

Lysozym ELISA Kit

Zur in-vitro-Bestimmung von Lysozym aus Stuhl

Lysozyme ELISA Kit

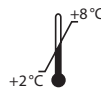
For the in vitro determination of lysozyme in stool

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Gültig ab / Valid from 09.09.2014

REF K 6900



IVD **CE**



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

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Lysozym aus Stuhl. 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 6900MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6900WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6900VP	CONJBUF	Konjugat-Verdünnungspuffer	1 x 15 ml
K 6900EP	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x	1 x 100 ml
K 6900K	CONJ	Konjugat, (Kaninchen-anti-Lysozym, Peroxidase-markiert)	1 x 50 µl
K 6900ST	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 1.1; 3.3; 10; 30 ng/ml)	5 x 1 vial
K 6900KO1	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 6900KO2	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6900TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6900AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz zentrifugiert 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.

- Das **Extraktionspufferkonzentrat *IDK Extract***[®] muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 150 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Extraktionspufferkonzentrat *IDK Extract***[®] kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Extraktionspuffer) ist bei **2–8 °C drei Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- 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

Die Probenstabilität ist wie folgt:

Rohstuhl: 3 Tage bei 2–8 °C sowie 3 Monate bei -20 °C;

Stuhlextrakt (1:100): 1 Tag bei Raumtemperatur (15–30 °C), 5 Tage bei 2–8 °C oder 7 Tage bei -20 °C, maximal 1 Einfrier-/Auftauzyklus.

Stuhlprobenextraktion

Der **verdünnte Extraktionspuffer *IDK Extract***[®] wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 1,5 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	1,5 ml
Verdünnungsfaktor:	1:100

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer *IDK Extract®* **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (orangefarbenes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstecken in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) Das Röhrchen solange mischen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres „Einweichen“ (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnung

1:100

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 Inkubati-

onsschritt 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 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

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

Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Markieren Sie die Positionen für STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrollen) im Protokollblatt
2.	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
3.	Pipettieren Sie 100 µl STD /SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrollen) in die Vertiefungen
4.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren
5.	Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASH-BUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
6.	Pipettieren Sie 100 µl verdünntes CONJ (Konjugat) in alle Wells
7.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren

8.	inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASH-BUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
9.	Pipettieren Sie 100 µl SUB (Substrat) in alle Wells
10.	10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren
11.	Pipettieren Sie 100 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells, mischen
12.	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 gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

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

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

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.

Stuhlproben

Die ermittelte Lysozym-Konzentration wird mit **100** multipliziert, um die Konzentration im Stuhl zu bestimmen.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

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

Anhand einer laborinternen Studie mit Matrix-proben von augenscheinlich Gesunden (n = 80) wurde ein Referenzbereich von < 600 ng/ml ermittelt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

Probe	Lysozym [ng/ml]	VK [%]
A	6,8	8
B	1,4	13

Inter-Assay (n = 20)

Probe	Lysozym [ng/ml]	VK [%]
A	5,6	17

Spike-Wiederfindung

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

Probe	Ungespikte Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Lysozym erwartet [ng/ml]	Lysozym gemessen [ng/ml]
A	1,5	3	4,5	5,5
		6	7,5	7,1
B	0,75	0,7	1,4	1,5
		1,7	2,4	2,7
		5	5,8	5,7

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2)

Probe	Verdünnung	Lysozym erwartet [ng/ml]	Lysozym 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

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,5 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 beigelegten 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 Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundia-

agnostik 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

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Lysozyme ELISA Kit

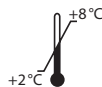
For the in vitro determination of lysozyme in stool

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Valid from 09.09.2014

REF K 6900



IVD **CE**



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

Table of Contents

1. INTENDED USE	16
2. INTRODUCTION	16
3. MATERIAL SUPPLIED	16
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	18
<i>Extraction of the stool samples</i>	18
7. ASSAY PROCEDURE	19
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Test procedure</i>	19
8. RESULTS	21
9. LIMITATIONS	21
10. QUALITY CONTROL	22
<i>Reference range</i>	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Precision and reproducibility</i>	22
<i>Spiking Recovery</i>	23
<i>Dilution recovery</i>	23
<i>Analytical Sensitivity</i>	23
<i>Specificity</i>	23
12. PRECAUTIONS	24
13. TECHNICAL HINTS	24
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24
15. REFERENCES	25

1. INTENDED USE

This ELISA is intended for the quantitative determination of lysozyme in stool. 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 6900MTP	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6900WB	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6900EP	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract®</i> 2.5x	1 x 100 ml
K 6900VP	CONJBUF	Conjugate dilution buffer	1 x 15 ml
K 6900K	CONJ	Conjugate concentrate, (rabbit-anti-lysozyme, peroxidase-labelled)	1 x 50 µl
K 6900ST	STD	Calibrators, ready to use (0; 1.1; 3.3; 10; 30 ng/ml)	5 x 1 ml
K 6900KO1	CTRL	Control, ready to use	1 x 1 ml
K 6900KO2	CTRL	Control, ready to use	1 x 1 ml
K 6900TMB	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine)	1 x 15 ml
K 6900AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

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**.
- The **extraction buffer concentrate** *IDK Extract*[®] must be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml concentrate + 150 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals must be redissolved at 37 °C in a water bath. The **extraction buffer concentrate** *IDK Extract*[®] is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** (extraction buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for three months**.
- 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

The sample stability is as follows:

Raw stool: 3 days at 2–8 °C as well as 3 months at -20 °C;

Stool extracts (1:100): 1 day at room temperature (15–30 °C), 5 days at 2–8 °C or 7 days at -20 °C, maximum 1 freeze-thaw cycle.

Extraction of the stool samples

Diluted extraction buffer *IDK Extract*[®] is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instructions for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample used and the volume of the buffer.

SAS with 1.5 ml extraction buffer:

Applied amount of stool: 15 mg

Buffer Volume: 1.5 ml

Dilution Factor: 1:100

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty sample tube** with **1.5 ml** of ready-to-use *IDK Extract*[®] extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (orange part of cap) to open. Insert the orange dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dip-

stick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.

- d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution: 1:100

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 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

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.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Mark the positions of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Controls) on a protocol sheet.
2.	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.
3.	Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Controls) into respective well.
4.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15-30 °C) on a horizontal mixer.
5.	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.
6.	Add 100 µl diluted CONJ (Conjugate) into each well.
7.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15-30 °C) on a horizontal mixer.
8.	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.
9.	Add 100 µl of SUB (Substrate) into each well.
10.	Incubate for 10 - 20 minutes* at room temperature (15-30 °C) in the dark.
11.	Add 100 µl of STOP (Stop solution) into each well, mix well.
12.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

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

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4 parameter algorithm".

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

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.

Stool

To obtain the lysozyme concentration of the samples, multiply the estimated value by the **dilution factor of 100**.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

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

Based on Immundiagnostik studies of stool samples of apparently healthy persons (n = 80), a reference value of lysozyme < 600 ng/ml was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

Sample	Lysozyme [ng/ml]	CV [%]
A	6.8	8
B	1.4	13

Inter-Assay (n = 20)

Sample	Lysozyme [ng/ml]	CV [%]
A	5.6	17

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	1.5	3	4.5	5.5
		6	7.5	7.1
B	0.75	0.7	1.4	1.5
		1.7	2.4	2.7
		5	5.8	5.7

Dilution recovery

Two patient samples were diluted and analyzed. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	Lysozyme expected [ng/ml]	Lysozyme 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

Analytical Sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 0.5 ng/ml.

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 sent 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 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.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number