

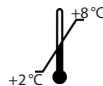
IDK[®] MPO ELISA

***Zur in-vitro Bestimmung von Myeloperoxidase (MPO)
in Serum und Plasma***

***For the in vitro determination of myeloperoxidase (MPO)
in serum and plasma***

Gültig ab / Valid from: 2022-01-05

REF **K 6631B**



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Präanalytik</i>	5
<i>Serumproben</i>	6
<i>EDTA-Plasma</i> proben	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	11
<i>Linearität</i>	12
<i>Analytische Spezifität</i>	13
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	13
13. TECHNISCHE MERKMALE	14
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14
15. LITERATUR	15
<i>Allgemeine Publikationen</i>	15
<i>Publikationen mit dem IDK® MPO-ELISA</i>	15

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von MPO (Myeloperoxidase) aus Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

MPO ist Teil des Abwehrmechanismus der polymorphnukleären Leukozyten gegen körperfremde Stoffe. Wenn es zu einer bakteriellen Infektion kommt, wandern diese Leukozyten, stimuliert durch chemotaktisch wirksame Substanzen (Leukotriene, Komplementfaktoren, Bakterientoxine u.a.), zum Infektionsort. Dort lagern sie sich an die Fremdkörper an und umschließen diese. Befindet sich der Fremdkörper in einer Vakuole, werden verschiedene Stoffe zur intrazellulären Verdauung eingesetzt: Dazu zählen MPO, kationische Proteine, Lysozym, Lactoferrin und einige saure Hydrolasen. Ein starker Schub des oxidativen Stoffwechsels findet statt, wobei in erhöhtem Maß Sauerstoffradikale entstehen. Durch diese Moleküle wird der Fremdstoff zerstört. Bei diesem Vorgang gelangen einige dieser Abwehrstoffe in den extrazellulären Raum. Dies geschieht besonders dann, wenn die Leukozyten den Fremdkörper aufgrund der Größe nicht umschließen können oder wenn sie selbst zerstört werden (durch Bakterientoxine, kristalline Substanzen u.a.).

MPO bildet mit Wasserstoffperoxid und einem Halogen ein sehr starkes antimikrobielles System, das eine Vielzahl von Mikroorganismen wirksam bekämpfen kann. MPO ist in den neutrophilen Leukozyten in hoher Konzentration vorhanden, während Wasserstoffperoxid erst durch den Stoffwechschel Schub in stärkerem Maß gebildet oder durch die angegriffenen Mikroorganismen freigesetzt wird. Das MPO-System wird durch Katalase, überschüssiges H_2O_2 und einige andere Reduktionsmittel (z.B. Ascorbinsäure, Glutathion) gehemmt. Fehlen diese Substanzen, so kann das MPO-System im extrazellulären Raum auch andere Zellen angreifen. Dazu gehören Spermatozyten, Erythrozyten, Leukozyten und Tumorzellen.

Auch bei nicht-infektiösen Krankheiten spielt die MPO eine Rolle, z.B. bei der Atherosklerose (MPO wurde in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen), bei Lungenkrebs, der Alzheimer-Krankheit oder bei der Multiplen Sklerose. Verschiedene Untersuchungen lassen vermuten, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen MPO, Inflammation und akuten wie auch chronischen Manifestationen bei kardiovaskulären Erkrankungen besteht.

Brennan et al. (2003) zeigten anhand von 604 Patienten mit Brustschmerzen, dass eine einzige initiale Messung von MPO im Serum eine unabhängige, frühe Voraussage des unmittelbaren Myokardinfarktrisikos sowie eine prognostische Abschätzung für das nächste halbe Jahr ermöglicht. Im Gegensatz zu Troponin T, der Kreatinkina-

se-MB-Isoform und CRP ist MPO bereits erhöht, ohne dass zuvor eine Myokardnekrose stattgefunden hat.

Fazit: Die Messung von MPO könnte künftig der Risikostratifizierung kardiovaskulärer Krankheiten sowohl bei chronischer Erkrankung als auch der Identifizierung von Risikopatienten dienen.

Indikationen

- Marker für Entzündungsaktivitäten im gastrointestinalen Bereich (Stuhl)
- Nierentransplantat-Abstoßung (Urin)
- Oxidativer Stress (Serum)
- Zur Differenzierung von allergischem und infektbedingtem Asthma (Bronchiallavage, Atemluftkondensat, Sputum)
- Verbesserte Risikoabschätzung bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (Serum)

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6631B	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 6631B	CONJ	Konjugatkonzentrat, Kaninchen anti-MPO, Peroxidase-markiert	1 x 50 µl
K 6631B	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	4 x 6 vials
K 6631B	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6631B	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6631B	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
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*
- Laborwaage
- 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 auf dem Etikett angegeben 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.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.

- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:301** in **Waschpuffer** verdünnt (40 µl CONJ + 12 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat (1:301 verdünntes CONJ) ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Präanalytik

Bei den Untersuchungen von Plasma oder Serum können sich die ermittelten MPO-Werte deutlich unterscheiden. 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, desto höhere MPO Konzentrationen werden ermittelt. Bei Verwendung von Plasma muss die Präanalytik konstant sein. Das gilt generell und unabhängig von dem verwendeten Testsystem.
- Frisch abgenommenes Serum/Plasma sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden. Es kann entweder am gleichen Tag im Test eingesetzt oder bei -20 °C für 3 Monate gelagert werden. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test Proben gut mischen. Wir empfehlen alle Werte in Doppelbestimmungen zu ermitteln.
- Die Präanalytik ist entscheidend für akkurate und stabile/reproduzierbare MPO-Messergebnisse.
- Shih et al. (2008) berichten über immer höhere MPO-Konzentrationen in Serum und Heparin-Plasma-Proben im Vergleich zu EDTA- oder Citrat-Plasma-Proben und empfehlen die Analyse von EDTA-Plasma-Proben. Ferner untersuchten die Autoren den Einfluss der Präanalytik, der Lagerungs-Temperatur und -Zeit auf die MPO-Messergebnisse von EDTA-, Lithium-Heparin- und Citrat-Plasma-Proben. Alle Proben ergaben einen Unterschied von weniger als 10% nach Lagerung bei Raumtemperatur für 2 Tage, bei 2–8 °C für 8 Tage und nach 3 Zyklen Einfrieren/Auftauen.

- Videm (1996) beschreibt bei Heparin-Konzentrationen, wie bei klinischer Dosierung verwendet werden, eine dosisabhängige Erhöhung der Granulozyten-Aktivität, die durch quantitative ELISA Bestimmung der MPO-Freisetzung untersucht wurde. Daher sollte bei der Auswertung der MPO-Ergebnisse für Proben von Patienten unter systematischer Heparintherapie der direkte Einfluss von Heparin auf Granulozyten bzw. auf die MPO-Freisetzung und -Konzentration berücksichtigt werden.

Serumproben

Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:40** in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt.

Zum Beispiel: **25 µl** Probe + **975 µl** SAMPLEBUF, gut mischen.

100 µl der Verdünnung werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

EDTA-Plasmaproben

Plasmaproben werden vor dem Einsatz im Test **1:10** in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt.

Zum Beispiel: **100 µl** Probe + **900 µl** SAMPLEBUF, gut mischen.

100 µl der Verdünnung werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von humaner MPO und basiert auf der Sandwich-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte polyklonale Antikörper, die humanes MPO erkennen, verwendet.

Standards, Kontrollen und verdünnte Proben, die MPO enthalten, werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, deren Vertiefungen mit einem hochaffinen polyklonalen anti-humanen-MPO-Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird die MPO aus der Probe vom gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat (ein peroxidasemarkierter polyklonaler anti-MPO-Antikörper) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes MPO – Peroxidasekonjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch folgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem MPO-Gehalt direkt proportional. 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 Waschschrift 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 Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung 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 Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.

10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
11.	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.

Serum

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 40** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Plasma

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 10** 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 können 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:

LoB × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

LoB 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

Anhand einer laborinternen Studie mit Serum- und EDTA-Plasmaproben von augenscheinlich Gesunden wurde folgender Referenzbereich ermittelt

MPO aus Serum (n = 20) Median = 444 ng/ml

MPO aus EDTA-Plasma (n = 20) Median = 108 ng/ml

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 40

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	465,93	2,6
2	198,94	2,3

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 24

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 4 Serumproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	459,87	4,8
2	190,62	5,3
3	199,06	4,8
4	798,43	5,8

Analytische Sensitivität

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

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,128 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 0,260 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 0,324 ng/ml

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

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 5 Serumproben wurden dafür mit bekannten MPO-Konzentrationen versetzt und gemessen. Die Proben wurden durch das Spike-Volumen verdünnt. Dies wurde bei der Berechnung der erwarteten Werte berücksichtigt. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ermittelt:

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
5,22	2,4	6,93	6,55	94,55
	4,6	8,57	8,10	94,52
	8,9	11,67	10,62	91,00
	16,6	17,23	14,16	82,16
5,07	2,4	6,78	6,79	100,14
	4,6	8,43	8,59	101,95
	8,9	11,53	11,73	101,72
	16,6	17,10	16,50	96,48
7,58	9,24	9,13	9,24	98,80
	10,84	9,71	10,84	89,59
	13,86	11,80	13,86	85,16
	19,27	15,53	19,27	80,61
16,22	1,8	18,25	17,60	96,41
	3,6	20,21	18,96	93,81
	6,8	23,91	20,02	83,74
	12,7	30,53	25,89	84,79
13,75	1,8	15,83	14,85	93,79
	3,6	17,84	16,26	91,16
	6,8	21,62	19,11	88,39
	12,7	28,41	24,73	87,06

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels einer seriellen Verdünnung von 3 Serum- und 3 Plasmaproben nachgewiesen.

Für MPO in Serum und Plasma wurde in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ein lineares Verhalten im Bereich von 0,93 bis 23,23 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
Serum 1	1:40	8,44	8,44	100,00
	1:80	4,22	4,87	115,52
	1:160	2,11	2,56	121,47
Serum 2	1:40	4,87	4,87	100,00
	1:80	2,44	2,83	116,17
	1:160	1,22	1,52	124,38
Serum 3	1:40	7,56	7,56	100,00
	1:80	3,78	4,24	112,12
	1:160	1,89	2,24	118,66
Plasma 1	1:10	3,73	3,73	100,00
	1:20	1,86	2,01	107,73
	1:40	0,93	1,12	120,10
Plasma 2	1:20	9,15	9,15	100,00
	1:40	4,58	3,75	81,91
Plasma 3	1:20	23,23	23,23	100,00
	1:40	11,62	13,37	115,06

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration	Gefundene Konzentration [ng/ml]	Fazit
α1-Antitrypsin	90 µg/l	0,010	< LoB
Albumin	800 µg/l	0,009	< LoB
CRP	150 ng/ml	0,009	< LoB
Lysozym	30 ng/ml	0,008	< LoB
slgA	600 ng/ml	0,012	< LoB
PMN-Elastas	40 ng/ml	0,019	< LoB
Calprotectin	500 ng/ml	0,008	< LoB
Hämoglobin	100 ng/ml	0,013	< LoB

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.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

Achtung: Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- 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













Allgemeine Publikationen

1. Klebanoff SJ (1999) *Proc Assoc Am Physicians* **111**(5):383-9
2. Oremek et al. (1995) *MTA* **4**: 273-278
3. Markant et al. *Pharmazeutische Zeitung* **26**/1995, 140. Jahrgang: 9-25
4. Saiki (1998) Kurume *Med J* **45**: 69-73
5. Zhang R et al. (2001) *JAMA* **286** : 2136-2142
6. Brennan M et al. (2003) *N Engl J Med* **349** : 1595-1604
7. Baldus S et al. (2003) *Circulation* **108** : 1440-1445
8. Shih et al. (2008) Affect of Collection Tube Type and Preanalytical Handling on Myeloperoxidase Concentrations *Clinical Chemistry* **54**:6 1076–1079
9. Videm V. (1996) Heparin in clinical doses, primes' granulocytes to subsequent activation as measured by myeloperoxidase release. *Scand J Immunol. Apr*; **43**(4):385-90.

Publikationen mit dem IDK® MPO-ELISA

10. Exner M et al. (2006) *JACC* **47** (11) 2212-2218
11. Holz O et al. (2005) *J Clin Pharmacol* **45**(5):498-503
12. Stepan H et al. (2003) *Hypertens Pregnancy* **22**(3):239-45
13. Stepan H et al. (2002) Poster zum 10. Kongress der DGPG

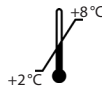
Verwendete Symbole:

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

IDK[®] MPO ELISA

*For the in vitro determination of myeloperoxidase (MPO)
in serum and plasma*

Valid from 2022-01-05



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	19
2. INTRODUCTION	19
3. MATERIAL SUPPLIED	20
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	21
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	21
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	22
<i>Preanalytic handling</i>	22
<i>Serum samples</i>	23
<i>EDTA-plasma samples</i>	23
7. ASSAY PROCEDURE	23
<i>Principle of the test</i>	23
<i>Test procedure</i>	23
8. RESULTS	25
9. LIMITATIONS	25
10. QUALITY CONTROL	26
<i>Reference range</i>	26
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	26
<i>Analytical sensitivity</i>	26
<i>Accuracy – Precision</i>	27
<i>Analytical specificity</i>	27
<i>Accuracy - Trueness</i>	28
<i>Linearity</i>	29
12. PRECAUTIONS	30
13. TECHNICAL HINTS	30
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	31
15. REFERENCES	31
<i>General literature</i>	31
<i>Literature using IDK® MPO ELISA</i>	31

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of MPO (myeloperoxidase) in serum and plasma For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

MPO is part of the defence mechanism of the polymorphonuclear leukocytes against exogenic substances. During bacterial infection, these leukocytes are stimulated by chemotactically effective substances (leukotrienes, complement factors, bacterial toxins etc.). They move to the site of the infection and encapsulate the foreign substances. If the foreign agent is located in an intracellular vacuole, different substances are used for the intracellular digestion. Amongst these are MPO, cationic proteins, lysozyme, lactoferrin and some acidic hydrolases. A strong surge of oxidative metabolism takes place, producing a high number of oxygen radicals which leads to the destruction of foreign proteins. Some of these molecules can leak into the extracellular space during this process. This happens to a greater extent, when the leukocytes cannot encapsulate the foreign body because of its size or in cases where the neutrophils are destroyed (by bacterial toxins, crystalline substances etc.).

MPO, together with hydrogen peroxide and a halogen, forms a very strong anti microbial system, which can effectively combat a number of microorganisms. MPO is present at high concentration in neutrophil granulocytes, whereas hydrogen peroxide is produced during infection/ inflammation. The MPO system is inhibited by catalase, excess of hydrogen peroxide and other reducing substances (e.g. ascorbic acid, glutathione). In the absence of these agents other cells in the extracellular space can be affected (e.g. spermatoocyte, erythrocytes, leukocytes, and tumor cells)

Apart from its implications in host defence, involvement of MPO has been described in numerous non-infectious diseases such as atherosclerosis, lung cancer, Alzheimer's disease, and multiple sclerosis. MPO is present and active within atherosclerotic lesions. Numerous lines of evidence suggest mechanistic links between myeloperoxidase, inflammation and both acute and chronic manifestations of cardiovascular disease.

Brennan et al. (2003) showed that in 604 sequentially ascertained patients presenting with chest pain, a single initial measurement of plasma myeloperoxidase was an independent early predictor of myocardial infarction, as well as the risk of major adverse cardiac events in ensuing 30-day and 6-month periods. In contrast to troponin T, creatine kinase MB isoform, and C-reactive protein levels, MPO levels may identify patients at risk for cardiac events in the absence of myocardial necrosis.

Summary: The inflammatory protein myeloperoxidase is present, active and mechanistically poised to participate in the initiation and progression of cardiovascular disease. The many links between myeloperoxidase, oxidation and cardiovascular disease suggest this leukocyte protein may have clinical utility in risk stratification for cardiovascular disease status and outcomes.

Indications

- Marker for inflammatory activities in the gastrointestinal tract (Stool)
- Renal transplant rejection (Urine)
- Oxidative stress (Serum)
- For the differentiation between allergic and infectious asthma (bronchial lavage, respiratory condensate, sputum)
- Prediction of risk in patients with acute coronary syndromes (Serum)

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6631B	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 6631B	CONJ	Conjugate concentrate, rabbit anti-MPO, peroxidase labelled antibody	1 x 50 µl
K 6631B	STD	MPO-Standards, lyophilised (see specification for concentrations)	4 x 6 vials
K 6631B	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6631B	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6631B	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
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*
- Laboratory balance
- 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
- Centrifuge, 3000 g
- 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. 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 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 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 **specification data sheet**. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **are not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:301** in wash buffer (40 µl CONJ + 12 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:301 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored**.

- 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. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Preanalytic handling

Significant differences in the MPO levels can be observed due to different sample preparation procedures, e.g. analysis of plasma or serum samples. The reasons are as follows:

- The granulocytes are activated during the serum clotting and release granulocyte-activating markers. The time between serum collecting and analysis as well as repeated freeze-thaw cycles don't cause a MPO 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 MPO levels. Therefore, the preanalytical conditions of plasma samples should be held constant. This is a general requirement independent of the test-system used.
- Fresh collected serum/plasma should be centrifuged within one hour. Store samples at -20 °C for up to 3 months if not assayed on the same day. Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicate analyses for each sample.
- The preanalytical handling is critical for accurate and consistent/reproducible MPO measurement results.
- Shih et al. (2008) report that MPO concentrations were consistently higher in serum and heparin plasma samples than in samples in EDTA or citrate and recommend the analysis of EDTA plasma samples. Furthermore, the authors investigated the effects of preanalytical handling, storage temperature and time for EDTA plasma, lithium-heparin and citrate preparation. Less than 10% differences were found after storage of samples at room temperature for 2 days, after storage at 2–8 °C for 8 days, and after 3 freeze-thaw cycles for all sample types
- Videm (1996) describes at heparin concentrations, as applied in clinical practice, a dose-dependent increase in granulocyte activation as measured by MPO release, quantitated in enzyme-immunoassay. Thus, direct effects of heparin on granulocytes, e.g. MPO release and concentration, should be taken into consideration for the evaluation of MPO results of samples from patients receiving systemic heparin therapy.

Serum samples

Serum samples must be diluted **1:40** before performing the assay,

e.g. **25 µl** sample + **975 µl** SAMPLEBUF, mix well.

100 µl of the dilution are used in the test.

EDTA-plasma samples

EDTA plasma samples must be diluted **1:10** before performing the assay,

e.g. **100 µl** sample + **900 µl** SAMPLEBUF, mix well

100 µl of the dilution are used in the test.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the determination of human MPO and utilises the two-site sandwich technique. Two selected polyclonal antibodies bind to human MPO.

Standards, controls and prediluted patient samples containing human MPO are added to wells of microplate that was coated with a high affine polyclonal anti-human MPO antibody. After the first incubation period, antibody immobilised on the wall of microtiter wells captures human MPO in the sample. Then a peroxidase-conjugated polyclonal anti-human MPO antibody is added to each microtiter well and a “sandwich” of capture antibody – human MPO – Peroxidase conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally an acidic stop solution is 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 MPO in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. MPO, 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 plate tightly 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 conjugate (diluted CONJ) 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 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 substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30°C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
11.	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 standard 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 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.

Serum

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 40** to get the actual concentrations.

Plasma

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 10** 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 can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher 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:

$$\text{LoB} \times \text{sample dilution factor to be used}$$

LoB 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

Based on Immundiagnostik AG studies of serum and EDTA-plasma samples of apparently healthy persons the following reference range was estimated.

MPO from serum (n = 20)	median = 444 ng/ml
MPO from EDTA-plasma (n = 20)	median = 108 ng/ml

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity

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

Limit of blank, LoB	0.128 ng/ml
Limit of detection, LoD	0.260 ng/ml
Limit of quantitation, LoQ	0.324 ng/ml

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

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 40

The repeatability was assessed with 2 serum samples under **constant** parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	465.93	2.6
2	198.94	2.3

Reproducibility (Inter-Assay); n = 24

The reproducibility was assessed with 4 serum samples under **varying** parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	459.87	4.8
2	190.62	5.3
3	199.06	4.8
4	798.43	5.8

Analytical specificity

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

Substance tested	Concentration added	Concentration obtained [ng/ml]	Conclusion
α1-Antitrypsin	90 µg/l	0.010	< LoB
Albumin	800 µg/l	0.009	< LoB
CRP	150 ng/ml	0.009	< LoB
Lysozyme	30 ng/ml	0.008	< LoB
sIgA	600 ng/ml	0.012	< LoB
PMN-Elastase	40 ng/ml	0.019	< LoB
Calprotectin	500 ng/ml	0.008	< LoB
Hemoglobin	100 ng/ml	0.013	< LoB

Accuracy - Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, MPO-spikes with known concentrations were added to 5 different serum samples. The samples were diluted by the volume of the spike. This was considered when calculating the expected values. The results below were obtained without consideration of the sample dilution factor:

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
5.22	2.4	6.93	6.55	94.55
	4.6	8.57	8.10	94.52
	8.9	11.67	10.62	91.00
	16.6	17.23	14.16	82.16
5.07	2.4	6.78	6.79	100.14
	4.6	8.43	8.59	101.95
	8.9	11.53	11.73	101.72
	16.6	17.10	16.50	96.48
7.58	9.24	9.13	9.24	98.80
	10.84	9.71	10.84	89.59
	13.86	11.80	13.86	85.16
	19.27	15.53	19.27	80.61
16.22	1.8	18.25	17.60	96.41
	3.6	20.21	18.96	93.81
	6.8	23.91	20.02	83.74
	12.7	30.53	25.89	84.79
13.75	1.8	15.83	14.85	93.79
	3.6	17.84	16.26	91.16
	6.8	21.62	19.11	88.39
	12.7	28.41	24.73	87.06

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 3 serum and 3 plasma samples.

For MPO in serum and plasma, the method has been demonstrated to be linear from 0.93 to 23.23 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 [%]
Serum 1	1:40	8.44	8.44	100.00
	1:80	4.22	4.87	115.52
	1:160	2.11	2.56	121.47
Serum 2	1:40	4.87	4.87	100.00
	1:80	2.44	2.83	116.17
	1:160	1.22	1.52	124.38
Serum 3	1:40	7.56	7.56	100.00
	1:80	3.78	4.24	112.12
	1:160	1.89	2.24	118.66
Plasma 1	1:10	3.73	3.73	100.00
	1:20	1.86	2.01	107.73
	1:40	0.93	1.12	120.10
Plasma 2	1:20	9.15	9.15	100.00
	1:40	4.58	3.75	81.91
Plasma 3	1:20	23.23	23.23	100.00
	1:40	11.62	13.37	115.06

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 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- 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 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.
- 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

General literature

1. Klebanoff SJ (1999) *Proc Assoc Am Physicians* **111**(5):383-9
2. Oremek et al. (1995) *MTA* **4**: 273-278
3. Markant et al. *Pharmazeutische Zeitung* **26**/1995, 140. Jahrgang: 9-25
4. Saiki (1998) *Kurume Med J* **45**: 69-73
5. Zhang R et al. (2001) *JAMA* **286** : 2136-2142
6. Brennan M et al. (2003) *N Engl J Med* **349** : 1595-1604
7. Baldus S et al. (2003) *Circulation* **108** : 1440-1445
8. Shih et al. (2008) Affect of Collection Tube Type and Preanalytical Handling on Myeloperoxidase Concentrations *Clinical Chemistry* **54**:6 1076–1079
9. Videm V. (1996) Heparin in clinical doses, primes' granulocytes to subsequent activation as measured by myeloperoxidase release. *Scand J Immunol. Apr*; **43**(4):385-90.













Literature using IDK® MPO ELISA

10. Exner M et al. (2006) *JACC* **47** (11) 2212-2218
11. Holz O et al. (2005) *J Clin Pharmacol* **45**(5):498-503

12. Stepan H et al. (2003) *Hypertens Pregnancy* **22**(3):239-45

13. Stepan H et al. (2002) Poster zum 10. Kongress der DGPG

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		Irritant