) is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted solutions can be stored at 2-8°C for 1 month.
- Use **100 µl of diluted wash buffer as a BLANK**. Pipette into the respective well.
- The **EXBUF** (extraction buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:2.5** before use (90 ml concentrate + 135 ml aqua bidest.). Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved in a water bath at 37°C before dilution. The **EXBUF** (extraction buffer concentrate) is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted buffer solution can be stored in a closed flask at 2-8°C for fore months.
- The lyophilized **AB** (secondary antibody, detection antibody) is stable at 2-8°C. Prior to use, the AB is **reconstituted with 600 µl aqua bidest.** Allow the vial to stand for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. The AB is then **diluted 1:20** in ELISA wash buffer (e.g. 500 µl AB + 9.5 ml ELISA wash buffer). The **undiluted reconstituted antibody** is stable at -20° C until the expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and cannot be stored.**
- The **CAL** (calibrator) must be reconstituted with **0.5 ml** of aqua bidest. (please see the product specification).

- The **CTRL** (controls) must be reconstituted with **0,5 ml** of aqua bidest. (please see the product specification). Mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution.

Reconstituted calibrator and controls are not stable and cannot be stored.

- All other test reagents are ready for use. The test reagents are stable up to the date of expiry (see label of test package) when stored at 2-8°C.

6. SAMPLE PREPARATION

Extraction step of the stool sample

Please use the **extraction buffer** as a sample extraction buffer.

1. We recommend the use of a stool sample preparation kit for dosing of 100 mg of stool sample (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; cat # 745804). Add 5 ml buffer to the stool sample in the preparation kit.

Constant buffer volume: 5 ml

Constant dilution factor: 1 : 50

2. Alternatively, stool samples can be manually weighted within the range of 80 – 120 mg. Please note the exact sample amount!
 - a. Add **5 ml** buffer to the stool sample independent of the sample amount.

Constant buffer volume: 5 ml

Variable dilution factor

The dilution factor varies depending on the sample amount which must be considered in the subsequent calculations. Please see the list of the correction factors below:

Weight [mg]	Buffer Volume [ml]
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
100	50

Weight [mg]	Buffer Volume [ml]
102	49.0
104	48.1
106	47.2
108	46.3
110	45.5
112	44.6
114	43.9
116	43.1
118	42.4
120	41.6

- b. **The buffer volume** for the individual samples **varies** depending on the sample amount (see table).

Variable buffer volume

Constant dilution factor: 1 : 50

Therefore, the same dilution factor can be used for all samples in the subsequent evaluation of the results .

Weight [mg]	Buffer Volume [ml]
80	4.0
82	4.1
84	4.2
86	4.3
88	4.4
90	4.5
92	4.6
94	4.7
96	4.8
98	4.9
100	5.0

Weight [mg]	Buffer Volume [ml]
102	5.1
104	5.2
106	5.3
108	5.4
110	5.5
112	5.6
114	5.7
116	5.8
118	5.9
120	6.0

Afterwards, mix the weighed stool sample with the buffer and vortex for 30 sec. Transfer ca. 1 ml stool suspension in an Eppendorf-cup and centrifuge for 5 min at 13000 rpm. For analysis, pipet **100 µl** of the supernatant per well. **The supernatant is not stable and can not be stored.** We recommend to weight fresh sample amount for a new assay, if the analysis should be repeated.

Seminal plasma

Seminal plasma should be stored at -20°C and defrosted immediately before use. Centrifuge the seminal-plasma samples for 5 minutes at 10000 rpm.

The samples should be diluted **1:10 - 1:20** in the ELISA wash buffer depending on the inflammatory status of the patient.

Serum and Plasma samples

Preanalytic handling

Significant differences in the PMN-Elastase levels can be observed due to different sample preparation procedures, e. g. up to 10-fold higher serum levels compared to the plasma PMN-Elastase concentrations. The reasons are as follows:

The granulocytes are activated during the serum clotting and release elastase granulocyte-activating markers. The time between serum collecting and analysis as well as repeated freeze-thaw cycles don't cause a PMN-Elastase 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 PMN-Elastase levels. Therefore, the preanalytical conditions of plasma samples should be held constant. This is a general requirement independent of the used test-system.

Immundiagnostik recommends the use of serum samples for PMN-Elastase determinations.

Fresh collected blood should be centrifuged within one hour. If not assayed on the same day, it should be stored at -20 °C. Lipemic or hemolytic samples should be not analysed. Samples should be mixed well before assaying. We recommend to carry out duplicate analysis on each test sample.

Serum samples should be diluted **1:500** with the ELISA-wash buffer before assaying.

Plasma samples should be diluted **1:100** with the ELISA-wash buffer before assaying.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

In a first incubation step, **PMN-Elastase** in the sample is bound to polyclonal sheep-anti-PMN-Elastase antibodies (in excess), which are immobilized on the surface of the microtiter wells (PLATE). To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a monoclonal mouse-anti-PMN-Elastase antibody (AB) is added. This antibody is able to detect both the free and the complexed form with the specific inhibitor (α 1-Proteinase inhibitor = α 1-Antitrypsin). The quantification of the bound **PMN-Elastase** is carried out by adding an anti-mouse peroxidase-labeled conjugate (CONJ). Finally, the **PMN-Elastase**-antigen-antibody-complex is incubated with the peroxidase substrate, tetramethylbenzidine (SUB). An acidic stop solution (STOP) is then 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 **PMN-Elastase** in the sample. Samples are quantified by referring their optical density to a Lot-dependant master calibration curve and the use of a Calibrator that is run with each test. The combination of two specific antibodies in the **PMN-Elastase** ELISA drastically reduces the possibility of false results and offers a reliable diagnostic system to the user.

Test procedure

1.	Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature and mix by gentle swirling and inversion.
2.	Mark the positions of BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Blank / Calibrator / Controls / Sample) in duplicate on a protocol sheet
3.	Take PLATE (microtiter strips) out of the kit. Store unused strips in the original package bag at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label
4.	Wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer. After the last wash, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel
5.	Add 100 µl of BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Blank / Calibrator / Controls / Sample) in duplicate into respective well
6.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer
7.	Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer. After the last wash, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel
8.	Add 100 µl of AB (Detection antibody, 2nd Antibody) into each wells mix gently

9.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer
10.	Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer. After the last wash, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel
11.	Add 100 µl of CONJ (Conjugate) into each well
12.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer
13.	Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer. After the last wash, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel
14.	Add 100 µl of SUB (Substrate) into each well
15.	Incubate for 5 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark
16.	Add 50 µl of STOP (Stop solution) into each well, shake well
17.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 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

8. RESULTS

For result evaluation, please use a four parametric logit-log model based on the standard curve of the respective kit lot and the Calibrator value (CAL). All essential information on the standard curve is provided on the QC data sheet of the respective product lot.

The calibration curve can be expressed either by the concentration of each standard with its corresponding optical density or by the four parameters A, B, C and D. In both cases the optical density of the calibrator (CAL) is essential.

Depending on your evaluation software program, either the one or the other kind of data described above should be entered.

Caution: Please make sure that all parameters and values are transferred accurately into your software as minor deviations can cause severe errors during evaluation.

The plausibility of replicate values should always be examined after automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the replicate values should be done manually by the operator.

Faeces

To obtain the PMN-Elastase concentration in fecal samples multiply the estimated value by the dilution factor according to the sample preparation:

Sample preparation 1 and 2b: **Dilution factor constant : 1 : 50**

Multiply the obtained result by **50** to get the real concentration.

Sample preparation 2a: **The dilution factor is variable,**
dependent on the sample amount, and is taken from the table.

Multiply the obtained result by **the corresponding dilution factor** to get the real concentration.

Seminal plasma

For the calculation of the PMN-Elastase concentration in seminal plasma, the result has to be multiplied by **10 or 20** dependent on the sample dilution.

Serum

For the calculation of the PMN-Elastase concentration in serum, the result has to be multiplied by **500**.

Plasma

For the calculation of the PMN-Elastase concentration in plasma, the result has to be multiplied by **100**.

9. LIMITATIONS

Samples with PMN-Elastase levels greater than the highest calibrator, should be further diluted and re-assayed.

Increased concentrations of PMN-Elastase in seminal plasma support the diagnosis of an acute or chronic Adnexitis. In the case of simultaneous Urethritis anterior, the obtained results are elevated due to contamination of the ejaculate with granulocytes and can not be used. A possible presented Urethritis anterior is easy for diagnosis. In this case, the obtained results must be excluded or the patients treated before taking samples for PMN-Elastase analysis. Only such data can be used for a reliable diagnosis, especially by existing Adnexitis.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of commercial control samples for internal quality control.

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. 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 lying outside the acceptable limits.

Expected values

(1g stool be equivalent to 1 ml)

PMN-Elastase concentrations in faeces of a healthy person (n=76):

< 62 ng/ml

PMN-Elastase concentrations in plasma of a healthy person (n=37):

19-78 ng/ml

PMN-Elastase concentrations in serum of a healthy person (n = 52):

average = 688 ng/ml (186 – 1991ng/ml)

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=20)		
Probe	PMN Elastase [ng/ml]	Vk [%]
1	2.3	14
2	0.72	4.5

Inter-Assay (n=20)		
Probe	PMN Elastase [ng/ml]	Vk [%]
1	4.9	4
2	27.8	10

Recovery

Two samples were spiked with different PMN-Elastase calibrator amounts and measured with the assay.

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	PMN-Elastase Expected [ng/ml]	PMN-Elastase Measured [ng/ml]
1.5	3	4.5	4.9
	6	7.5	7.7
0.75	5	5.75	5.7
	1.65	2.4	2.7
	0.65	1.4	1.5

Sensitivity

The sensitivity limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$. The Zero-standard was measured 20 times.

Sample	PMN-Elastase Mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [ng/ml]
1	0.025	0.024	0.12

Cross reactivity

No cross reactivity to other proteins in stool and serum was observed.

Cross reactivity with PMN-elastase as well as a good correlation with PMN-elastase content in mouse serum was observed.

Linearity

Two patient samples were diluted with ELISA wash buffer and analyzed with the Immundiagnostik PMN-Elastase ELISA test.

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
A	undiluted	22	22
	1:2	11	10.3
	1:4	5.5	5.3
	1:8	2.7	2.7
B	undiluted	4.6	4.6
	1:2	2.3	2.4
	1:4	1.2	1.3
	1:8	0.6	0.9

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 and thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic color reactions are described to be also toxic and carcinogenic. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- Stop solution consists of sulfuric 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 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 added to the plate.
- 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.
- Incubation time, incubation temperature and the volumes of the different components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage resulting from this.








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.
- The kit components made of human serum are tested for Hepatitis B, Hepatitis C and HIV and found to be negative. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. The normal precautions for laboratory work should be observed.
- 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 volumes of the different 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 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 of received of the product. The product shall be send to Immundiagnostik together with the complaint in writing.

15. REFERENCES

1. Heinichen et al.: 1995; Clin. Lab. **41**, 539-545
2. Oremek et al.: 1995; MTA **10**, 273-278.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		Contains sufficient for <n> tests
	Manufacturer		Use by
	Lot number		