

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 6840



IVD



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	4
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	4
<i>Lagerung</i>	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<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>Spezifität</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
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 30kDa 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 6840MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6840WP	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6840EP	EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat 2,5x	2 x 100 ml
K 6840K	CONJ	Konjugat, Ziege-anti-Maus-Antikörper, Peroxi- dase-markiert, gebrauchsfertig	15 ml
K 6840A2	AB	Detektionsantikörper lyophilisiert (2. Antikörper, Maus-anti-PMN-Elastase, monoklonal), lyophilisiert	2 vials
K 6840ST	STD	Standard, lyophilisiert (Konzentrationsangabe der Spezifikation entnehmen)	4 x 5 vials

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6840KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 vials
K 6840KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 vials
K 6840TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6840AC	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 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 (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.
- Das **EXBUF** (Extraktionspufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:2,5** mit Reinstwasser verdünnt werden (90 ml Konzentrat + 135 ml 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.**
- **Die lyophilisierten STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für Standards und Kontrollen sind dem Datenblatt zu entnehmen.
- 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 Peroxidase-substrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem PMN-Elastase-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve 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 5 x mit je 250 μl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 μl STD/PROBE/CTRL in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.
4.	Inhalt der Wells verwerfen und 5 x 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 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl CONJ (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 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten 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

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.

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, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

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

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

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 Mause Serum gefunden.

Analytische Sensitivität

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

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

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

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 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.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigegeführten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller

festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

15. LITERATUR

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; 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 6840**



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	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	15
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
6. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES	17
<i>Extraction of the stool samples</i>	17
<i>Sample storage</i>	18
7. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	19
8. RESULTS	20
9. LIMITATIONS	21
10. QUALITY CONTROL	21
<i>Reference range</i>	21
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Spiking Recovery</i>	22
<i>Dilution recovery</i>	22
<i>Analytical Sensitivity</i>	23
<i>Specificity</i>	23
12. PRECAUTIONS	23
13. TECHNICAL HINTS	23
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24
15. REFERENCES	24

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 6840MTP	PLATE	Microtiter plate, precoated	12 x 8 wells
K 6840WB	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6840EP	EXBUF	Extraction buffer concentrate 2.5 x	2 x 100 ml
K 6840A2	AB	Detection antibody, lyophilized (secondary antibody, mouse anti-PMN elastase, monoclonal), lyophilized	2 vials
K6840K	CONJ	Peroxidase-labeled antibody (goat-anti-mouse-POD)	15 ml
K 6840ST	STD	Standard, lyophilized (see specification for concentration)	4 x 5 vials
K 6840KO1	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 vials
K 6840KO2	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6840TMB	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6840AC	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.**
- The **EXBUF** (extraction buffer concentrate) should be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (90 ml concentrate + 135 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** (ex-

traction 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**. Allow the vial to stand for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion 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 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.
- 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 be-

fore 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 app. 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. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standards. PMN elastase, present in the patient 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.	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.
2.	Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (standards/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 5 x 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

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

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 an OD higher than the OD of the highest standard should be further diluted and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

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

Dilution recovery

Two patient samples were diluted with ELISA wash buffer and analyzed with the Immunodiagnostik 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

Analytical Sensitivity

The sensitivity limit 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

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 as wells from already opened microtiter plates are exposed to different conditions than sealed ones.
- 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; drotrecogin 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