

Relaxin ELISA

**Zur in-vitro-Bestimmung von Relaxin in Serum, Plasma,
Urin, Seminalplasma und Gewebe**

**For the in vitro determination of relaxin in serum, plasma,
urine, seminal plasma and tissue**

Gültig ab / Valid from 2022-05-25

REF K 9210



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	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Probenlagerung</i>	5
<i>Probenvorbereitung</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	10
<i>Referenzwerte</i>	10
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Spezifität</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Relaxin in Serum, Plasma, Urin, Seminalplasmen und Gewebe geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Relaxin ist ein Peptidhormon der Insulinfamilie mit einem Molekulargewicht von 6500 Da. Seine Hauptfunktion ist die relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur. Wegen der stark erhöhten Konzentration des Relaxins während der Ovulation und Schwangerschaft liegen die meisten Erkenntnisse über die Eigenschaften von Relaxin im Bereich der Reproduktionsmedizin und Gynäkologie vor. In letzter Zeit wurden jedoch neue Wirkungen von Relaxin entdeckt. Es wurde insbesondere gezeigt, dass Relaxin: (i) die Dilatation von Blutgefäßen in Organen und Geweben, wie z. B. Uterus, Brustdrüse, Lunge und Herz, fördert; (ii) chronotropisch auf das Herz wirkt; (iii) die Stimulation vom potentesten Vasokonstriktor, Endothelin 1, bei Herzinfarkt inhibiert; (iv) die Histaminfreisetzung aus den Mastzellen hemmt und auf diese Weise die allergischen Symptome bei Asthma lindert; (v) die Plättchenaggregation und -freisetzung aus den Megakaryozyten vermindert; (vi) die Hormonsekretion der Hypophyse beeinflusst; und (vii) zur Regulation des Flüssigkeitsgleichgewichts im Körper beiträgt.

Spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für Relaxin, LGR7 und LGR8 wurden im Gehirn (Wechselwirkung mit ADH-Sekretion), Uterus und Herzen (Einfluss auf die Herzfrequenz) identifiziert. Dschietzig et al. (2004) zeigten, dass Relaxin als Glukokortikoid-Rezeptor-Agonist agiert. In weiteren Arbeiten wird der Zusammenhang zwischen Relaxin und oxidativem Stress beschrieben. Bani et al. (1997) und Nistri et al. (2003) berichten, dass Relaxinzusatz in die Reperfusionslösung von ischämischen Rattenherzen Schutz gegen oxidative Veränderungen des Myokardgewebes bietet. Dabei wird die Produktion von Malondialdehyd (Abbauprodukt bei der Lipidoxidation) und Myeloperoxidase (Marker für die Granulozytenaktivität) deutlich vermindert. Als Folge wird eine geringere Schädigung durch Ischämie/Reperfusion am Myokardgewebe, und dadurch bedingt auch eine geringere Mortalitätsrate beobachtet. Dass das Peptidhormon ein unabhängiger Risikofaktor zur Voraussage der Mortalität bei männlichen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (TNI) ist, zeigen schließlich Hocher et al. (2004) an 245 Langzeitdialysepatienten.

Indikationen

- Untersuchungen zum Schutz bei Reperfusion/Ischämie
- Untersuchungen zur Regulation der Zirkulation und Mikrozirkulation von Körperflüssigkeiten
- Untersuchungen zur Angiogenese

- Untersuchungen zur Immunmodulation
- Untersuchungen in der Reproduktionsmedizin
- Prognosefaktor zur Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit Niereninsuffizienz

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9210	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 9210	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidasemarkiert	1 x 1 vial
K 9210	AB	Detektionsantikörperkonzentrat, biotinyliertes Kaninchen anti-Relaxin	1 x 1 vial
K 9210	STD	Standards, lyophilisiert (0; 3.1; 9.3; 28; 83; 250 pg/ml)	2 x 6 vials
K 9210	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 9210	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 9210	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 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*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1 000 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 $> 0,2\mu\text{m}$) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,055\mu\text{S}/\text{cm}$ bei 25°C ($\geq 18,2\text{M}\Omega\text{cm}$).

Nur für Gewebeextrakte

- Micro-Dismembrator
- Ultra-Zentrifuge, 100 000 g

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 $^\circ\text{C}$** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 $^\circ\text{C}$** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 $^\circ\text{C}$** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **500 μl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **können 4 Wochen bei 2–8 $^\circ\text{C}$ gelagert werden**.
- **Vorbereitung des biotinylierten Antikörpers:** Das **Antikörperkonzentrat (AB)** wird vor Gebrauch **1:1 001** in **Waschpuffer** verdünnt (10 μl AB + 10 ml Waschpuffer). Das AB ist bei **2–8 $^\circ\text{C}$** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum

stabil. **Biotinylierter Antikörper** (1:1 001 verdünntes AB) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**

- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:1 001** in **Waschpuffer** verdünnt (10 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das **CONJ** ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:1 001 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

Probenlagerung

Serum, Plasma, Urin, Seminalplasma und Gewebe sind bei -20 °C zu lagern.

Probenvorbereitung

Serum und Plasma

Serum und Plasma Proben werden vor dem Einsatz im Test mindestens **1:3** verdünnt, z.B. **100 µl** Probe + **200 µl** Verdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen.

Für eine Bestimmung in Doppelwerten werden **2 x je 100 µl** jeder vorbereiteten Probe im Test eingesetzt.

Serum und Plasma Proben können Rheumafaktor und heterophile Antikörper enthalten. Diese stellen eine potenzielle Interferenz dar, welche bei Sandwich-Immunoassays zu falsch positiven Ergebnissen führen können.

Daher empfehlen wir eine Probenvorbehandlung der Serum- und Plasmaproben 2x mit 5% (v/v) Anti-Interferenzreagenz (Immundiagnostik-Artikelnummer K 9212) wie folgt:

- 10 µl Anti-Interferenzreagenz + 200 µl Probe
- 1 Stunde bei 4 °C schütteln
- zentrifugieren und den Überstand abnehmen (vorbehandelte Probe).

Urin

Urinproben werden vor dem Einsatz im Test mindestens **1:4** verdünnt, z.B. **100 µl** Probe + **300 µl** Verdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen.

Für eine Bestimmung in Doppelwerten werden **2 x je 100 µl** jeder vorbereiteten Probe im Test eingesetzt.

Seminalplasma

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test mindestens **1:10** verdünnt,

z. B. **30 µl** Probe + **270 µl** Verdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen.

Für eine Bestimmung in Doppelwerten werden **2 x je 100 µl** jeder vorbereiteten Probe im Test eingesetzt.

Gewebeextrakt

- Gewebeproben (ab 200 mg) aus dem flüssigen Stickstoff entnehmen und in dem vorgefrorenen Schüttelbehälter im Micro-Dismembrator (30 s/1 500 Upm) pulverisieren.
- Mit 1 ml Phosphatpuffer (0,14 M NaCl; 2,6 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄), 1 % Triton-X 100; pH 7,4 homogenisieren. Nach der Ultra-Zentrifugation (1 h/100 000 g) im Überstand die Proteinkonzentration (Pierce-BCA oder wahlweise Peterson-Lowry Protein Assay) bestimmen.
- **2 x je 100 µl des** Zytosol-Überstands im Assay einsetzen.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

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

Teststandards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf Relaxin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen polyklonalen anti-human Realaxin Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Relaxin von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Anschließend wird mit dem Detektionsantikörper (biotinylierter, polyklonaler anti-Relaxin Antikörper) inkubiert. Dann wird das Konjugat (Streptavidin, peroxidase-markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes Relaxin – Detektionsantikörper – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Relaxin-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. Wir empfehlen eine Vorbehandlung der Plasma- und Serumproben mit dem Immunodiagnostik Anti-Interferenzreagenz (Artikelnummer K 9212).

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.	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 Standards/Kontrollen/Proben in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und über Nacht (16–22 Stunden) bei 4–8 °C 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 2 Stunden bei 4–8 °C 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 (verdünntes CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 4–8 °C inkubieren.

10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x 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.	20–30 min* bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
13.	50 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut 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.

* 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 und Plasma

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 3** 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.

Urin

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 4** 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.

Seminalplasma

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.

Gewebeextrakt

Die ermittelten Konzentrationen werden mit der gewählten Verdünnung multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu ermitteln.

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 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

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

Probe	Relaxin [pg/ml]	VK [%]
1	23,9	5,1
2	66,0	5,2

Inter-Assay (n = 20)

Probe	Relaxin [pg/ml]	VK [%]
1	28,0	4,9
2	42,0	7,9

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,5 pg/ml.

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu Insulin gefunden.

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Patientenproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2)

Probe	Verdünnung	Relaxin erwartet [pg/ml]	Relaxin gemessen [pg/ml]
A	1:5	24,7	25,2
	1:6	20,6	21,0
	1:7	17,7	18,5
B	1:5	24,4	23,1
	1:6	20,4	20,0
	1:7	17,5	17,4

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 gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- 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 beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Armbruster et al. (2001) *Eur J Med Res* **6**:1-9
2. Armbruster et al. (2001) *Proceed third Intern Conference on Relaxin & Related Peptides*, 2-27 October 2000, Broome, Australia , 273-274. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 2-10-200
3. Bani D (1997) *Gen. Pharmac.* **28**:13-22
4. Bani D et al. (1998) *A. J. Pathology* **152**:1367-1375
5. Nistri S et al. (2003) *FASEB J* **17** (14) 2109-2111
6. Dschietzig R, Stangl K (2002) *CMLS* **59**: 1-13 (Review)
7. Dschietzig et al. (2004) *Abstract of Fourth Intern Conference on Relaxin & Related Peptides*, September 5-10, Jackson Hole, USA
8. Hocher B et al. (2004) *Circulation* **109**: 2266-2268

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Verwendbar bis



Achtung



Gebrauchsanweisung beachten



Spezifikationsdatenblatt beachten



Reizend

Relaxin ELISA

*For the in vitro determination of relaxin in serum, plasma,
urine, seminal plasma and tissue*

Valid from 2022-05-25

REF K 9210



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

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	19
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	20
<i>Sample storage</i>	20
<i>Sample preparation</i>	20
7. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	23
9. LIMITATIONS	24
10. QUALITY CONTROL	24
<i>Reference range</i>	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Analytical Sensitivity</i>	25
<i>Dilution recovery</i>	25
<i>Specificity</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27
15. REFERENCES	27

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of relaxin in serum, plasma, urine, seminal plasma and tissue samples. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Relaxin is a peptide hormone with a molecular weight of 6500 Da that belongs to the insulin family. Its main function is the relaxation of smooth musculature. Because of the increased relaxin levels during ovulation and pregnancy most of the knowledge about its physiological properties is gained in the field of gynecology and reproductive sciences. Recently, novel sites of relaxin action have been recognised. In particular, it has been shown that relaxin: (i) promotes dilation of blood vessels in several organs and tissues, including the uterus, the mammary gland, the lung and the heart; (ii) has a chronotropic action on the heart; (iii) inhibits the stimulation of endothelin-1, the most potent vasoconstrictor in heart failure; (iv) inhibits the release of histamine by mast cells, thus being able to counteract experimental allergic asthma; (v) depresses aggregation of platelets and their release by megakaryocytes; (vi) influences the secretion of hormones by the pituitary gland; and (vii) contributes to the regulation of fluid balance.

Specific G protein-coupled receptors for relaxin, LGR7 and LGR8, have been found in the brain (interaction with ADH-secretion), uterus and heart (effect on the heart frequency). Dschietzig et al. (2004) report that relaxin acts as a glucocorticoid-receptor-agonist. Recent publications describe a relationship between relaxin and oxidative stress. Bani et al. (1997) and Nistri (2003) demonstrate, that relaxin added to reperfusion solutions protects myocardial tissue of ischemic rat hearts against oxidative damage. Moreover, the production of malondialdehyde (degradation product during lipid oxidation) and myeloperoxidase (marker for the activity of granulocytes) has been significantly reduced. As a result, reduced damage of the myocardial tissue during ischemia/reperfusion, and as a consequence, reduced death rates have been observed. Finally, Hocher et al. (2004) found relaxin as an independent risk factor predicting death in a survey of 245 male patients with end-stage renal disease (ESRD) on chronic hemodialysis.

Indications

- Determination of the protection efficiency during reperfusion/ ischemia
- Regulation of blood pressure and heart frequency, microcirculation
- Studies of angiogenesis
- Studies of immunomodulation
- Examinations in the area of reproduction medicine
- Predicting factor for survival of ESRD-patients

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9210	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 9210	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 1 vial
K 9210	AB	Detection antibody concentrate, biotin labelled rabbit anti-Relaxin	1 x 1 vial
K 9210	STD	Standards, lyophilised (0; 3.1; 9.3; 28; 83; 250 pg/ml)	2 x 6 vials
K 9210	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 9210	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 9210	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 50 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*
- Calibrated precision pipettors and 10–1 000 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).

Only for tissue extraction

- Micro-dismembrator
- Ultra-centrifuge, 100 000 g

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. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **500 µl of ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at 2–8 °C for 4 weeks**.
- **Preparation of the detection antibody:** Before use, the **detection antibody concentrate (AB)** has to be diluted **1:1 001** in wash buffer (10 µl AB + 10 ml wash buffer). The AB is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Detection antibody** (1:1 001 diluted AB) **is not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:1 001** in **wash buffer** (10 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The **CONJ** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:1 001 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

Sample storage

Serum, plasma, urine, seminal plasma and tissue can be stored at -20 °C.

Sample preparation

Serum and plasma

EDTA plasma or serum samples must be diluted at least **1:3** before performing the assay,

e.g. **100 µl** sample + **200 µl** dilution buffer (SAMPLEBUF), mix well.

For testing in duplicates, pipet **2 x 100 µl** of each prepared sample per well.

Serum and plasma samples could contain rheumatoid factor and heterophilic antibodies, which can cause false positive results in sandwich immunoassays. To reduce the potential interference from rheumatoid factor and heterophylic antibodies, the samples can be cleared by treating twice with 5% (v/v) Anti Interference Reagent (Immundiagnostik Catalog number K 9212) as follows:

- 10 µl anti interference reagent + 200 µl sample
- shake for 1 hour at 4 °C
- centrifuge and collect the supernatant (pre-cleared/pre-treated sample).

Urine

Urine samples must be diluted at least **1:4** before performing the assay, e.g. **100 µl** sample + **300 µl** dilution buffer (SAMPLEBUF), mix well.

For testing in duplicates, pipet **2 x 100 µl** of each prepared sample per well.

Seminal plasma

Seminal plasma must be diluted at least **1:10** before performing the assay, e.g. **10 µl** sample + **1 990 µl** dilution buffer (SAMPLEBUF), mix well.

For testing in duplicates, pipet **2 x 100 µl** of each prepared sample per well.

Tissue extract

- Pulverise about 200 mg of deep frozen tissue sample in a pre-frozen shaking holder of a micro-dismembrator (30 s/1 500 rpm).
- Homogenise the powder in 1 ml of phosphate buffer(0,14 M NaCl, 2.6 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 1 % Triton-X 100, pH 7.4). After ultra-centrifugation (1 h/100 000 g), the protein concentration should be determined in the supernatant by the commercially available Pierce-BCA or Peterson-Lowry Protein Assay.
- For testing in duplicates, pipet **2 x 100 µl** of each supernatant per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of relaxin. The assay utilises the “sandwich” technique with two selected polyclonal antibodies that bind to human Relaxin.

Assay standards, controls and pre-diluted patient samples which are assayed for human Relaxin are added into the wells of a microplate coated with a high affine polyclonal anti-human Relaxin antibody. During the first incubation step, Relaxin is bound by the immobilised antibody. Then a detection antibody, biotin-labelled anti Relaxin, is added. Afterwards a peroxidase-conjugate is added into each microtiter well and a “sandwich” of capture antibody - human Relaxin - detection antibody-peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. 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 Relaxin. 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. Relaxin 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. We recommend a pretreatment of plasma and serum samples with the Immundiagnostik Anti Interference Reagent (Catalog number K 9212) prior to analysis.

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 the 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 each well 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards/controls/samples into the respective wells.

3.	Cover the strips and incubate for over night (16-22 hours) at 2–8°C.
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
5.	Add 100 µl detection antibody (diluted AB) in each well.
6.	Cover the strips and incubate for 2 hours at 2–8°C .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) in each well.
9.	Cover the strips and incubate for 1 hour at 2–8°C .
10.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
11.	Add 100 µl substrate (SUB) in each well.
12.	Incubate for 20–30 minutes* at room temperature (15–30°C) in the dark.
13.	Add 50 µl stop solution (STOP) 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.

* 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 and plasma samples

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 3** to get the actual concentrations.

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

Urine samples

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 4** to get the actual concentrations.

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

Seminal plasma samples

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 10** to get the actual concentrations.

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

Tissue extract

The obtained results have to be multiplied with the **used dilution factor** to get the actual concentrations.

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 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

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

Sample	Relaxin [pg/ml]	CV [%]
1	23.9	5.1
2	66.0	5.2

Inter-Assay (n = 20)

Sample	Relaxin [pg/ml]	CV [%]
1	28.0	4.9
2	42.0	7.9

Analytical Sensitivity

The zero standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 0.5 pg/ml.

Dilution recovery

Two patient samples were diluted and analysed. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	Relaxin expected [pg/ml]	Relaxin measured [pg/ml]
A	1:5	24.7	25.2
	1:6	20.6	21.0
	1:7	17.7	18.5
B	1:5	24.4	23.1
	1:6	20.4	20.0
	1:7	17.5	17.4

Specificity

No cross reactivity to insulin 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 harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic color reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immunodiagnostik AG on request.
- 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 the 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.
- 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. Armbruster et al. (2001) *Eur J Med Res* **6**:1-9
2. Armbruster et al. (2001) *Proceed third Intern Conference on Relaxin & Relates Peptides*, 2-27 October 2000, Broome, Australia , 273-274. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 2-10-200
3. Bani D (1997) *Gen. Pharmac.* **28**:13-22
4. Bani D et al. (1998) *A. J. Patholoy* **152**:1367-1375
5. Nistri S et al. (2003) *FASEB J* **17** (14) 2109-2111
6. Dschietzig R, Stangl K (2002) *CMLS* **59**: 1-13 (Review)
7. Dschietzig et al. (2004) *Abstract of Fourth Intern Conference on Relaxin & Related Peptides*, September 5-10, Jackson Hole, USA
8. Hocher B et al. (2004) *Circulation* **109**: 2266-2268

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

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

