

Arbeitsanleitung/Manual

MPO ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung von Myeloperoxidase (MPO) in Stuhl und Urin

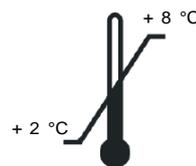
MPO ELISA Kit

For the in vitro determination of Myeloperoxidase (MPO) in stool and urine

Gültig ab / Valid from 17.08.2012



K 6630



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

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of contents	2
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
HINWEISE	7
PIPETTIERSCHEMA	8
10. ERGEBNISSE	9
STANDARDKURVE	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	10
12. QUALITÄTSKONTROLLE	10
ERWARTETE ERGEBNISSE	10
13. TESTCHARAKTERISTIKA	11
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	11
WIEDERFINDUNG	12
SENSITIVITÄT	12
LINEARITÄT	13
KREUZREAKTIVITÄT	13
14. LITERATUR	13
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14

1. INTENDED USE	17
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	17
3. PRINCIPLE OF THE TEST	17
4. MATERIAL SUPPLIED	18
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
7. PRECAUTIONS	19
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	20
9. ASSAY PROCEDURE	20
PROCEDURAL NOTES	20
TEST PROCEDURE	21
10. RESULTS	22
TYPICAL CALIBRATION CURVE	22
11. LIMITATIONS	23
12. QUALITY CONTROL	23
EXPECTED VALUES	23
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	24
RECOVERY	25
SENSITIVITY	25
SAMPLE DILUTION	26
CROSS REACTIVITY	26
14. REFERENCES	26
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **Myeloperoxidase (MPO)** aus Urin und Stuhl geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

MPO ist Teil des Abwehrmechanismus der polymorphnuklearen Leukozyten gegen körperfremde Stoffe. Wenn es zu einer bakteriellen Infektion kommt, wandern diese Leukozyten, stimuliert durch chemotaktisch wirksame Substanzen (Leukotriene, Komplementfaktoren, Bakterientoxine u.a.), zum Infektionsort. Dort lagern sie sich an die Fremdkörper an und umschließen diese. Wenn sich der Fremdkörper in einer Vakuole befindet, werden verschiedene Stoffe zur intravesikulären Verdauung eingesetzt. Dazu zählen **MPO**, kationische Proteine, Lysozyme, Lactoferrin und einige saure Hydrolasen. Es findet ein starker Schub des oxidativen Stoffwechsels statt, wobei in erhöhtem Maß Sauerstoffradikale entstehen. Durch diese Moleküle wird der Fremdstoff zerstört.

Bei diesem Vorgang gelangen einige dieser Abwehrstoffe in den extrazellulären Raum. Dies geschieht in erhöhtem Maß, wenn die Leukozyten den Fremdkörper aufgrund der Größe nicht umschließen können oder wenn sie selbst zerstört werden (durch Bakterientoxine, kristalline Substanzen u. a.).

MPO bildet mit H_2O_2 und einem Halogen ein sehr starkes antimikrobielles System, das eine Vielzahl von Mikroorganismen wirksam bekämpfen kann.

MPO ist in den neutrophilen Leukozyten in hoher Konzentration vorhanden, während Wasserstoffperoxid erst durch den Stoffwechselschub in stärkerem Maß gebildet wird oder durch die angegriffenen Mikroorganismen freigesetzt wird. Als benötigtes Halogen dient Chlorid, das in den Leukozyten in ausreichender Menge vorhanden ist. Jod ist etwa 100-fach effektiver aber nur in geringen Konzentrationen im Serum. Es kann durch jodierte Hormone, Thyroxin und Triiodthyronin, ersetzt werden. Sie werden während der Phagozytose durch die Leukozyten dejodiert.

Das **MPO-System** wird durch Katalase, überschüssiges H_2O_2 und einige andere Reduktionsmittel (z.B. Ascorbinsäure, Glutathion) inhibiert. Fehlen diese Stoffe, so kann das **MPO-System** im extrazellulären Raum auch andere Zellen angreifen. Dazu gehören Spermatozyten, Erythrozyten, Leukozyten und Tumorzellen. Die Wirkungsweise des Systems beruht auf der Halogenierung von Proteinen und der Erzeugung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff. **MPO** wird von den neutrophilen Granulozyten eingesetzt, um Chloridionen mittels H_2O_2 zu oxidieren. Die resultierende hypochlorige Säure ist ebenfalls ein starkes antibakterielles Agens.

Untersuchungen an Patienten mit „inflammatory bowel disease“ zeigen eine Erhöhung des MPO-Gehalts im Stuhl in Abhängigkeit vom Entzündungsstadium.

Indikationen

- Marker für Entzündungsaktivitäten im gastrointestinalen Bereich (Stuhl)
- Nierentransplantatabstoßung (Urin)
- Oxidativer Stress (Serum)
- Zur Differenzierung von allergischem und infektbedingtem Asthma (Bronchiallavage, Atemluftkondensat, Sputum)

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung von MPO aus Stuhl und Urin. In diesem ELISA wird die MPO aus den Proben an Antikörper gebunden, welche an die Mikrotiterplatte fixiert sind. Die Quantifizierung des gebundenen MPO erfolgt nach einem Waschvorgang durch ein Antikörper-Peroxidase/TMB-System. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Eine Standardkurve wird erstellt, aus der die Konzentrationen ermittelt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6630MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 6630WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6630ST	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationsangabe der Spezifikation entnehmen)	4 x 5 vials
K 6630SV	STDBUF	Standardverdünnungspuffer	1 x 35 ml
K 6630KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6630KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6630A2	AB	Detektionsantikörper (monoklonaler Maus anti-MPO, biotinyliert), Konzentrat	1 x 200 µl
K 6630K	CONJ	Konjugat (Streptavidin Peroxidase markiert), Konzentrat	1 x 200 µl
K 6630PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 6630TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6630AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

*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).

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 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 WASHBUF (Pufferkonzentrat) kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **Standards (STD)** und **Kontrollen (CTRL)** sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für Standards und Kontrollen sind dem Datenblatt zu entnehmen.

- Der **AB** (Detektionsantikörper, biotinyliert) wird **1:101** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 100 µl AB + 10 ml Waschpuffer). Unverdünnter AB ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). Verdünnter Antikörper kann **nicht** aufbewahrt werden.
- Das **CONJ** (Konjugat, POD-markiert) wird **1:101** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes CONJ ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- 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 Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. 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 verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlproben

Ca. **100 mg** Stuhl einwiegen, die genau eingewogene Stuhlmenge notieren und in **5 ml** des Waschpuffers lösen (sehr gut mischen).

Danach wird die Suspension für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wird abgenommen, in ein Eppendorfröhrchen überführt und ein weiteres Mal in einer Eppendorfszentrifuge bei 13000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der erhaltene Überstand ist bei -20°C für ca. einen Monat haltbar.

Der Überstand wird vor jedem Testansatz für **2 Minuten** bei 13000 rpm in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert und anschließend 1:10 mit dem Waschpuffer weiter verdünnt (z.B. 100 µl Überstand + 900 µl Waschpuffer). Von dieser Endverdünnung werden dann **100 µl** in den Test eingesetzt.

Zur einfacheren Dosierung und Homogenisierung des Probenmaterials empfehlen wir das Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/ Mannheim (Best. Nr. 745804).

Urin

Urin sollte bei -20°C gelagert werden. Für den Einsatz im Assay wird Urin **1:10** mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) verdünnt (z.B. 100 µl Urin + 900 µl SAMPLEBUF).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

Pipettierschema

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch **5x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

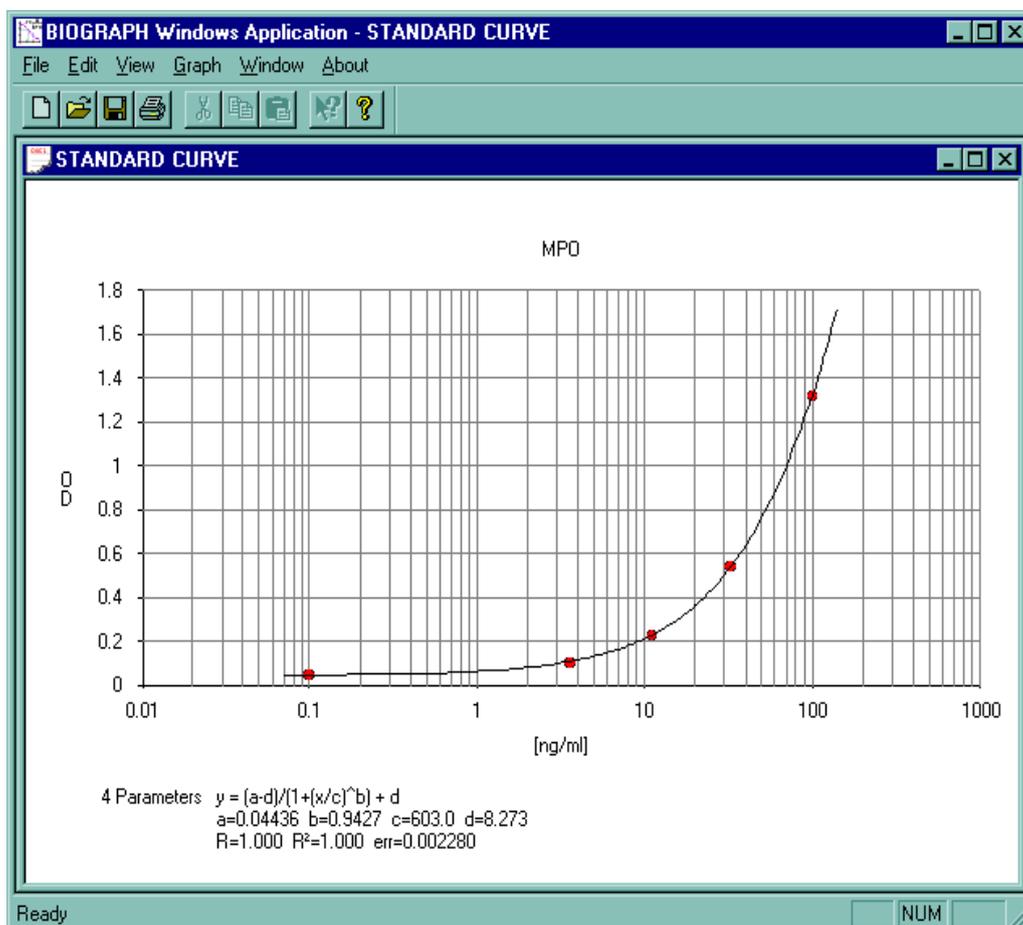
Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl STD** (Standards), **CTRL** (Kontrollen) und **Proben** in Doppelbestimmungen in die Vertiefungen pipettieren.
2. **1 Std.** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100 µl** verdünnten **AB** (Detektionsantikörper, biotinyliert) pro Vertiefung pipettieren.
5. **1 Std.** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **100 µl** verdünntes **CONJ** (Konjugatlösung, Streptavidin-POD) pro Vertiefung pipettieren.
8. **1 Std.** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
9. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
10. **100 µl SUB** (TMB-Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
11. **10 - 20 Minuten** (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubieren.
12. **100 µl STOP** (Stopplösung) zusetzen und kurz mischen.
13. **Extinktion sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sofort bei 405 nm gegen 620 nm (oder 690 nm) messen.

10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Tests empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen 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.

Standardkurve



Konzentration [ng/ml]	100	33	11	3.6	0
OD Mittelwert	1.322	0.543	0.232	0.106	0.048

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Assays verwendet werden.

Stuhlproben

Die ermittelte MPO Konzentration der Stuhlprobe wird wie im folgendem Beispiel berechnet:

Einwaage: 80 mg (1ml Stuhl = 1g) = 0,08 ml

Verdünnungsstufe 1: $5\text{ml} / 0,08\text{ml} = 62,5$

Verdünnungsstufe 2: 10

Verdünnungsfaktor: $62,5 \times 10 = 625$

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **625** multipliziert um die Konzentration der Proben zu bestimmen.

Hinweis: Der Faktor ist abhängig von der eingewogenen Stuhlprobe. Die aus der Standardkurve ermittelte Konzentration wird mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

Urinproben

Die ermittelte Konzentration wird mit **10** multipliziert um die Konzentration der Proben zu bestimmen.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer MPO Konzentration größer dem größten Standard sollten mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) weiter verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen die Kontrollen oder Stuhl/Urin Pools, 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

Referenzwerte

Normwert (Stuhl): < 2000 ng/ml

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Eine zwei Proben wurden 20 mal in einem MPO ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 20

Probe	MPO Mittelwert [ng/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	147.1	4.3
2	288.6	4.8

Inter-Assay-Variation

Es wird die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen geprüft. Zwei Proben wurden an verschiedenen Tagen und verschiedenen Personen im MPO ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 20

Probe	MPO Mittelwert [ng/ml]	Inter-Assay Vk [%]
1	171.7	12
2	239.9	15

Wiederfindung

Verschiedene MPO Proben wurden mit unterschiedlichen Spikes gemessen.

Wiederfindung n=4

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	MPO Erwartet [ng/ml]	MPO Gemessen [ng/ml]
116	500	616	514
116	320	436	401
116	200	316	336
116	125	241	254
92	500	592	504
92	320	412	388
92	200	292	297
92	125	217	204

Sensitivität

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

Probe	MPO Mittelwert [OD]	Standardabweichung	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0.013	0.003	1.6

Linearität

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	1:40	14.5	14.5
	1:80	7.2	7.1
	1:160	3.6	3.5
B	1:40	19.5	19.5
	1:80	9.75	10.1
	1:160	4.8	5.2

Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen im Stuhl gefunden:

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

14. LITERATUR

1. Saiki T et al.: 1998; Kurume Med. J. 45, 69

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humansenen verwendet wurden, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina 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.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

MPO ELISA Kit

***For the in vitro determination of Myeloperoxidase (MPO) in stool
and urine***

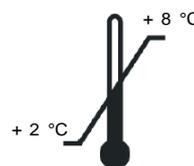
Valid from 17.08.2012



K 6630



96



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

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of **Myeloperoxidase** in urine and stool, designed to be also suitable for small series of specimen. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The granules of neutrophils (approx. 70% of the white blood cells) contain a large number of different enzymes. **Myeloperoxidase** (MPO) catalyzes the oxidation of substances through H_2O_2 . The **MPO** H_2O_2 -system has a toxic effect on many micro-organisms such as bacteria, fungi, viruses and mycoplasma. The efficiency of the bacteria-destructive Myeloperoxidase H_2O_2 -system is increased by PMN-Elastase. **MPO** determination in the stool reflects the inflammatory activity of Crohn´s disease or ulcerative colitis.

Indication

- Marker for inflammatory activities in the gastrointestinal tract
- Renal transplant rejection
- Oxidative stress
- For the differentiation between allergic and infectious asthma

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is suitable for the quantitative determination of Myeloperoxidase in urine and stool. In a first incubation step, the Myeloperoxidase in the samples is bound to an available excess of antibodies against Myeloperoxidase, which are immobilized to the surface of the microtiter plates. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a Peroxidase-labeled antibody against MPO is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, Tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stop solution is then added to stop the reaction. The color converts from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of MPO in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using results obtained from the calibrators. MPO, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 6630MTP	PLATE	One holder with precoated strips	96
K 6630WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6630ST	STD	Standards, lyophilized (see specification for range)	4 x 5 vials
K 6630SV	STDBUF	Standard dilution buffer	1 x 35 ml
K 6630KO1	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6630KO2	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6630A2	AB	Detection antibody, (mouse monoclonal anti-MPO antibody, biotinylated), concentrate	1 x 200 µl
K 6630K	CONJ	Conjugate, (streptavidin peroxidase labeled), concentrate	1 x 200 µl
K 6630PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 50 ml
K 6630TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 6630AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 nm
(reference wave length 620 or 690 nm)

*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).

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each 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 loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 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 37°C in a water bath before dilution. The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- The lyophilized **standards (STD) and controls (CTRL)** are stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Reconstitution details are given in the data sheet.
- The **AB** (detection antibody, biotinylated) must be diluted **1:101** in wash buffer (e.g. 100 µl AB + 10 ml wash buffer). The undiluted AB is stable at **2-8 °C** until the expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- The **CONJ** (conjugate, POD-antibody) must be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The undiluted CONJ is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not 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.**

7. PRECAUTIONS

- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.

- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Faeces

Weigh ca. **100 mg** of the sample, note the exact sample amount, add **5 ml** of the wash buffer and mix well.

Centrifuge the sample suspension for 10 min at 3000 rpm. Transfer 1 ml of the supernatant into an Eppendorf tube and centrifuge again at 13.000 rpm for 5 min. The resulting supernatant can be stored at -20°C for about 1 month.

Centrifuge the supernatant at 13.000 rpm for 2 min before use. Dilute the supernatant **1:10** in wash buffer (100 µl supernatant + 900 µl wash buffer). Use **100 µl** of the end-dilution in the assay.

Immundiagnostik recommends the use of the sample tubes from Boehringer / Mannheim for sample preparation.

Urine

Urine must be stored at -20°C. Use urine samples diluted **1:10** with SAMPLEBUF (sample dilution buffer, e.g. 100µl urine + 900µl SAMPLEBUF).

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Quality control guidelines 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 wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well.

Wash the pre-coated microtiter plate 5 x with 250 µl ELISA wash buffer.

Carry out the tests in duplicate.

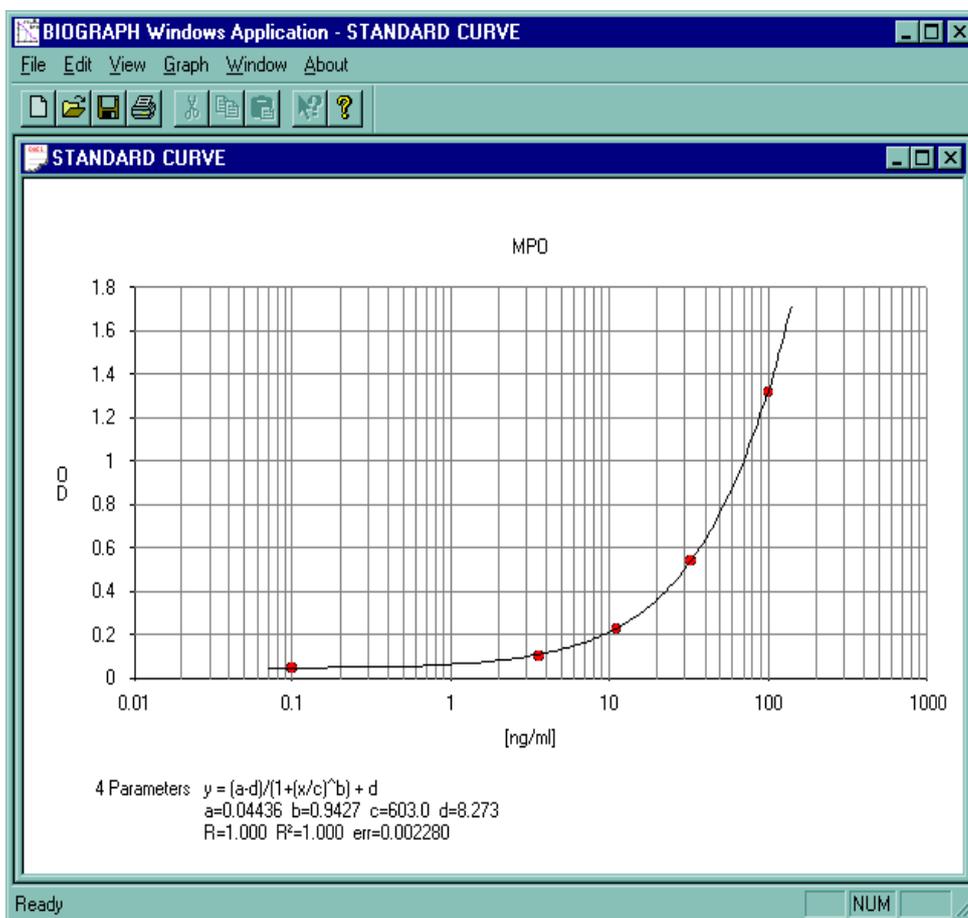
1. Pipette **100 µl** of **STD** (standards), **CTRL** (controls) or **samples** into each well.
2. Incubate for **1 hour** at room temperature, shaking on a horizontal mixer.
3. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250 µl** of washing buffer solution.
4. Add **100 µl** of diluted **AB** (detection antibody solution).
5. Incubate for **1 hour** at room temperature, shaking on a horizontal mixer.
6. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250 µl** of washing buffer solution.
7. Add **100 µl** of diluted **CONJ** (conjugate solution).
8. Incubate for **1 hour** at room temperature, shaking on a horizontal mixer.
9. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5x with 250 µl** of washing buffer solution.
10. Add **100 µl** of **SUB** (TMB-substrate) solution
11. Incubate approximately for **10 - 20 minutes** at room temperature, shaking slightly, until sufficient coloring is achieved.
12. Add **100 µl** of **STOP** (stop solution) and mix shortly.
13. 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 measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (or 690 nm) as reference.

10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the calibrator values and the results of the samples are read from it. Commercially available software can be used as well as graph paper for evaluation.

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a spline- or 4PL- algorithm is recommended.

Typical calibration curve



Concentration [ng/ml]	100	33	11	3.6	0
OD mean value	1.322	0.543	0.232	0.106	0.048

The data are for demonstration only and cannot be used for the evaluation of test results.

Faeces

In order to determine the MPO concentration in faeces samples, calculate as described in the following example:

Sample amount: 80 mg (1 ml stool = 1 g) = 0,08 ml

Dilution step 1: 5 ml / 0,08 ml = 62,5

Dilution step 2: 10

Dilution factor: 62,5 x 10 = 625

The concentration read from the calibration curve must be multiplied by **625** to obtain the MPO concentration of the sample.

Note: The dilution factor varies depending on the stool amount weighed for the analysis. The concentration read from the calibration curve must be multiplied by the corresponding dilution factor.

Urine samples

The concentration read from the calibration curve must be multiplied by **10** to obtain the MPO concentration of the sample.

11. LIMITATIONS

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

12. QUALITY CONTROL

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

Expected values

Myeloperoxidase concentration

Stool: < 2000 ng/g

The reference value should be used as a guideline only. It is recommended that each laboratory establishes an own expected range for its patient population.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik MPO ELISA test was calculated from 20 replicate determinations on each of one samples.

Intra-Assay CV n= 20

Sample	MPO mean value [ng/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	147.1	4.3
2	288.6	4.8

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik MPO ELISA test was calculated from data on 2 samples obtained in 20 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of three months.

Inter-Assay CV n= 20

Sample	MPO mean value [ng/ml]	Inter-Assay CV [%]
1	171.7	12
2	239.9	15

Recovery

Two samples were spiked with MPO and measured with this assay.

Recovery n=2

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	MPO expected [ng/ml]	MPO measured [ng/ml]
116	500	616	514
116	320	436	401
116	200	316	336
116	125	241	254
92	500	592	504
92	320	412	388
92	200	292	297
92	125	217	204

Sensitivity

n=20

Sample	MPO mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [ng/ml]
1	0.013	0.003	1.6

Sample dilution

Linearity n= 2

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

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
A	1:40	14.5	14.5
	1:80	7.2	7.1
	1:160	3.6	3.5
B	1:40	19.5	19.5
	1:80	9.75	10.1
	1:160	4.8	5.2

Cross reactivity

No cross reactivity to other plasma proteins in stool.

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

14. REFERENCES

1. Saiki T et al.: 1998; Kurume Med. J. 45, 69

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Quality control guidelines should be followed.
- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of 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.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number