

# Lysozym ELISA Kit

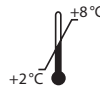
*Zur in-vitro-Bestimmung von Lysozym aus Serum, Urin und Liquor*

# Lysozyme ELISA Kit

*For the in vitro determination of lysozyme in serum, urine and liquor*

Gültig ab / Valid from 2015-03-03

**REF** K 6903



**IVD** **CE**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>3</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>4</b>
<i>Testprinzip</i>	4
<i>Pipettierschema</i>	5
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>6</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>7</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>7</b>
<i>Referenzwerte</i>	8
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>8</b>
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Spike-Wiederfindung</i>	9
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Spezifität</i>	9
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>9</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>10</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>11</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>11</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Lysozym aus humanem Serum, 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.

### Indikationen

- 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

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6903	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6903	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6903	CONJBUF	Konjugat-Verdünnungspuffer	1 x 15 ml
K 6903	CONJ	Konjugatkonzentrat, (Kaninchen-anti-Lysozym, peroxidase markiert)	1 x 50 µl
K 6903	CAL	Kalibrator, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 6903	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 6903	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 6903	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6903	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

\* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ·cm).

#### 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum 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 Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Als **BLANK** (Leerwert) werden **100 µl verdünnter WASHBUF** (Waschpuffer) pipettiert.

- Das **Konjugatkonzentrat** (CONJ, peroxidasemarkierter Antikörper) wird **1:1000** mit **Konjugat-Verdünnungspuffer** (CONJBUF) verdünnt (10 ml CONJBUF + 10 µl CONJ). Das Konjugat 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. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### Serum

Frisch abgenommenes Serum wird innerhalb einer Stunde abzentrifugiert. Es wird entweder gleich im Test eingesetzt oder bei **-20°C gelagert**.

Die Lysozym-Bestimmung sollte innerhalb von **8 Stunden** erfolgen, danach tritt bei **Raumtemperatur** ein Konzentrationsabfall auf. Bei **4 °C** beträgt die Stabilität **6 Tage**.\*

Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test Proben gut mischen.

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 geeichter Pipetten und auf besonders sorgsamem Umgang zu achten (z. B. Pipettenspitze nach der Entnahme abstreifen).

\*Thomas, L., 1998, Labor und Diagnose, 5th ed. TH-Books, Frankfurt.

### 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.

Kalibrator, 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 peroxidasemarkierter anti-Lysozym-Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes Lysozym – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin 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. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Anhand eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Musterkalibrierkurve lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### *Pipettierschema*

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen, nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Positionen für <b>BLANK/CAL/SAMPLE/CTRL</b> (Blank/Kalibrator/Probe/Kontrollen) im Protokollblatt markieren.
2.	Die Mikrotiterstreifen <b>5 x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF</b> (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
3.	<b>100 µl BLANK/CAL/SAMPLE/CTRL</b> (Blank/Kalibrator/Probe/Kontrollen) in die Vertiefungen pipettieren.
4.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.

5.	Inhalt der Wells verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl verdünntem WASH-BUF</b> (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6.	<b>100 µl verdünntes CONJ</b> (Konjugat) in alle Wells pipettieren.
7.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren.
8.	Inhalt der Wells verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl verdünntem WASH-BUF</b> (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9.	<b>100 µl SUB</b> (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
10.	<b>10–20 Minuten*</b> bei Raumtemperatur (15–30°C) im <b>Dunkeln</b> inkubieren.
11.	<b>100 µl STOP</b> (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, mischen.
12.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion einer Probe den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> 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

Für die Auswertung der Messwerte verwenden Sie bitte ein 4-parametrisches Logit-Log-Modell unter Verwendung der Angaben zum 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.



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.

### **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 Konzentrationen oberhalb des Messbereichs müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*Nachweisgrenze × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

## **10. QUALITÄTSKONTROLLE**

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

## Referenzwerte

### 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

\* Labor Dr. Limbach, Heidelberg, <http://www.labor-limbach.de>

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Präzision und Reproduzierbarkeit

#### Intra-Assay (n = 26)

Probe	Lysozym [ng/ml]	VK [%]
A	658,4	2,2
B	397,9	2,8

#### Inter-Assay (n = 18)

Probe	Lysozym [ng/ml]	VK [%]
1	696,5	4,6
2	391,4	6,4

### Spike-Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen Lysozymmengen versetzt und gemessen ( $n = 2$ ).

Probe	Ungespikete Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Lysozym erwartet [ng/ml]	Lysozym gemessen [ng/ml]
A	0,46	1,8	2,26	2,17
		2,7	3,16	3,21
		5,0	5,46	5,51
B	0,74	1,8	2,54	2,48
		2,7	3,44	3,50
		3,7	4,44	4,65

### Wiederfindung in der Verdünnung

Eine Probe wurde verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt ( $n = 1$ )

Probe	Verdünnung	Lysozym erwartet [ng/ml]	Lysozym gemessen [ng/ml]
A	1:500	626,3	626,3
	1:1000	313,2	324,2
	1:2000	156,6	173,0

### Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 + 1,645 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 21-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,144 ng/ml.

### Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen gefunden.

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigegeführten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

## 15. LITERATUR

1. Langhorst, Jost, Sigrid Elsenbruch, Twyla Mueller, Andreas Rueffer, Guenther Spahn, Andreas Michalsen, and Gustav J Dobos. 2005. "Comparison of 4 Neutrophil-Derived Proteins in Feces as Indicators of Disease Activity in Ulcerative Colitis." *Inflammatory Bowel Diseases* **11** (12) (December): 1085–91.
2. Pettersson, C, H Karlsson, M Ståhlman, T Larsson, B Fagerberg, M Lindahl, O Wiklund, J Borén, and L Fogelstrand. 2011. "LDL-Associated Apolipoprotein J and Lysozyme Are Associated with Atherogenic Properties of LDL Found in Type 2 Diabetes and the Metabolic Syndrome." *Journal of Internal Medicine* **269** (3) (March): 306–21. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02292.x.
3. Schwaab M., Euteneuer M., Lautermann J., Sudhoff H. 2005. "Lysozym Und Laktoferrin in Adenoiden, Hyperplastischen Und Chronisch Entzündeten Tonsillen - Eine Quantitative Analyse." *Laryngo-Rhino-Otologie* **84**: 660–664. doi:10.1055/s.
4. Volman, Julia J, Ronald P Mensink, Wim a Buurman, and Jogchum Plat. 2011. "In Vivo Effects of Dietary (1→3), (1→4)-B-D-Glucans from Oat on Mucosal Immune Responses in Man and Mice." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **46** (5) (May): 603–10. doi:10.3109/00365521.2010.545830.
5. West, N P, D B Pyne, J M Kyd, G M Renshaw, P A Fricker, and A W Cripps. 2010. "The Effect of Exercise on Innate Mucosal Immunity." *British Journal of Sports Medicine* **44** (4) (March): 227–31. doi:10.1136/bjism.2008.046532.

**Verwendete Symbole:**

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer

*In-Vitro*-Diagnostikum

Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen

Chargenbezeichnung



Verwendbar bis

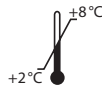
**Manual**

# Lysozyme ELISA Kit

*For the in vitro determination of lysozyme in serum, urine  
and liquor*

Valid from 2015-03-03

**REF** K 6903



**IVD**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>15</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>16</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>17</b>
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>17</b>
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	18
<b>8. RESULTS</b>	<b>19</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>20</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>20</b>
<i>Reference range</i>	20
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>21</b>
<i>Analytical Sensitivity</i>	21
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Spiking Recovery</i>	21
<i>Dilution recovery</i>	22
<i>Specificity</i>	22
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>22</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>22</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>23</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>23</b>



## 1. INTENDED USE

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

## 2. INTRODUCTION

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.

### Indications

- 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

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6903	PLATE	one holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6903	WASHBUF	ELISA wash concentrate 10 x	2 x 100 ml
K 6903	CONJBUF	Conjugate dilution buffer	1 x 15 ml
K 6903	CONJ	Conjugate concentrate, (rabbit-anti-lysozyme, Peroxidase-labeled)	1 x 50 µl
K 6903	CAL	Calibrator, ready to use	1 x 1 ml
K 6903	CTRL	Control, ready to use	1 x 1 ml
K 6903	CTRL	Control, ready to use	1 x 1 ml
K 6903	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	1 x 15 ml
K 6903	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

#### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

\* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

#### 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- Use **100 µl** of **diluted WASHBUF** (wash buffer) as **BLANK**. Pipet into the respective well.
- The **conjugate concentrate** (CONJ) must be diluted **1:1000 in conjugate dilution buffer** (100 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The concentrate is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### Serum

Serum should be centrifuged within one hour after collection. **Store samples at -20 °C** if not assayed on the same day.

Lysozyme should be determined within **8 hours**, after this time the concentration decreases at **room temperature**. The sample can be stored **6 days at 4 °C**.\*

Lipemic or hemolytic samples may give false results. Samples should be mixed well before assaying. Samples are diluted between **1:500** and **1:1000** with wash buffer.

Use this dilution factor to calculate the Lysozyme concentration.

\*Thomas, L., 1998, Labor und Diagnose, 5th ed. TH-Books, Frankfurt.

### Urine

We recommend a dilution of **1:5** with 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.

Calibrator, 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 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. Samples are quantified by referring their optical density to a lot-dependent master calibration curve and the use of the calibrator that is run with each test.

### Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips covered at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Mark the positions of <b>STD/CTRL/SAMPLE</b> (standard/control/sample) on a protocol sheet
2.	Wash the wells <b>5x with 250 µl of diluted WASHBUF</b> (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting the plate against paper towel after the last wash
3.	Add <b>100 µl of STD/CTRL/SAMPLE</b> (standard/control/sample) into respective well
4.	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature ( <b>15-30 °C</b> ) on a horizontal mixer
5.	Aspirate and wash the wells <b>5x with 250 µl of diluted WASHBUF</b> (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting the plate against paper towel after the last wash
6.	Add <b>100 µl diluted CONJ</b> (Conjugate) into each well
7.	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature ( <b>15-30 °C</b> ) on a horizontal mixer
8.	Aspirate and wash the wells <b>5x with 250 µl of diluted WASHBUF</b> (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting the plate against paper towel after the last wash
9.	Add <b>100 µl of SUB</b> (Substrate) into each well
10.	Incubate for <b>10 - 20 minutes*</b> at room temperature ( <b>15-30 °C</b> ) <b>in the dark</b>
11.	Add <b>100 µl of STOP</b> (Stop solution) into each well, mix well

12.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of a sample exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> against 620 nm as a reference.
-----	---

\* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

## 8. RESULTS

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 the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

### Serum

The result should be multiplied by the corresponding dilution factor to obtain the serum value.

### Urine

The estimated values are multiplied by a dilution factor of 5.

### Liquor

The estimated values are multiplied by a dilution factor of 50.

## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

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

*highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used*

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

*detection limit × sample dilution factor to be used*

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

### *Reference range*

#### **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

\* Labor Dr. Limbach, Heidelberg, <http://www.labor-limbach.de>

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Analytical Sensitivity*

The Zero-standard was measured 21 times. The detection limit was set as  $B_0 + 1.645 \cdot SD$  and estimated to be 0.144 ng/ml.

### *Precision and reproducibility*

#### **Intra-Assay (n = 26)**

Sample	Lysozyme [ng/ml]	CV [%]
A	658.4	2.2
B	397.9	2.8

#### **Inter-Assay (n = 18)**

Sample	Lysozyme [ng/ml]	CV [%]
A	696,5	4,6
B	391,4	6,4

### *Spiking Recovery*

Two samples were spiked with different lysozyme concentrations and measured using this assay (n = 2).

Sample	Unspiked Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Lysozyme expected [ng/ml]	Lysozyme measured [ng/ml]
A	0.46	1.8	2.26	2.17
		2.7	3.16	3.21
		5.0	5.46	5.51
B	0.74	1.8	2.54	2.48
		2.7	3.44	3.50
		3.7	4.44	4.65

### Dilution recovery

A patient sample was diluted and analyzed. The results are shown below (n = 1):

Sample	Dilution	Lysozyme expected [ng/ml]	Lysozyme measured [ng/ml]
A	1:500	626.3	626.3
	1:1000	313.2	324.2
	1:2000	156.6	173.0

### Specificity

No cross reactivity to other plasma proteins was observed.

## 12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

## 13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.



- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

## 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE









- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

## 15. REFERENCES

1. Langhorst, Jost, Sigrid Elsenbruch, Twyla Mueller, Andreas Rueffer, Guenther Spahn, Andreas Michalsen, and Gustav J Dobos. 2005. "Comparison of 4 Neutrophil-Derived Proteins in Feces as Indicators of Disease Activity in Ulcerative Colitis." *Inflammatory Bowel Diseases* **11** (12) (December): 1085–91.
2. Pettersson, C, H Karlsson, M Ståhlman, T Larsson, B Fagerberg, M Lindahl, O Wiklund, J Borén, and L Fogelstrand. 2011. "LDL-Associated Apolipoprotein J and Lysozyme Are Associated with Atherogenic Properties of LDL Found in Type 2 Diabetes and the Metabolic Syndrome." *Journal of Internal Medicine* **269** (3) (March): 306–21. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02292.x.
3. Schwaab M., Euteneuer M., Lautermann J., Sudhoff H. 2005. "Lysozym Und Laktoferrin in Adenoiden, Hyperplastischen Und Chronisch Entzündeten Tonsillen - Eine Quantitative Analyse." *Laryngo-Rhino-Otologie* **84**: 660–664. doi:10.1055/s.
4. Volman, Julia J, Ronald P Mensink, Wim a Buurman, and Jogchum Plat. 2011. "In Vivo Effects of Dietary (1→3), (1→4)-B-D-Glucans from Oat on Mucosal Immu-

- ne Responses in Man and Mice." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **46** (5) (May): 603–10. doi:10.3109/00365521.2010.545830.
5. West, N P, D B Pyne, J M Kyd, G M Renshaw, P A Fricker, and A W Cripps. 2010. "The Effect of Exercise on Innate Mucosal Immunity." *British Journal of Sports Medicine* **44** (4) (March): 227–31. doi:10.1136/bjism.2008.046532.

**Used symbols:**

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