

PMN-Elastase ELISA Kit

Zur in-vitro-Bestimmung der PMN-Elastase in Stuhl

For the in vitro determination of PMN elastase in stool

EU: IVD / CE

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

Gültig ab / Valid from 23.09.2014

REF K 6830



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. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	5
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<i>Lagerung</i>	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
<i>Spezifität</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

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

Indikationen

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

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6830MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6830WP	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6830EP	EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat 2,5x	2 x 100 ml
K 6830K	CONJ	Konjugat, Ziege-anti-Maus-Antikörper, Peroxidase-markiert, gebrauchsfertig	15 ml
K 6830A2	AB	Detektionsantikörper (2. Antikörper, Maus-anti-PMN-Elastase, monoklonal), lyophilisiert	2 vials
K 6830CAL	CAL	Kalibrator, lyophilisiert	4 vials

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6830KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 vials
K 6830KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 vials
K 6830TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6830AC	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- 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. VORBEREITUNG UND LAGERUNG 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** (z. B. 2. Antikörper (AB) ist in der höchsten Verdünnungsstufe nicht haltbar). 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 zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.

- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100ml Konzentrat + 900ml 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 **Waschpufferkonzentrat** 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** des gebrauchsfertigen Waschpuffers pipettiert.
- Das **EXBUF** (Extraktionspufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:2,5** mit Reinstwasser verdünnt werden (100ml Konzentrat + 150ml Reinstwasser). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37°C auf. Das **EXBUF** (Extraktionspufferkonzentrat) kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2–8°C vier Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der lyophilisierte **AB** (2. Antikörper, Maus-anti-PMN-Elastase) wird bei **2–8°C** gelagert. Vor Gebrauch wird der AB in **600 µl Reinstwasser rekonstituiert**, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Der AB wird **1:20 in Waschpuffer verdünnt** (z. B. 500 µl AB + 9,5 ml Waschpuffer) im Test eingesetzt. Der **unverdünnte rekonstituierte AB** kann bei **-20°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. **Verdünnte Antikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden.**
- **Lyophilisierter CAL** (Kalibrator) kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Vor Gebrauch wird der **CAL** mit **0,5 ml Reinstwasser** rekonstituiert (siehe Produktspezifikation). Zur vollständigen Rekonstitution wird das Gefäß mit der Lösung mehrmals geschwenkt. **Rekonstituierter Kalibrator ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- **Lyophilisierte CTRL** (Kontrollen) können bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Vor Gebrauch werden die **CTRL** mit **0,5 ml Reinstwasser** rekonstituiert (siehe Produktspezifikation). Zur vollständigen Rekonstitution wird das Gefäß mit der Lösung mehrmals geschwenkt. **Rekonstituierte Kontrollen sind nicht stabil und können nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Stuhlprobenextraktion

Der verdünnte Extraktionspuffer 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 0,75 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	0,75 ml
Verdünnungsfaktor:	1:50

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 **0,75 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen 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 (türkisfarbener Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Bei dem Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnungsfaktor **1:50**

100 µl des Überstandes werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

Lagerung

Das Stuhlextrakt ist bei -20°C für 7 Tage stabil.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

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

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.	Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Leerwert/Kalibrator/Kontrollen/Probe) in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren.
4.	Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl AB (Detektionsantikörper/2. Antikörper) in alle Wells pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Konjugat in alle Wells pipettieren.
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren.
10.	Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	100 µl SUB (Substrat) in alle Wells pipettieren.
12.	10–20 Minuten bei Raumtemperatur (15–30°C) im Dunkeln inkubieren*.
13.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells pipettieren, mischen.
14.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* 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 zu dem Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators (CAL), welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind.

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

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

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

Stuhlproben

Die ermittelte PMN-Elastase-Konzentration der Stuhlprobe wird auf Grund der Probenvorbereitung wie folgt berechnet:

Empfohlene Probenvorbereitung: Verdünnungsfaktor 1:50

Die ermittelte PMN-Elastase-Konzentration wird mit **50** multipliziert um die tatsächliche 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 Kalibrationskurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × 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

1 g Stuhl entspricht 1 ml.

PMN-Elastase-Konzentration im Stuhl gesunder Personen (n = 76): < 62 ng/ml

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität

Der Null-Standard wurde mehrfach (n = 20) gemessen. Von der ermittelten optischen Dichte wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Nachweisgrenze (LoB, *limit of blank*) wurde festgelegt als Null-Standard + 2 Standardabweichungen.

Probe	Mittelwert PMN-Elastase [OD]	Standard- abweichung	Nachweisgrenze [ng/ml]
Blank	0,025	0,024	0,12

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

Probe	PMN-Elastase [ng/ml]	VK [%]
1	2,3	14
2	0,7	4,5

Inter-Assay (n = 20)

Probe	PMN-Elastase [ng/ml]	VK [%]
1	4,9	4
2	27,8	10

Spike-Wiederfindung

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

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	PMN-Elastase erwartet [ng/ml]	PMN-Elastase gemessen [ng/ml]
1,5	3	4,5	4,9
	6	7,5	7,7
0,8	0,7	1,5	1,5
	1,7	2,5	2,7
	5	5,8	5,7

Wiederfindung in der Verdünnung

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

Probe	Verdünnung	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]
A	1:50	22	22
	1:100	11	10,3
	1:200	5,5	5,3
	1:400	2,7	2,7
B	1:50	4,6	4,6
	1:100	2,3	2,4
	1:200	1,2	1,3
	1:400	0,6	0,9

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen im Stuhl gefunden.

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

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen 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 Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal 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.
- 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.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten 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 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, zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Heinichen, C., Buessecker, F., Arndt, B., Schmidt-Gayk, H. & Kramer, M. D. PMN-Elastase in Faeces: Etablierung eines Lumineszenz-Immunoassays und Prüfung der diagnostischen Relevanz bei Morbus Crohn. *Clin. Lab.* **41**, 539–545 (1995).
2. Oremek, G. M. & Schneider, D. PMN-Elastase. *mta* **10**, 273–278 (1995).
3. Derhaschnig, U. et al. Recombinant human activated protein C (rhAPC; drotrecogin alfa [activated]) has minimal effect on markers of coagulation, fibrinolysis, and inflammation in acute human endotoxemia. *Blood* **102**, 2093–8 (2003).

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

PMN elastase ELISA Kit

For the in vitro determination of PMN elastase in stool

EU: IVD / CE

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

Valid from 23.09.2014

REF **K 6830**



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	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
6. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES	19
<i>Extraction of the stool samples</i>	19
<i>Sample storage</i>	20
7. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Spiking Recovery</i>	24
<i>Analytical Sensitivity</i>	24
<i>Dilution recovery</i>	25
<i>Specificity</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	26

1. INTENDED USE

The described enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of **PMN elastase** in stool. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

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

Indications

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

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6830MTP	PLATE	Microtiter plate, precoated	12 x 8 wells
K 6830WB	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6830EP	EXBUF	Extraction buffer concentrate 2.5 x	2 x 100 ml
K 6830A2	AB	Detection antibody, lyophilized (secondary antibody, mouse anti-PMN elastase, monoclonal), lyophilized	2 vials
K6830K	CONJ	Peroxidase-labeled antibody (goat-anti-mouse-POD)	15 ml
K 6830CAL	CAL	Calibrator, lyophilized	4 vials
K 6830KO1	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 vials
K 6830KO2	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6830TMB	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6830AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- 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. PREPARATION AND STORAGE 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 37 °C using a water bath 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 the prepared wash buffer as **blank control.**
- The **EXBUF** (extraction buffer concentrate) should be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml concentrate + 150 ml ultra pure water). Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals

must be redissolved in a water bath at 37°C before dilution. The **EXBUF** (extraction buffer concentrate) is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** can be stored in a closed flask at **2–8°C for four months**.

- The **lyophilized AB** (secondary antibody, detection antibody) is stable at **2–8°C**. Prior to use, the AB is **reconstituted with 600 µl ultra pure water**. Mix thoroughly by gentle inversion and allow the vial to stand for 10 minutes to insure complete reconstitution. The AB is then **diluted 1:20 in ELISA wash buffer** (e.g. 500 µl AB + 9.5 ml ELISA wash buffer). The **undiluted reconstituted antibody** is stable at **-20°C** until the expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and cannot be stored.**
- The **lyophilized CAL** (calibrator) is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the **CAL** must be reconstituted with **0.5 ml of ultra pure water** (see product specification). Gently agitate the tube to ensure complete reconstitution. **Reconstituted calibrator is not stable and cannot be stored.**
- The **lyophilized controls** (CTRL) are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the **CTRL** must be reconstituted with **each 0.5 ml of ultra pure water** (see product specification). Gently agitate the tube to ensure complete reconstitution. **Reconstituted controls are 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. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES

Extraction of the stool samples

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

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 0.75 ml buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	0.75 ml
Dilution Factor:	1:50

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 **0.75 ml** of ready to use extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert yellow dipstick into sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick 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 turquoise ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution Factor: 1:50

For analysis, pipet 100 µl of the supernatant per well.

Sample storage

Stool sample extract is stable at -20 °C for 7 days.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

In a first incubation step, PMN elastase in the sample is bound to polyclonal sheep-anti-PMN elastase antibodies, which are immobilized on the surface of the microtiter wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a monoclonal mouse-anti-PMN elastase antibody is added. This antibody is able to detect both the free and the complexed form with the specific inhibitor (α 1-proteinase inhibitor = α 1-antitrypsin). The quantification of the bound PMN elastase is carried out by adding an anti-mouse peroxidase-labeled conjugate. Finally, the PMN elastase-antigen-antibody-complex is incubated with the peroxidase substrate, tetramethylbenzidine. An acidic stop solution is then added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of PMN elastase in the sample. The use of the calibrator allows quantification of the samples by referring their optical density to a lot-dependent master calibration 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.	Wash each well 5x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
2.	Add 100 µl of BLANK/CAL/SAMPLE/CTRL (blank/calibrator/samples/controls) into respective wells.
3.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal mixer.
4.	Wash each well 5x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
5.	Add 100 µl of AB (detection antibody, secondary antibody) into each wells, mix gently.
6.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal mixer.

7.	Wash each well 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	Add 100 µl of conjugate into each well.
9.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal mixer.
10.	Wash each well 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
11.	Add 100 µl of SUB (substrate) into each well.
12.	Incubate for 10–20 minutes at room temperature (15–30 °C) in the dark*.
13.	Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well, shake well.
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

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

8. RESULTS

For result evaluation, please use a four parametric logit-log model based on the calibration curve of the respective kit lot and the calibrator value (CAL). All essential information on the calibration 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.

Stool samples

To obtain the PMN elastase concentration in fecal samples, multiply the estimated value by the **dilution factor** according to the sample preparation:

Recommended sample preparation: dilution factor 1 : 50

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

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

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 calibration curve × sample dilution factor to be used

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

LoB × 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

1 g stool is equivalent to 1 ml

PMN elastase concentrations in faeces of healthy persons (n = 76): < 62 ng/ml

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

Sample	PMN elastase [ng/ml]	CV [%]
1	2.3	14
2	0.7	4.5

Inter-Assay (n = 20)

Sample	PMN elastase [ng/ml]	CV [%]
1	4.9	4
2	27.8	10

Spiking Recovery

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

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	expected [ng/ml]	measured [ng/ml]
1.5	3	4.5	4.9
	6	7.5	7.7
0.8	0.7	1.5	1.5
	1.7	2.5	2.7
	5	5.8	5.7

Analytical Sensitivity

The limit of blank (LoB) was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$. The Zero-standard was measured 20 times.

Sample	PMN elastase mean value [OD]	Standard deviation	Detection limit [ng/ml]
1	0.025	0.024	0.12

Dilution recovery

Two patient samples were diluted with ELISA wash buffer and analyzed with the PMN elastase ELISA test.

Sample	Dilution	expected [ng/ml]	measured [ng/ml]
A	1:50	22	22
	1:100	11	10.3
	1:200	5.5	5.3
	1:400	2.7	2.7
B	1:50	4.6	4.6
	1:100	2.3	2.4
	1:200	1.2	1.3
	1:400	0.6	0.9

Specificity

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

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

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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic colour 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.
- 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 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. Heinichen, C., Buessecker, F., Arndt, B., Schmidt-Gayk, H. & Kramer, M. D. PMN-Elastase in Faezes: Etablierung eines Lumineszenz-Immunoassays und Prüfung der diagnostischen Relevanz bei Morbus Crohn. *Clin. Lab.* **41**, 539–545 (1995).
2. Oremek, G. M. & Schneider, D. PMN-Elastase. *mta* **10**, 273–278 (1995).
3. Derhaschnig, U. et al. Recombinant human activated protein C (rhAPC; drotre-

cogin alfa [activated]) has minimal effect on markers of coagulation, fibrinolysis, and inflammation in acute human endotoxemia. *Blood* **102**, 2093–8 (2003).

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number