

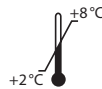
IDK[®] PMN-Elastase ELISA

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

For the in vitro determination of PMN elastase in stool

Gültig ab / Valid from 2019-03-27

REF K 6840



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. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	4
<i>Lagerung</i>	5
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>Genauigkeit - Präzision</i>	9
<i>Analytische Spezifität</i>	10
<i>Linearität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	12
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13
15. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die 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 6840	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6840	EXBUF	Extraktionspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 6840	CONJ	Konjugat, Ziege-anti-Maus-Antikörper, peroxidasemarkiert, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6840	AB	Detektionsantikörperkonzentrat (2. Antikörper, Maus-anti-PMN-Elastase, monoklonal), lyophilisiert	2 x 1 vial
K 6840	STD	Standard, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	4 x 5 vials

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6840	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6840	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Stuhlprobenaufbereitungssystem wie z. B. Artikel-Nr. K 6998SAS
- 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 auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz zentrifugiert 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.
- Das **lyophilisierte Detektionsantikörperkonzentrat (AB)** ist bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutions- und Verdünnungsvorgaben sind dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für Standards und Kontrollen sind dem Datenblatt zu entnehmen.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Stuhlprobenextraktion

Der **Extraktionspuffer (EXBUF)** wird als **Probenextraktionspuffer** verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

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

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

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

SAS mit 0,75 ml Probenextraktionspuffer:

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 Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **0,75 ml Probenextraktionspuffer** (EXBUF) **befüllen**. **Wichtig:** Probenextraktionspuffer 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 so lange vortexen 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 im Probenextraktionspuffer 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 Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnungsfaktor: **1:50**

100 µl des Überstandes werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

Lagerung

PMN Elastase ist in Rohstuhl für einen Monat bei -20 °C stabil. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Das Stuhlextrakt ist bei -20 °C für 7 Tage sowie bei 2-8 °C für 2 Tage stabil. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sowie eine Lagerung bei erhöhten Temperaturen sind zu vermeiden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von PMN-Elastase.

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 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 (TMB) eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – 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 Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung 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.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 μl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 μl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben 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 Detektionsantikörper (verdünntes AB) 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 jede Vertiefung 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. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

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

8. ERGEBNISSE

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

1. 4-Parameter-Funktion

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

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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

Stuhlproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 50** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

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 (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) 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*

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,060 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 0,269 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 0,309 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

Genauigkeit - Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 27

Die Wiederholbarkeit wurde mit 3 Stuhlproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	62,95	8,2
2	150,06	4,2
3	57,90	9,4

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 46

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 3 Stuhlproben unter **variablen** Bedingungen (Be-diener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	158,66	12,9
2	133,66	13,9
3	186,61	14,4

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität ver-wandter Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration	Gefundene Kon-zentration [ng/ml]	Fazit
α 1-Antitrypsin	90 μ g/l	< 0,060	< LoB
Albumin	800 μ g/l	< 0,060	< LoB
slgA	600 ng/ml	< 0,060	< LoB
Lysozym	30 ng/ml	< 0,060	< LoB
Hämoglobin	1000 μ g/ml	< 0,060	< LoB
Hämoglobin-Hapto-globin-Komplex	40 mU/l	< 0,060	< LoB
CRP	150 ng/ml	< 0,060	< LoB
Pankreatische Amylase	28333 mU/l	< 0,060	< LoB
Chymotrypsin	1000 ng/ml	< 0,060	< LoB
Myeloperoxidase	100 ng/ml	< 0,060	< LoB
Immunglobulin E	500 ng/ml	< 0,060	< LoB

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Ana-lytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung von 2 hohen Stuhlproben mit niedrigen Stuhl-proben nachgewiesen.

Für PMN Elastase in Stuhl wurde Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ein lineares Verhalten im Bereich von 0,37 bis 2,54 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A	Hohe Probe	-	2,54	-
	1:1,11	2,29	2,57	111,99
	1:1,25	2,05	2,33	113,66
	1:1,43	1,80	2,10	116,78
	1:1,67	1,55	1,85	119,72
	1:2,00	1,30	1,48	113,82
	1:2,50	1,05	1,28	121,62
	1:3,33	0,80	0,99	122,96
	1:5,00	0,55	0,46	83,26
	Niedrige Probe	-	negativ	-
B	Hohe Probe	-	2,29	-
	1:1,11	2,10	2,01	95,85
	1:1,25	1,90	1,73	90,65
	1:1,43	1,71	1,53	89,18
	1:1,67	1,52	1,43	94,12
	1:2,00	1,33	1,14	86,09
	1:2,50	1,14	0,99	87,38
	1:3,33	0,94	0,97	102,95
	1:5,00	0,75	0,75	99,56
	1:10,00	0,56	0,63	111,50
	Niedrige Probe	-	0,37	-

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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

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 auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der 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 dem 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. 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:

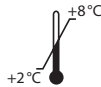
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

IDK[®] PMN elastase ELISA

For the in vitro determination of PMN elastase in stool

Valid from 2019-03-27

REF **K 6840**



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. 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	20
<i>Principle of the test</i>	20
<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>Accuracy - Precision</i>	24
<i>Analytical sensitivity</i>	24
<i>Linearity</i>	25
<i>Analytical specificity</i>	26
12. PRECAUTIONS	26
13. TECHNICAL HINTS	27
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27
15. REFERENCES	27

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of PMN elastase in stool. 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 6840	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate ,10 x	2 x 100 ml
K 6840	EXBUF	Extraction buffer, ready-to-use	2 x 100 ml
K 6840	AB	Detection antibody concentrate (secondary antibody, mouse anti-PMN elastase, monoclonal), lyophilised	2 x 1 vial
K6840	CONJ	Peroxidase-labelled antibody (goat-anti-mouse-POD), ready-to-use	1 x 15 ml
K 6840	STD	Standard, lyophilised (see specification for concentration)	4 x 5 vials
K 6840	CTRL 1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6840	CTRL 2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Stool sample application system such as cat. no.: K 6998SAS
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure 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**.

- 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 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) when stored at **2–8 °C**.

6. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES

Extraction of the stool samples

Extraction buffer (EXBUF) is used as a **sample extraction buffer**. We recommend the following sample preparation:

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

Stool sample tube – Instructions for use

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

SAS with 0.75 ml sample extraction 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 stool sample tube** with **0.75 ml sample extraction buffer (EXBUF)** before using it with the sample. **Important:** Allow the sample extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place 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 sample extraction buffer for ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution factor: **1:50**

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

Sample storage

PMN elastase in raw stool is stable for one month at -20 °C. Avoid repeated freezing and thawing.

Extracted stool samples are stable for 7 days at -20 °C or for 2 days at 2-8 °C. Avoid repeated freezing and thawing as well as exposure to elevated temperatures.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of PMN elastase.

In a first incubation step, PMN elastase in the sample is bound to polyclonal rabbit-anti-PMN elastase antibodies, which are immobilised 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-labelled 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 at 450 nm) vs. con-

centration is generated, using the values obtained from the standard. 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.

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

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging 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.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl detection antibody (diluted AB) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl conjugate (CONJ) into each well.
9.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .

10.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
11.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
12.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
13.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** 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.

Stool samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor 50** to get the actual concentrations.

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

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) 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

Analytical sensitivity see chapter "Performance characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG 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

Accuracy - Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 27

The repeatability was assessed with 3 stool-samples under **constant** parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	62.95	8.2
2	150.06	4.2
3	57.90	9.4

Reproducibility (Inter-Assay); n = 46

The reproducibility was assessed with 3 stool-samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	158.66	12.9
2	133.66	13.9
3	186.61	14.4

Analytical sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standards without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB	0.060 ng/ml
Limit of detection, LoD	0.269 ng/ml
Limit of quantitation, LoQ	0.309 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20% CV.

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP06-A with a serial dilution of 2 different high level with low level stool-samples.

For PMN elastase in stool, the method has been demonstrated to be linear from 0.37 to 2.54 ng/ml based on the standard curve without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
A	High sample	-	2.54	-
	1:1.11	2.29	2.57	111.99
	1:1.25	2.05	2.33	113.66
	1:1.43	1.80	2.10	116.78
	1:1.67	1.55	1.85	119.72
	1:2.00	1.30	1.48	113.82
	1:2.50	1.05	1.28	121.62
	1:3.33	0.80	0.99	122.96
	1:5.00	0.55	0.46	83.26
	Low sample	-	negative	-
B	High sample	-	2.29	-
	1:1.11	2.10	2.01	95.85
	1:1.25	1.90	1.73	90.65
	1:1.43	1.71	1.53	89.18
	1:1.67	1.52	1.43	94.12
	1:2.00	1.33	1.14	86.09
	1:2.50	1.14	0.99	87.38
	1:3.33	0.94	0.97	102.95
	1:5.00	0.75	0.75	99.56
	1:10.00	0.56	0.63	111.50
	Low sample	-	0.37	-

Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to PMN elastase. There was no cross-reactivity observed.

Substance tested	Concentration added	Concentration obtained [ng/ml]	Conclusion
α1-Antitrypsin	90 µg/l	< 0,060	< LoB
Albumin	800 µg/l	< 0,060	< LoB
slgA	600 ng/ml	< 0,060	< LoB
Lysozyme	30 ng/ml	< 0,060	< LoB
Haemoglobin	1000 µg/ml	< 0,060	< LoB
Haemoglobin-Hapto-globin-Complex	40 mU/l	< 0,060	< LoB
CRP	150 ng/ml	< 0,060	< LoB
Pancreatic Amylase	28333 mU/l	< 0,060	< LoB
Chymotrypsin	1000 ng/ml	< 0,060	< LoB
Myeloperoxidase	100 ng/ml	< 0,060	< LoB
Immunoglobulin E	500 ng/ml	< 0,060	< LoB

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 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 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 to 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.
- 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. 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).

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
	Consult specification data sheet		



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49(0) 62 51/70 19 00

Fax: +49(0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com