

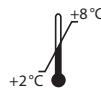
# IDK<sup>®</sup> PMN-Elastase ELISA

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

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

Gültig ab / Valid from 2021-12-17

**REF** K 6841



**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](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Inhalt

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>                          | <b>2</b>  |
| <b>2. EINLEITUNG</b>                                | <b>2</b>  |
| <b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>                    | <b>2</b>  |
| <b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b> | <b>3</b>  |
| <b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>  | <b>3</b>  |
| <b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>          | <b>4</b>  |
| <i>Seminalplasma</i>                                | 4         |
| <i>Serum- und Plasmaproben</i>                      | 4         |
| <b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>                          | <b>5</b>  |
| <i>Testprinzip</i>                                  | 5         |
| <i>Pipettierschema</i>                              | 6         |
| <b>8. ERGEBNISSE</b>                                | <b>7</b>  |
| <b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>                           | <b>8</b>  |
| <b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>                       | <b>9</b>  |
| <i>Referenzwerte</i>                                | 9         |
| <b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>                      | <b>9</b>  |
| <i>Genauigkeit – Präzision</i>                      | 9         |
| <i>Analytische Sensitivität</i>                     | 10        |
| <i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>                    | 10        |
| <i>Linearität</i>                                   | 10        |
| <i>Analytische Spezifität</i>                       | 11        |
| <b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>                      | <b>12</b> |
| <b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>                      | <b>12</b> |
| <b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>             | <b>13</b> |
| <b>15. LITERATUR</b>                                | <b>13</b> |

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von PMN-Elastase aus Serum, Plasma und Seminalplasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

PMN-Elastase aus humanen polymorphkernigen Granulozyten ist ein Glykoprotein von 30 kDa und gehört zur Gruppe der Serinproteasen. Die Freisetzung aktiver PMN-Elastase erfolgt nach entsprechender Reizung aus den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten oder beim Zerfall dieser Zellen.

### Indikationen

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

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art.-Nr.     | Bezeichnung | Kit-Komponenten   | Menge               |
|--------------|-------------|---|---------------------|
| K 6841       | PLATE       | Mikrotitermodul, vorbeschichtet   | 12 x 8 Vertiefungen |
| K 0001.C.100 | WASHBUF     | Waschpufferkonzentrat, 10x  | 2 x 100 ml          |
| K 6841       | CONJ        | Konjugat, Ziege-anti-Maus-Antikörper, peroxidase markiert, gebrauchsfertig                        | 1 x 15 ml           |
| K 6841       | AB          | Detektionsantikörperkonzentrat (2. Antikörper, Maus-anti-PMN-Elastase, monoklonal), lyophilisiert | 2 x 1 vial          |
| K 6841       | STD         | Standard, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)                             | 4 x 5 vials         |
| K 6841       | CTRL 1      | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)                                    | 4 x 1 vial          |
| K 6841       | CTRL 2      | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)                                    | 4 x 1 vial          |

| Art.-Nr.  | Bezeichnung | Kit-Komponenten                                 | Menge      |
|-----------|-------------|---|------------|
| K 0002.15 | SUB         | Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig | 1 x 15 ml  |
| K 0003.15 | STOP        | Stopplösung, gebrauchsfertig                    | 1 x 15 ml  |
| K 6841    | SAMPLEBUF   | Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig        | 1 x 100 ml |

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

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3 000 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 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzenrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich

bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Das **lyophilisierte Detektionsantikörperkonzentrat (AB)** ist bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutions- und Verdünnungsvorgaben sind dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für Standards und Kontrollen sind dem Datenblatt zu entnehmen.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### *Seminalplasma*

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

Nach dem Auftauen werden die Seminalplasmen **5 min** bei **10000 rpm** zentrifugiert. Die Seminalplasmen müssen vor dem Einsatz im Test – in Abhängigkeit des Entzündungszustandes des Patienten – **1:10** bis **1:20** in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt werden.

### *Serum- und Plasmaproben*

#### **Präanalytik**

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

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

Anders im Plasma: je länger die Probe vor dem Zentrifugationsschritt steht und je mehr Einfrier- und Auftauzyklen die Probe durchlebt, umso höhere PMN-Elastase-Konzentrationen werden ermittelt. **Bei Verwendung von Plasma**

**muss die Präanalytik konstant sein.** Das gilt generell und unabhängig von dem verwendeten Testsystem.

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

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

**Serumproben** müssen vor dem Einsatz im Test **1:500** mit Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt werden, z. B.

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

**Plasmaproben** müssen vor dem Einsatz im Test **1:100** mit Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt werden, z. B.

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

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Im ersten Inkubationsschritt wird PMN-Elastase aus den Proben von einem immobilisierten Kaninchen-anti-PMN-Elastase-Antikörper gebunden. Es folgt ein Waschschritt, um alle ungebundenen Probenkomponenten zu entfernen. Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein monoklonaler Maus-anti-PMN-Elastase-Antikörper dazupipettiert, der sowohl die freie als auch die mit ihrem spezifischen Inhibitor ( $\alpha$ 1-Proteinaseinhibitor =  $\alpha$ 1-Antitrypsin) komplexierte PMN-Elastase-Form erkennt. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugates. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem PMN-Elastase-Gehalt direkt proportional. Anhand 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 Standard/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 <b>vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.         |
| 2. | <b>100 µl Standard/Kontrolle/ verdünnte Probe</b> in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.   |
| 3. | Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30°C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.  |
| 4. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 5. | <b>100 µl Antikörperlösung</b> (verdünntes AB) in jede Vertiefung pipettieren.  |
| 6. | Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30°C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.  |
| 7. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 8. | <b>100 µl Konjugat</b> (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.   |
| 9. | Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30°C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.  |

|     |  |
|-----|--|
| 10. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.   |
| 11. | <b>100 µl Substrat (SUB)</b> in jede Vertiefung pipettieren.   |
| 12. | <b>10–20 min**</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren* .   |
| 13. | <b>100 µl Stopplösung (STOP)</b> in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen .   |
| 14. | Extinktion <b>sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> 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.

### Seminalplasma

Die ermittelten Ergebnisse werden je nach gewählter Verdünnung bei der Probenvorbereitung mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor (10 bis 20)** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

### Serumproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 500** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

### Plasmaproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 100** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

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

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*Analytische Sensitivität × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### Referenzwerte

PMN-Elastase-Konzentration

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

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Genauigkeit – Präzision

#### Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 64

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

| Probe | Mittelwert [ng/ml] | VK [%] |
|-------|--------------------|--------|
| 1     | 542,81             | 6,9    |
| 2     | 442,08             | 5,0    |

#### Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 46

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 3 Plasmaproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

| Probe | Mittelwert [ng/ml] | VK [%] |
|-------|--------------------|--------|
| 1     | 131,39             | 6,9    |
| 2     | 136,60             | 7,2    |
| 3     | 123,89             | 8,9    |

### Analytische Sensitivität

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

|   |             |
|---|-------------|
| Leerwert ( <i>limit of blank</i> , LoB)                 | 0,060 ng/ml |
| Nachweisgrenze ( <i>limit of detection</i> , LoD)       | 0,104 ng/ml |
| Bestimmungsgrenze ( <i>limit of quantitation</i> , LoQ) | 0,104 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. Dafür wurden 2 Plasmaproben mit bekannten PMN-Elastase Konzentrationen versetzt und im Test gemessen. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ermittelt:

| Probe | Spike | Erwartet [ng/ml] | Gemessen [ng/ml] | Wiederfindung [%] |
|-------|-------|------------------|------------------|-------------------|
| 0,226 | 8,24  | 8,47             | 6,46             | 76,25             |
|       | 6,63  | 6,86             | 7,49             | 109,23            |
|       | 5,00  | 5,23             | 5,62             | 107,62            |
|       | 3,35  | 3,58             | 3,95             | 110,32            |
|       | 1,69  | 1,91             | 1,79             | 93,45             |
|       | 1,01  | 1,24             | 1,09             | 87,71             |
| 0,346 | 8,24  | 8,59             | 6,65             | 77,41             |
|       | 6,63  | 6,98             | 5,73             | 82,06             |
|       | 5,00  | 5,35             | 5,22             | 97,55             |
|       | 3,35  | 3,70             | 3,65             | 98,68             |
|       | 1,69  | 2,03             | 1,80             | 88,77             |
|       | 1,01  | 1,36             | 1,16             | 85,56             |

### Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung von 2 Plasmaproben nachgewiesen.

Für PMN Elastase in Serum, Plasma und Seminalplasma wurde Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungs-

faktoren ein lineares Verhalten im Bereich von 0,26 bis 6,16 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als  $\pm 20\%$ .

| Probe | Verdünnung | Erwartet [ng/ml] | Gemessen [ng/ml] | Wiederfindung [%] |
|-------|------------|------------------|------------------|-------------------|
| A     | 1:2        | 6,16             | 6,16             | 100,00            |
|       | 1:4        | 3,08             | 3,41             | 110,59            |
|       | 1:8        | 1,54             | 1,82             | 118,35            |
|       | 1:16       | 0,77             | 0,91             | 118,35            |
|       | 1:32       | 0,38             | 0,45             | 116,14            |
| B     | 1:4        | 4,21             | 4,21             | 100,00            |
|       | 1:8        | 2,10             | 2,13             | 101,21            |
|       | 1:16       | 1,05             | 1,13             | 107,48            |
|       | 1:32       | 0,53             | 0,53             | 100,55            |
|       | 1:64       | 0,26             | 0,27             | 101,88            |

### 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 |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------|
| $\alpha$ 1-Antitrypsin         | 90 $\mu$ g/l              | < 0,060                         | < LoB |
| Albumin                        | 800 $\mu$ g/l             | < 0,060                         | < LoB |
| slgA                           | 600 ng/ml                 | < 0,060                         | < LoB |
| Lysozym                        | 30 ng/ml                  | < 0,060                         | < LoB |
| Hämoglobin                     | 1 000 $\mu$ g/ml          | < 0,060                         | < LoB |
| Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex | 40 mU/l                   | < 0,060                         | < LoB |
| CRP                            | 150 ng/ml                 | < 0,060                         | < LoB |
| Pankreatische Amylase          | 28 333 mU/l               | < 0,060                         | < LoB |
| Chymotrypsin                   | 1 000 ng/ml               | < 0,060                         | < LoB |
| Myeloperoxidase                | 100 ng/ml                 | < 0,060                         | < LoB |
| Immunglobulin E                | 500 ng/ml                 | < 0,060                         | < 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

1. Derhaschnig, Ulla, Rosemarie Reiter, Paul Knöbl, Magdalena Baumgartner, Priska Keen, and Bernd Jilma. 2003. "Recombinant Human Activated Protein C (rhAPC; Drotrecogin Alfa [activated]) Has Minimal Effect on Markers of Coagulation, Fibrinolysis, and Inflammation in Acute Human Endotoxemia." *Blood* **102** (6) (September 15): 2093–8. doi:10.1182/blood-2003-02-0416.
2. Eggert-Kruse, W, K Zimmermann, W Geissler, A Ehrmann, R Boit, and T Strowitzki. 2009. "Clinical Relevance of Polymorphonuclear (PMN-) Elastase Determination in Semen and Serum during Infertility Investigation." *International Journal of Andrology* **32** (4) (August): 317–29. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00852.x.

3. Heinichen, Cornelia, Frank Buessecker, Birgit Arndt, Heinrich Schmidt-Gayk, and Michael D. Kramer. 1995. "PMN-Elastase in Faezes: Etablierung Eines Lumineszenz-Immunoassays Und Prüfung Der Diagnostischen Relevanz Bei Morbus Crohn." *Clinical Laboratory* **41**: 539–545.
4. Hoang, Long Truong, David J Lynn, Matt Henn, Bruce W Birren, Niall J Lennon, Phuong Thi Le, Kien Thi Hue Duong, et al. 2010. "The Early Whole-Blood Transcriptional Signature of Dengue Virus and Features Associated with Progression to Dengue Shock Syndrome in Vietnamese Children and Young Adults." *Journal of Virology* **84** (24) (December 15): 12982–94. doi:10.1128/JVI.01224-10.
5. Oremek, G M, and D Schneider. 1995. "PMN-Elastase." *MTA* **10** (4): 273–278.

### Verwendete Symbole:

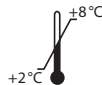
|   |                                   |   |                                      |
|---|-----------------------------------|---|--------------------------------------|
|    | Temperaturbegrenzung              |    | Bestellnummer                        |
|    | In-Vitro-Diagnostikum             | 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

# IDK<sup>®</sup> PMN elastase ELISA

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

Valid from 2021-12-17

**REF** K 6841



**IVD**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Table of Contents

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTENDED USE</b>                                  | <b>17</b> |
| <b>2. INTRODUCTION</b>                                  | <b>17</b> |
| <b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>                             | <b>17</b> |
| <b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>            | <b>18</b> |
| <b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>           | <b>18</b> |
| <b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>            | <b>19</b> |
| <b>7. ASSAY PROCEDURE</b>                               | <b>20</b> |
| <i>Principle of the test</i>                            | 20        |
| <i>Test procedure</i>                                   | 20        |
| <b>8. RESULTS</b>                                       | <b>22</b> |
| <b>9. LIMITATIONS</b>                                   | <b>23</b> |
| <b>10. QUALITY CONTROL</b>                              | <b>23</b> |
| <i>Reference range</i>                                  | 23        |
| <b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>                  | <b>24</b> |
| <i>Accuracy – Precision</i>                             | 24        |
| <i>Accuracy – Trueness</i>                              | 24        |
| <i>Linearity</i>  | 25        |
| <i>Analytical sensitivity</i>                           | 26        |
| <i>Analytical specificity</i>                           | 26        |
| <b>12. PRECAUTIONS</b>                                  | <b>26</b> |
| <b>13. TECHNICAL HINTS</b>                              | <b>27</b> |
| <b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b> | <b>27</b> |
| <b>15. REFERENCES</b>                                   | <b>28</b> |

## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of PMN elastase in serum, plasma and seminal plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

PMN elastase from human polymorphnuclear granulocytes is a glycoprotein of 30kDa which belongs to the group of serine proteases. Active PMN elastase is released from azurophil granula of neutrophil granulocytes after irritation or disintegration.

### Indication

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

## 3. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No.     | Label   | Kit components  | Quantity    |
|--------------|---------|---|-------------|
| K 6841       | PLATE   | Microtiter plate, precoated   | 12x 8 wells |
| K 0001.C.100 | WASHBUF | Wash buffer concentrate, 10x  | 2x 100 ml   |
| K 6841       | AB      | Detection antibody concentrate (secondary antibody, mouse anti-PMN elastase, monoclonal), lyophilised | 2x 1 vial   |
| K 6841       | CONJ    | Peroxidase-labelled antibody (goat-anti-mouse-POD), ready-to-use                                      | 1x 15 ml    |
| K 6841       | STD     | Standard, lyophilised (see specification for concentration)   | 4x 5 vials  |
| K 6841       | CTRL 1  | Control, lyophilised (see specification for range)  | 4x 1 vial   |
| K 6841       | CTRL 2  | Control, lyophilised (see specification for range)  | 4x 1 vial   |
| K 6841       | SUB     | Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use  | 1x 15 ml    |
| K 6841       | STOP    | Stop solution, ready-to-use   | 1x 15 ml    |

| Cat. No. | Label     | Kit components                       | Quantity   |
|----------|-----------|--------------------------------------|------------|
| K 6841   | SAMPLEBUF | Sample dilution buffer, ready-to-use | 1 x 100 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
- Centrifuge, 3 000 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 (WASH-BUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASH-BUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month.**

- The **lyophilised detection antibody concentrate (AB)** is stable at 2–8 °C until the expiry date stated on the label. Details for reconstitution and dilution are given in the specification data sheet.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Reconstitution details are given in the data sheet.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### Seminal plasma

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

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

### Serum and plasma samples

#### *Preanalytic handling*

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

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

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

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

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

**Serum samples** should be diluted **1:500** with the sample dilution buffer (SAMPLE-BUF) before assaying, e.g.

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

**Plasma samples** should be diluted **1:100** with the sample dilution buffer (SAMPLE-BUF) before assaying, e.g.

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

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

In a first incubation step, PMN elastase in the sample is bound to polyclonal rabbit-anti-PMN elastase antibodies (in excess), which are immobilised on the surface of the microtiter wells (PLATE). To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a monoclonal mouse-anti-PMN elastase antibody (AB) is added. This antibody is able to detect both the free and the complexed form with the specific inhibitor ( $\alpha$ 1-proteinase inhibitor =  $\alpha$ 1-antitrypsin). The quantification of the bound PMN elastase is carried out by adding an anti-mouse peroxidase-labeled conjugate (CONJ). Finally, the PMN elastase – antigen – antibody complex is incubated with the peroxidase substrate, tetramethylbenzidine (SUB). An acidic stop solution (STOP) is then added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of PMN elastase in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the values obtained from the calibrators. PMN elastase, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

The combination of two specific antibodies in the PMN elastase ELISA drastically reduces the possibility of false results and offers a reliable diagnostic system to the user.

### *Test procedure*

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

Mark the positions of 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.  | <b>Before use</b> , wash the wells <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.        |
| 2.  | Add each <b>100 µl standards/controls/diluted samples</b> into the respective wells.  |
| 3.  | Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .   |
| 4.  | Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper. |
| 5.  | Add <b>100 µl conjugate</b> (diluted AB) into each well.  |
| 6.  | Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .   |
| 7.  | Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper. |
| 8.  | Add <b>100 µl conjugate</b> (CONJ) into each well.  |
| 9.  | Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .   |
| 10. | Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper. |
| 11. | Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.   |
| 12. | Incubate for <b>10–20 min**</b> at room temperature (15–30 °C) in the <b>dark</b> .   |
| 13. | Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.   |

|     |   |
|-----|---|
| 14. | Determine absorption <b>immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> 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.

### Seminal plasma

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 10 to 20 dependent on the chosen sample dilution** to get the actual concentrations.

### Serum

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor 500** to get the actual concentrations.

## Plasma

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor 100** to get the actual concentrations.

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

## 9. LIMITATIONS

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

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

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

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

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

*Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used*

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

### Reference range

PMN Elastase concentrations

|   |  |
|---|--|
| in plasma of a healthy person (n = 37): | 19–78 ng/ml                              |
| in serum of a healthy person (n = 52):  | average = 688 ng/ml<br>(186–1 991 ng/ml) |

We recommend each laboratory to establish its own reference range.



## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n = 64**

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

| Sample | Mean value [ng/ml] | CV [%] |
|--------|--------------------|--------|
| 1      | 542.81             | 6.9    |
| 2      | 442.08             | 5.0    |

#### **Reproducibility (Inter-Assay); n = 46**

The reproducibility was assessed with 2 plasma samples under **varying** parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

| Sample | Mean value [ng/ml] | CV [%] |
|--------|--------------------|--------|
| 1      | 131.39             | 6.9    |
| 2      | 136.60             | 7.2    |
| 3      | 123.89             | 8.9    |

### *Accuracy – Trueness*

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, PMN elastase-spikes with known concentrations were added to 2 different plasma-samples. 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 [%] |
|----------------|---------------|------------------|------------------|--------------|
| 0.226          | 8.24          | 8.47             | 6.46             | 76.25        |
|                | 6.63          | 6.86             | 7.49             | 109.23       |
|                | 5.00          | 5.23             | 5.62             | 107.62       |
|                | 3.35          | 3.58             | 3.95             | 110.32       |
|                | 1.69          | 1.91             | 1.79             | 93.45        |
|                | 1.01          | 1.24             | 1.09             | 87.71        |

| Sample [ng/ml] | Spike [ng/ml] | Expected [ng/ml] | Obtained [ng/ml] | Recovery [%] |
|----------------|---------------|------------------|------------------|--------------|
| 0.346          | 8.24          | 8.59             | 6.65             | 77.41        |
|                | 6.63          | 6.98             | 5.73             | 82.06        |
|                | 5.00          | 5.35             | 5.22             | 97.55        |
|                | 3.35          | 3.70             | 3.65             | 98.68        |
|                | 1.69          | 2.03             | 1.80             | 88.77        |
|                | 1.01          | 1.36             | 1.16             | 85.56        |

### Linearity

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

For PMN elastase in serum, plasma and seminal plasma, the method has been demonstrated to be linear from 0.26 to 6.16 ng/ml based on the standard curve without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than  $\pm 20\%$  in this interval.

| Sample | Dilution | Expected [ng/ml] | Obtained [ng/ml] | Recovery [%] |
|--------|----------|------------------|------------------|--------------|
| A      | 1:2      | 6.16             | 6.16             | 100.00       |
|        | 1:4      | 3.08             | 3.41             | 110.59       |
|        | 1:8      | 1.54             | 1.82             | 118.35       |
|        | 1:16     | 0.77             | 0.91             | 118.35       |
|        | 1:32     | 0.38             | 0.45             | 116.14       |
| B      | 1:4      | 4.21             | 4.21             | 100.00       |
|        | 1:8      | 2.10             | 2.13             | 101.21       |
|        | 1:16     | 1.05             | 1.13             | 107.48       |
|        | 1:32     | 0.53             | 0.53             | 100.55       |
|        | 1:64     | 0.26             | 0.27             | 101.88       |

### Analytical sensitivity

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

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| Limit of blank, LoB        | 0.060 ng/ml |
| Limit of detection, LoD    | 0.104 ng/ml |
| Limit of quantitation, LoQ | 0.104 ng/ml |

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

### Analytical specificity

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

| Substance tested                | Concentration added | Concentration obtained [ng/ml] | Conclusion |
|---------------------------------|---------------------|--------------------------------|------------|
| $\alpha$ 1-Antitrypsin          | 90 $\mu$ g/l        | < 0.060                        | < LoB      |
| Albumin                         | 800 $\mu$ g/l       | < 0.060                        | < LoB      |
| slgA                            | 600 ng/ml           | < 0.060                        | < LoB      |
| Lysozyme                        | 30 ng/ml            | < 0.060                        | < LoB      |
| Haemoglobin                     | 1 000 $\mu$ g/ml    | < 0.060                        | < LoB      |
| Haemoglobin-Haptoglobin-Complex | 40 mU/l             | < 0.060                        | < LoB      |
| CRP                             | 150 ng/ml           | < 0.060                        | < LoB      |
| Pancreatic Amylase              | 28 333 mU/l         | < 0.060                        | < LoB      |
| Chymotrypsin                    | 1 000 ng/ml         | < 0.060                        | < LoB      |
| Myeloperoxidase                 | 100 ng/ml           | < 0.060                        | < LoB      |
| Immunoglobulin E                | 500 ng/ml           | < 0.060                        | < LoB      |

## 12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.

- 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.

- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

### 13. TECHNICAL HINTS

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

1. Derhaschnig, Ulla, Rosemarie Reiter, Paul Knöbl, Magdalena Baumgartner, Priska Keen, and Bernd Jilma. 2003. "Recombinant Human Activated Protein C (rhAPC; Drotrecogin Alfa [activated]) Has Minimal Effect on Markers of Coagulation, Fibrinolysis, and Inflammation in Acute Human Endotoxemia." *Blood* **102** (6) (September 15): 2093–8. doi:10.1182/blood-2003-02-0416.
2. Eggert-Kruse, W, K Zimmermann, W Geissler, A Ehrmann, R Boit, and T Strowitzki. 2009. "Clinical Relevance of Polymorphonuclear (PMN-) Elastase Determination in Semen and Serum during Infertility Investigation." *International Journal of Andrology* **32** (4) (August): 317–29. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00852.x.
3. Heinichen, Cornelia, Frank Buessecker, Birgit Arndt, Heinrich Schmidt-Gayk, and Michael D. Kramer. 1995. "PMN-Elastase in Faezes: Etablierung Eines Lumineszenz-Immunoassays Und Prüfung Der Diagnostischen Relevanz Bei Morbus Crohn." *Clinical Laboratory* **41**: 539–545.
4. Hoang, Long Truong, David J Lynn, Matt Henn, Bruce W Birren, Niall J Lennon, Phuong Thi Le, Kien Thi Hue Duong, et al. 2010. "The Early Whole-Blood Transcriptional Signature of Dengue Virus and Features Associated with Progression to Dengue Shock Syndrome in Vietnamese Children and Young Adults." *Journal of Virology* **84** (24) (December 15): 12982–94. doi:10.1128/JVI.01224-10.
5. Oremek, G M, and D Schneider. 1995. "PMN-Elastase." *MTA* **10** (4): 273–278.

**Used symbols:**

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