

Lysozym ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung des Lysozym aus Serum, Stuhl, Urin und
Liquor

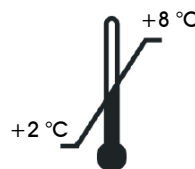
Lysozyme ELISA Kit

For the in vitro determination of Lysozyme in serum, stool, urine
and liquor

Gültig ab/valid from 06.04.2010



K 6901



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

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Lysozym aus humanem Serum, Stuhl, Urin und Liquor. Der Testkit ist nur zur in vitro Diagnostik geeignet.

2. EINLEITUNG

Lysozym (Muramidase) ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 15 kDa und gehört zur Gruppe der basischen Glykosidasen. Lysozym wird von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen gebildet. Die Hauptquelle für fäkales Lysozym stellen die intestinalen Granulozyten dar. In allen Zellen des entzündlichen Infiltrates kann beim akuten Schub des Morbus Crohn Lysozym nachgewiesen werden. Teilweise wird Lysozym von mononukleären Zellen auch aktiv in das Darmlumen sezerniert.

Indikation:

- Diagnose und Verlauf bei Morbus Crohn
- Früherkennung von Nierentransplantat-Abstoßungsreaktionen
- Unterscheidung und Verlaufskontrolle von Leukosen
- Verlaufs- und Therapiekontrolle kindlicher Harnwegsinfekte
- Differentialdiagnose zwischen viraler und bakterieller Meningitis bei Kindern
- Erkennung einer Sepsis bei Neugeborenen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6901MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6901WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6901VP	CONJBUF	Konjugat-Verdünnungspuffer	1 x 15 ml
K 6901K	CONJ	Konjugat, (Kaninchen anti Lysozym, Peroxidase-markiert)	1 x 50 µl
K 6901CAL	CAL	Kalibrator, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 6901KO1	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1ml
K 6901KO2	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1ml
K 6901TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6901AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 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**. 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 Konzentrat + 900 ml aqua bidest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C 1 Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Das **Konjugat** (CONJ, Peroxidase markierter Antikörper) wird **1:1000** mit Konjugat-Verdünnungspuffer (CONJBUF) verdünnt (10 ml CONJBUF + 10 µl PO-Antikörper). Der PO-Antikörper ist im unverdünnten Zustand bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei 2-8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlprobenextraktion

Der Waschpuffer 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.

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

Danach wird ca. 1 ml von der Suspension (**Verdünnung I**) in ein verschließbares Einweggefäß (z. B. von Eppendorf) überführt und für 5 Minuten bei 13000 rpm ($\approx$ 13000 g) zentrifugiert.

Probenverdünnung

Stuhl

Der Überstand der Extraktion wird **1:2** mit verdünntem **Waschpuffer** (WASHBUF) verdünnt (z.B. 500 µl Überstand der Verdünnung I + 500 µl WASHBUF = **Verdünnung II**). Daraus folgt eine Endverdünnung von **1:100**.

100 µl des Überstandes der Verdünnung II werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

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

Serum

Frisch abgenommenes Serum wird innerhalb einer Stunde abzentrifugiert. Es wird entweder gleich 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.

Für die Messung empfehlen wir die Serumproben zwischen **1:500** und **1:1000** zu verdünnen. Für die Verdünnungen wird **Waschpuffer** verwendet.

Beim Arbeiten mit kleinen Volumina ist auf die Verwendung geeicher Pipetten und auf besonders sorgsamem Umgang zu achten (z. B. Pipettenspitze nach der Entnahme abstreifen).

Urin

Für die Messung empfehlen wir die Urinproben **1:5 mit Waschpuffer** zu verdünnen.

Liquor

Für die Messung empfehlen wir die Liquorproben **1:50 mit Waschpuffer** zu verdünnen.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte Antikörper, die humanes Lysozym erkennen, verwendet.

Standards, Kontrollen und verdünnte Proben, die auf Lysozym zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen anti-Lysozym Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Lysozym aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat, ein Peroxidase-markierter anti-Lysozym Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes Lysozym – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Lysozym-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
Positionen für BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Leewert / Kalibrator / Kontrollen / Probe) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren
Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden
Waschen Sie die Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer). Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
100 µl für BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Leewert / Kalibrator / Kontrollen / Probe) in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren
Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
Pipettieren Sie 100 µl CONJ (Konjugat) in alle Wells

Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
Pipettieren Sie 100 µl SUB (Substrat) in alle Wells
10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren
Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells, 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

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 Lysozym-Konzentration der Stuhlprobe wird auf Grund der Probenvorbereitung wie im folgendem Beispiel berechnet:

Probenvorbereitung 1 und 2b: Verdünnungsfaktor konstant: 1:50

Die ermittelte Lysozym-Konzentration wird mit **100** multipliziert (Verdünnung I x Verdünnung II) um die Konzentration im Stuhl zu bestimmen.

Probenvorbereitung 2a: Der Verdünnungsfaktor ist variabel

Die ermittelte Lysozym-Konzentration wird mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor aus der Tabelle (Verdünnungsstufe I) und mit 2 (Verdünnungsstufe II) multipliziert.

Serumproben

Die ermittelte Serumkonzentration wird je nach Verdünnungsstufe mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

Urinproben

Die ermittelten Werte werden mit dem Verdünnungsfaktor **5** multipliziert.

Liquorproben

Die ermittelten Werte werden mit dem Verdünnungsfaktor **50** multipliziert.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Lysozym-Konzentration größer als der höchste Standard sollten mit Waschpuffer verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen 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

Referenzbereiche

Stuhl

< 600 ng/ml (augenscheinlich gesunde Personen)

Serum

700 - 2580 ng/ml

Die Lysozymkonzentration wird durch Produktion in Monozyten, Makrophagen, Granulozyten sowie im Nierenparenchym beeinflusst.

Lysozym erhöht bei: myelo-monozytäre Leukosen, Sarkoidose

Lysozym vermindert: Neugeborenen-Sepsis, Panmyelopathie

Urin

1,7 - 123 ng/ml

Lysozym im Urin ist erhöht bei: myelomonozytären Leukämien, kindlichen Harnwegsinfekten

Lysozym im Urin ist vermindert bei: Panmyelopathien

Liquor

< 62 ng/ml

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=20)		
Probe	Lysozym [ng/ml]	Vk [%]
1	6.8	8
2	1.4	13

Inter-Assay (n=20)		
Probe	Lysozym [ng/ml]	Vk [%]
1	5.6	17

Wiederfindung

Verschiedene Lysozym Proben wurden mit unterschiedlichen Spikes gemessen.

Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Lysozym erwartet [ng/ml]	Lysozym Gemessen [ng/ml]
1.5	3	4.5	5.5
1.5	6	7.5	7.1
0.75	5	5.8	5.7
0.75	1.7	2.4	2.7
0.75	0.7	1.4	1.5

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20 mal der Standard null.

Probe	Lysozym Mittelwert [OD]	Standardab- weichung	Nachweis- grenze [ng/ml]
1	0.184	0.029	0.5

Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen gefunden.

Linearität

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	unverdünnt	15.3	15.3
	1:2	7.7	7.5
	1:4	3.8	3.9
	1:8	1.9	<NWG
B	unverdünnt	9.3	9.3
	1:2	4.65	6.0
	1:4	2.3	4.1
	1:8	1.16	1.6

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 befunden. 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 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 benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen 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 Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Der Assay 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 Pipettiervolumina 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.Hemrika et al., 1989; Neth. J. Med.34, 174
- 2.Arndt et al., 1993; Crohn. Klin. Lab. 11, 867 - 876
- 3.Stein, J.et al., 1996; 3. Post-Graduiertenkurs der DGVS

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

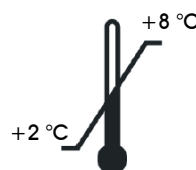
Lysozyme ELISA Kit

For the in vitro determination of Lysozyme in serum, stool, urine
and liquor

Valid from 06.04.2010



K 6901



1. INTENDED USE

This ELISA is intended for the quantitative determination of Lysozyme in human serum, stool, urine and liquor. It is for in vitro diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Lysozyme (muramidase) is a protein with a molecular weight of approx. 15 kDa and belongs to the group of alkaline glycosidases. **Lysozyme** is produced by granulocytes, monocytes and macrophages. The main source for faecal **Lysozyme** are the intestinal granulocytes. **Lysozyme** can be detected in all cells of the inflammatory infiltrate during an acute attack of Crohn's disease. To some extent, **Lysozyme** is also secreted actively by mononuclear cells into the bowel lumen.

Indication

- Diagnosis and monitoring of Crohn's Disease
- Early diagnosis of rejection reactions in kidney transplantation cases
- Differential diagnosis and monitoring of leukosis
- Diagnosis and treatment monitoring of urinary tract infections in children
- Differential diagnosis between viral and bacterial meningitis in children
- Identification of sepsis in neonates

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 6901MTP	PLATE	one holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6901WP	WASHBUF	ELISA wash concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6901VP	CONJBUF	Conjugate dilution buffer	1 x 15 ml
K 6901K	CONJ	Conjugate, (Rabbit-anti-Lysozyme, Peroxidase-labeled)	1 x 50 µl
K 6901CAL	CAL	Calibrator, ready to use	1 x 1 ml
K 6901KO1	CTRL	Control, ready to use	1 x 1 ml
K 6901KO2	CTRL	Control, ready to use	1 x 1 ml
K 6901TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	1 x 15 ml
K 6901AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 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 one time, make sure that the reagents are carefully stored at 2-8°C. 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.
- Reagents with a volume less than 100 µl should be centrifuged before use to avoid losses.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (add 900 ml of a. bidest. to 100 ml concentrate). Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals have to be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath **before dilution of the buffer solutions**. The buffer concentrates are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted solutions could be stored at 2-8°C for 1 month.
- The **Conjugate** (CONJ, POD antibody) must be diluted **1:1000** in conjugate dilution buffer (10 µl CONJ and 10 ml CONJBUF). The antibody is stable at 2-8 °C until expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready for use. The test reagents are stable up to the date of expiry (see label of test package) when stored at 2-8°C.

6. SAMPLE PREPARATION

Extraction step of the stool sample

The **diluted wash buffer** is used as 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]	Dilution factor
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]	Dilution factor
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 (dilution step I) in an Eppendorf-tube and centrifuge for 5 min at 13000 rpm.

Dilution of samples

The supernatant of the extraction (dilution step I) must be diluted 1:2 with wash buffer (e.g. 500 µl supernatant of the extraction + 500 µl wash buffer = dilution step II)

For analysis, pipet **100 µl** of the supernatant of dilution step II 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.

Serum

Serum should be centrifuged within one hour after collection. Store samples at -20 °C if not assayed on the same day. Lipemic or hemolytic samples may give false results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend that STD, CTRL and SAMPLE are assayed in duplicate..

Samples are diluted between **1:500** and **1:1000 with wash buffer**.

Use this dilution factor to calculate the Lysozyme concentration.

Urine

We recommend a dilution of **1:5 in wash buffer** for the urine samples before analysis.

Liquor

We recommend a dilution of **1:50 in wash buffer** for the liquor samples before analysis.

7. ASSAY PROCEDURE**Principle of the test**

The assay utilizes the “sandwich” technique with two selected antibodies that recognize human Lysozyme.

Standards, controls and diluted samples, which are assayed for human Lysozyme, are added into the wells of a micro plate coated with a high affine anti-human Lysozyme antibody. During the first incubation step, Lysozyme is bound by the immobilized antibody. Then a peroxidase-conjugated anti-human Lysozyme antibody is added into each microtiter well and a “sandwich” of capture antibody - human Lysozyme – peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the enzymatic reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of Lysozyme. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. Lysozyme present in the 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 and mix by gentle swirling and inversion.
Mark the positions of BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Blank / Calibrator / Controls / Sample) in duplicate on a protocol sheet
Take microtiter strips out of the kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
Wash the wells 5x with 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting the plate against paper towel after the last wash
Add 100 µl of BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Blank / Calibrator / Controls / Sample) in duplicate into respective well
Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer
Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting the plate against paper towel after the last wash
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 and wash the wells 5x with 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting the plate against paper towel after the last wash

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, shake well

Determine the absorption 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

9. LIMITATIONS

Samples with Lysozyme value greater than the highest calibrator should be diluted 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. If one or more of the quality sample values are outside the acceptable limits, the results of the patient samples may be invalid.

Expected values

Reference ranges

Stool

< 600 ng/ml (obviously healthy persons)

Serum

700 - 2580 ng/ml

The lysozyme concentration depends on its production by monocytes, macrophages, granulocytes as well as kidney parenchyma cells.

Lysozyme is elevated in: myelomonocytic leukosis, sarcoidosis

Lysozym is reduced in: newborn sepsis, panmyelopathy

Urine

1,7 - 123 ng/ml

Lysozyme in urine is elevated in: myelomonocytic leukemia, urinary passage infection of children

Lysozyme in urine is reduced in: panmyelopathy

Liquor

< 62 ng/ml

It is recommended for each laboratory to establish its own normal range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=20)		
Probe	Lysozyme [ng/ml]	Vk [%]
1	6.8	8
2	1.4	13

Inter-Assay (n=20)		
Probe	Lysozyme [ng/ml]	Vk [%]
1	5.6	17

Recovery

Two samples were spiked with Lysozyme calibrator and measured using this assay.

Recovery n=2

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Lysozyme expected [ng/ml]	Lysozyme measured [ng/ml]
1.5	3	4.5	5.5
1.5	6	7.5	7.1
0.75	5	5.8	5.7
0.75	1.7	2.4	2.7
0.75	0.7	1.4	1.5

Sensitivity

n=20

Sample	Lysozyme mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [ng/ml]
1	0.184	0.029	0.5

Cross reactivity

No cross reactivity to other plasma proteins was observed.

Sample dilution

Linearity n= 2

Two patient serum samples were diluted with ELISA wash buffer. The results are shown below:

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
A	undiluted	15.3	15.3
	1:2	7.7	7.5
	1:4	3.8	3.9
	1:8	1.9	<detection limit
B	undiluted	9.3	9.3
	1:2	4.65	6.0
	1:4	2.3	4.1
	1:8	1.16	1.6

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, 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 receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik together with the complaint in writing.

15. REFERENCES

1. Hemrika et al.: 1989; Neth. J. Med. 34, 174
2. Arndt et al.: 1993, Crohn. Klein. Lab. 11, 867
3. Stein, J. et al.: 1996; 3. Post-Graduiertenkurs der DGVS

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number