

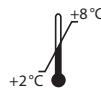
IDK[®] PMN-Elastase ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung PMN-Elastase in Serum, Plasma
und Seminalplasma*

*For the in vitro determination of PMN elastase in serum,
plasma, and seminal plasma*

Gültig ab / Valid from 2018-01-02

REF K 6831



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Seminalplasma</i>	4
<i>Serum- und Plasmaproben</i>	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<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 ELISA ist für die quantitative Bestimmung von PMN-Elastase aus Serum, Plasma und Seminalplasma 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.

Indikationen

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

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6831	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6831	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6831	CONJ	Konjugat, Ziege-anti-Maus-Antikörper, peroxidase markiert, gebrauchsfertig	15 ml
K 6831	AB	Detektionsantikörperkonzentrat (2. Antikörper, Maus-anti-PMN-Elastase, monoklonal), lyophilisiert	2 vials
K 6831	CAL	Kalibrator, lyophilisiert	4 vials
K 6831	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 vials
K 6831	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 vials
K 6831	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6831	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml
K 6831	SAMPLEBUF	Probenpuffer, gebrauchsfertig	100 ml

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

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
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

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

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der

Waschpuffer (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Als **BLANK** (Leerwert) werden 100 µl des vorbereiteten Waschpuffers pipettiert.
- Das **lyophilisierte Detektionsantikörperkonzentrat (AB)** ist bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutions- und Verdünnungsvorgaben sind dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen.
- **Der lyophilisierte Kalibrator (CAL)** und die **lyophilisierten Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für Kalibrator und Kontrollen sind dem Datenblatt zu entnehmen. **Kalibrator und Kontrollen** (rekonstituierte CAL und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Seminalplasma

Das Plasmamaterial sollte bei **-20 °C** gelagert und direkt vor der Testdurchführung aufgetaut werden.

Nach dem Auftauen werden die Seminalplasmen **5 Minuten** bei **10 000 rpm** zentrifugiert. Die Seminalplasmen müssen vor dem Einsatz im Test – in Abhängigkeit des Entzündungszustands des Patienten – **1:10** bis **1:20** in Probenpuffer (SAMPLEBUF) verdünnt werden.

Serum- und Plasmaproben

Präanalytik

Bei den Untersuchungen von Plasma oder Serum können sich die ermittelten PMN-Elastasewerte deutlich unterscheiden z.B. bis zu 10-fach höhere Serumwerte im Vergleich zu den Plasmakonzentrationen. Die Ursachen dafür sind:

Im Serum werden während des Gerinnungsprozesses die Granulozyten zur kompletten Freisetzung der Granulozyten-Aktivierungsmarker angeregt. Die Standzeit der Proben sowie wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen führen zu keiner Werteverchiebung.

Anders im Plasma: je länger die Probe vor dem Zentrifugationsschritt steht und je mehr Einfrier- und Auftauzyklen die Probe durchlebt, umso höhere PMN-Elastase-Konzentrationen werden ermittelt. **Bei Verwendung von Plasma muss die Präanalytik konstant sein.** Das gilt generell und unabhängig von dem verwendeten Testsystem.

Immundiagnostik empfiehlt daher, zur Bestimmung der PMN-Elastase-Konzentration Serum zu verwenden.

Frisch abgenommenes Blut wird innerhalb einer Stunde abzentrifugiert. Es wird entweder am gleichen Tag im Test eingesetzt oder bei **-20°C** gelagert. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Proben vor dem Einsatz im Test gut mischen. Wir empfehlen, alle Werte in Doppelbestimmungen zu ermitteln.

Serumproben müssen vor dem Einsatz im Test **1:500** mit Probenpuffer verdünnt werden, z. B.

- **25 µl** Serumprobe + **475 µl** SAMPLEBUF, mischen = 1:20 (Verdünnung I)
- **25 µl** Verdünnung I + **600 µl** SAMPLEBUF, mischen = 1:25 (Verdünnung II). Dies entspricht nun einer **Gesamtverdünnung von 1:500**.

Plasmaproben müssen vor dem Einsatz im Test **1:100** mit Probenpuffer verdünnt werden, z. B.

- **25 µl** Plasmaprobe + **225 µl** SAMPLEBUF, mischen = 1:10 (Verdünnung I)
- **25 µl** Verdünnung I + **225 µl** SAMPLEBUF, mischen = 1:10 (Verdünnung II). Dies entspricht nun einer **Gesamtverdünnung von 1:100**.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Im ersten Inkubationsschritt wird PMN-Elastase aus den Proben von einem immobilisierten Kaninchen-anti-PMN-Elastase-Antikörper gebunden. Es folgt ein Waschschritt, um alle ungebundenen Probenkomponenten zu entfernen. Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein monoklonaler Maus-anti-PMN-Elastase-Antikörper dazupipettiert, 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 (TMB) eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem PMN-Elastase-Gehalt direkt proportional. Anhand eines mitge-

fürten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Mustereichkurve lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Kalibrator/Blank/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8°C gelagert werden.

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

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Mikrotiterstreifen 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	Je 100 µl 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 Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Antikörperlösung (verdünntes Antikörperkonzentrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Konjugat (CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.

9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren.
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	100 µl Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
12.	10–20 min* bei Raumtemperatur (15–30°C) im Dunkeln inkubieren.
13.	100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen 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 zum Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators (CAL), welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind.

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

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

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Seminalplasma

Der ermittelte PMN-Elastase-Wert wird **je nach gewählter Verdünnung bei der Probenvorbereitung** mit dem **Verdünnungsfaktor 10 oder 20** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Serumproben

Der ermittelte PMN-Elastase-Wert wird mit dem **Verdünnungsfaktor 500** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Plasmaproben

Der ermittelte PMN-Elastase-Wert wird mit dem **Verdünnungsfaktor 100** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

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

9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

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

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × 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

PMN-Elastase-Konzentration

im Plasma gesunder Personen (n = 37):	19–78 ng/ml
im Serum gesunder Personen (n = 52):	Mittelwert = 688 ng/ml (186 – 1991 ng/ml)

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

Die Reproduzierbarkeit von zwei Ergebnissen innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Je zwei Proben wurden 20-mal im IDK® PMN-Elastase-ELISA von einer Person angesetzt.

Matrix	Probe	PMN-Elastase [ng/ml]	VK [%]
Serum	1	527,9	0,13
	2	116,4	0,5
Plasma	1	20,2	1,98
	2	20,4	2,68

Inter-Assay (n = 20)

Die Reproduzierbarkeit von zwei Ergebnissen an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft. Je zwei Proben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im IDK® PMN-Elastase-ELISA gemessen.

Matrix	Probe	PMN-Elastase [ng/ml]	VK [%]
Serum	1	121	6,86
	2	143	5,45
Plasma	1	21	6,19
	2	27,3	11,3

Spike-Wiederfindung

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

Matrix	Ungespikete Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	PMN-Elastase erwartet [ng/ml]	PMN-Elastase gemessen [ng/ml]
Serum	0,247	0,722	0,969	0,968
	0,267	1,266	1,533	1,575
Plasma	0,2	0,793	0,993	0,941
	0,21	1,285	1,495	1,467

Wiederfindung in der Verdünnung

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

Matrix	Probe	Verdünnung	PMN-Elastase erwartet [ng/ml]	PMN-Elastase gemessen [ng/ml]
Serum	A	1:500	422	422
		1:1000	211	208,8
		1:2000	105,5	105,9
	B	1:500	349	349
		1:1000	174,5	170,9
		1:2000	87,25	82,1
Plasma	A	1:500	49,4	49,4
		1:1000	24,7	25,3
		1:2000	12,35	12,9
	B	1:500	19,9	19,9
		1:1000	9,95	9,7
		1:2000	4,975	5,575

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 1,645 \times SD$ festgelegt. Gemessen wurde 160-mal der Leerwert.

Berechnete Nachweisgrenze = 0,011 ng/ml

Dieser Wert wurde in Bezug auf die Konzentration der Kalibrationskurve ohne Berücksichtigung des Probenverdünnungsfaktors ermittelt.

Spezifität

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

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit 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.
- IDK® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- 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, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Derhaschnig, Ulla, Rosemarie Reiter, Paul Knöbl, Magdalena Baumgartner, Priska Keen, and Bernd Jilma. 2003. "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** (6) (September 15): 2093–8. doi:10.1182/blood-2003-02-0416.

2. Eggert-Kruse, W, K Zimmermann, W Geissler, A Ehrmann, R Boit, and T Strowitzki. 2009. "Clinical Relevance of Polymorphonuclear (PMN-) Elastase Determination in Semen and Serum during Infertility Investigation." *International Journal of Andrology* **32** (4) (August): 317–29. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00852.x.
3. Heinichen, Cornelia, Frank Buessecker, Birgit Arndt, Heinrich Schmidt-Gayk, and Michael D. Kramer. 1995. "PMN-Elastase in Faeces: Etablierung Eines Lumineszenz-Immunoassays Und Prüfung Der Diagnostischen Relevanz Bei Morbus Crohn." *Clinical Laboratory* **41**: 539–545.
4. Hoang, Long Truong, David J Lynn, Matt Henn, Bruce W Birren, Niall J Lennon, Phuong Thi Le, Kien Thi Hue Duong, et al. 2010. "The Early Whole-Blood Transcriptional Signature of Dengue Virus and Features Associated with Progression to Dengue Shock Syndrome in Vietnamese Children and Young Adults." *Journal of Virology* **84** (24) (December 15): 12982–94. doi:10.1128/JVI.01224-10.
5. Oremek, G M, and D Schneider. 1995. "PMN-Elastase." *MTA* **10** (4): 273–278.

Verwendete Symbole:

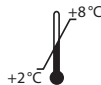
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten

IDK[®] PMN elastase ELISA

*For the in vitro determination of PMN elastase
in serum, plasma, and seminal plasma*

Valid from 2018-01-02

REF K 6831



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

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. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Test procedure</i>	20
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Analytical Sensitivity</i>	23
<i>Spiking Recovery</i>	24
<i>Dilution recovery</i>	24
<i>Precision and reproducibility</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	27

1. INTENDED USE

This ELISA is intended for the quantitative determination of PMN elastase in serum, plasma and seminal plasma. 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.

Indication

- Activation marker for Crohn's disease
- Chronic joint inflammation
- Bacterial infection, sepsis

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6831	PLATE	Microtiter plate, precoated	12x 8 wells
K 6831	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2x 100 ml
K 6831	AB	Detection antibody concentrate (second antibody, mouse-anti-PMN elastase, monoclonal), lyophilised	2 vials
K 6831	CONJ	Peroxidase-labeled antibody (goat-anti-mouse-POD)	15 ml
K 6831	CAL	Calibrator, lyophilised	4 vials
K 6831	CTRL 1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 vials
K 6831	CTRL 2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 vials
K 6831	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	15 ml
K 6831	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	15 ml
K 6831	SAMPLEBUF	Sample buffer, ready-to-use	100 ml

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

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

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to 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 concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- Use **100 µl wash buffer** as a **BLANK**.
- The **lyophilised detection antibody concentrate (AB)** is stable at 2–8 °C until the expiry date stated on the label. Details for reconstitution and dilution are given in the specification data sheet.
- The **lyophilised calibrator (CAL)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Reconstitution details are given in the specification. **Calibrator and controls** (reconstituted CAL and CTRL) **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. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Seminal plasma

Seminal plasma should be stored at **-20 °C** and defrosted immediately before use. Centrifuge the seminal-plasma samples for **5 min** at **10 000 rpm**.

The samples should be diluted **1:10–1:20** in sample buffer (SAMPLEBUF) depending on the inflammatory status of the patient.

Serum and plasma samples

Preanalytic handling

Significant differences in the PMN elastase levels can be observed due to different sample preparation procedures, e. g. up to 10-fold higher serum levels compared to the plasma PMN elastase concentrations. The reasons are as follows:

The granulocytes are activated during the serum clotting and release elastase granulocyte-activating markers. The time between serum collecting and analysis as well as repeated freeze-thaw cycles don't cause a PMN elastase concentration shift.

On the contrary, in the case of plasma samples, varying the time between sampling and analysis or the number of freeze-thaw cycles will cause variation in the observed PMN elastase levels. Therefore, **the preanalytical conditions of plasma samples should be held constant**. This is a general requirement independent of the used test-system.

Immundiagnostik recommends the use of serum samples for PMN elastase determinations.

Fresh collected blood should be centrifuged within one hour. If not assayed on the same day, it should be stored at **-20 °C**. Lipemic or hemolytic samples should be not analysed. Samples should be mixed well before assaying. We recommend to carry out duplicate analysis on each test sample.

Serum samples should be diluted **1:500** with the sample buffer before assaying, e. g.

- **25 µl** sample + **475 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:20** (dilution I)
- **25 µl** dilution I + **600 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:25** (dilution II). This results in a **final dilution of 1:500**.

Plasma samples should be diluted **1:100** with the sample buffer before assaying, e.g.

- **25 µl** sample + **225 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:10** (dilution I)
- **25 µl** dilution I + **225 µl** wash buffer, mix well = **1:10** (dilution II). This results in a **final dilution of 1:100**.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

In a first incubation step, PMN elastase in the sample is bound to polyclonal rabbit-anti-PMN elastase antibodies (in excess), which are immobilised on the surface of the microtiter wells (PLATE). To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a monoclonal mouse-anti-PMN elastase antibody (AB) 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 (CONJ). Finally, the PMN elastase – antigen – antibody complex is incubated with the peroxidase substrate, tetramethylbenzidine (SUB). An acidic stop solution (STOP) is then added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of PMN elastase in the sample. Samples are quantified by referring their optical density to a lot-dependent master calibration curve and the use of a calibrator that is run with each test. The combination of two specific antibodies in the PMN elastase ELISA drastically reduces the possibility of false results and offers a reliable diagnostic system to the user.

Test procedure

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

Mark the positions of calibrator/controls/samples on a protocol sheet.

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

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

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash the microtiter plate 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
2.	Add each 100 µl blank/calibrator/controls/sample into the respective wells.
3.	Cover the plate and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker .
4.	Discard the contents of each well. Wash the microtiter plate 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
5.	Add 100 µl antibody solution (diluted antibody concentrate) into each well.
6.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker .
7.	Discard the contents of each well. Wash the microtiter plate 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
8.	Add 100 µl of conjugate (CONJ) into each well.
9.	Cover the plate and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker .
10.	Discard the contents of each well. Wash the microtiter plate 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
11.	Add 100 µl of substrate (SUB) into each well.
12.	Incubate for 10–20 min* at room temperature (15–30 °C) in the dark .
13.	Add 100 µl of stop solution (STOP) into each well, shake well.

14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.
-----	---

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

8. RESULTS

For result evaluation, please use a four parametric logit-log model based on the standard curve of the respective kit lot and the calibrator value (CAL). All essential information on the standard curve is provided on the QC data sheet of the respective product lot.

The calibration curve can be expressed either by the concentration of each standard with its corresponding optical density or by the four parameters A,B,C and D. In both cases the optical density of the calibrator (CAL) is essential. Depending on your evaluation software program, either the one or the other kind of data described above should be entered.

Caution: Please make sure that all parameters and values are transferred accurately into your software as minor deviations can cause severe errors during evaluation.

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

Seminal plasma

For the calculation of the PMN elastase concentration in seminal plasma, the result has to be multiplied by the **dilution factor 10 or 20 dependent on the sample dilution**.

Serum

For the calculation of the PMN elastase concentration in serum, the result has to be multiplied by the **dilution factor 500**.

Plasma

For the calculation of the PMN elastase concentration in plasma, the result has to be multiplied by the **dilution factor 100**.

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

9. LIMITATIONS

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

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

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

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

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

Analytical sensitivity × 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

PMN elastase concentrations

in plasma of a healthy person (n = 37):	19–78 ng/ml
in serum of a healthy person (n = 52):	average = 688 ng/ml (186–1991 ng/ml)

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Sensitivity

The detection limit was set as $B_0 + 1,645 \times SD$. The blank was measured 160 times.

Estimated detection limit = 0.011 ng/ml

This detection limit was determined in regard to the calibration curve without taking into consideration the sample dilution factor.

Spiking Recovery

Two samples were spiked with different PMN elastase amounts and measured with the IDK® PMN elastase ELISA.

Matrix	Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	PMN elastase expected [ng/ml]	PMN elastase measured [ng/ml]
Serum	0,247	0,722	0,969	0,968
	0,267	1,266	1,533	1,575
Plasma	0,2	0,793	0,993	0,941
	0,21	1,285	1,495	1,467

Dilution recovery

Two patient samples were serially diluted with wash buffer and analysed. The expected and the measured PMN elastase concentrations are displayed in the following table.

Matrix	Sample	Dilution	PMN elastase expected [ng/ml]	PMN elastase measured [ng/ml]
Serum	A	1:500	422	422
		1:1000	211	208,8
		1:2000	105,5	105,9
	B	1:500	349	349
		1:1000	174,5	170,9
		1:2000	87,25	82,1
Plasma	A	1:500	49,4	49,4
		1:1000	24,7	25,3
		1:2000	12,35	12,9
	B	1:500	19,9	19,9
		1:1000	9,95	9,7
		1:2000	4,975	5,575

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

Matrix	Sample	PMN elastase [ng/ml]	CV [%]
Serum	1	527,9	0,13
	2	116,4	0,5
Plasma	1	20,2	1,98
	2	20,4	2,68

Inter-Assay (n = 20)

Matrix	Sample	PMN elastase [ng/ml]	CV [%]
Serum	1	121	6,86
	2	143	5,45
Plasma	1	21	6,19
	2	27,3	11,3

Specificity

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 ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any

spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.











14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK*® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- 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. Derhaschnig, Ulla, Rosemarie Reiter, Paul Knöbl, Magdalena Baumgartner, Priska Keen, and Bernd Jilma. 2003. "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** (6) (September 15): 2093–8. doi:10.1182/blood-2003-02-0416.
2. Eggert-Kruse, W, K Zimmermann, W Geissler, A Ehrmann, R Boit, and T Strowitzki. 2009. "Clinical Relevance of Polymorphonuclear (PMN-) Elastase Determination in Semen and Serum during Infertility Investigation." *International Journal of Andrology* **32** (4) (August): 317–29. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00852.x.
3. Heinichen, Cornelia, Frank Buessecker, Birgit Arndt, Heinrich Schmidt-Gayk, and Michael D. Kramer. 1995. "PMN-Elastase in Faezes: Etablierung Eines Lumineszenz-Immunoassays Und Prüfung Der Diagnostischen Relevanz Bei Morbus Crohn." *Clinical Laboratory* **41**: 539–545.
4. Hoang, Long Truong, David J Lynn, Matt Henn, Bruce W Birren, Niall J Lennon, Phuong Thi Le, Kien Thi Hue Duong, et al. 2010. "The Early Whole-Blood Transcriptional Signature of Dengue Virus and Features Associated with Progression to Dengue Shock Syndrome in Vietnamese Children and Young Adults." *Journal of Virology* **84** (24) (December 15): 12982–94. doi:10.1128/JVI.01224-10.
5. Oremek, G M, and D Schneider. 1995. "PMN-Elastase." *MTA* **10** (4): 273–278.

Used symbols:

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