

Lysozym ELISA

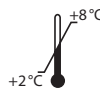
Zur in-vitro-Bestimmung von Lysozym aus Stuhl

Lysozyme ELISA

For the in vitro determination of lysozyme in stool

Gültig ab / Valid from 2022-02-02

REF K 6900



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	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Probenlagerung</i>	4
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	4
<i>Probenverdünnung</i>	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
<i>Spezifität</i>	11
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 Lysozym aus Stuhl geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Lysozym (Muramidase) ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 15 kDa und gehört zur Gruppe der basischen Glykosidasen. Lysozym wird von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen gebildet. Die Hauptquelle für fäkales Lysozym stellen die intestinalen Granulozyten dar. In allen Zellen des entzündlichen Infiltrates kann beim akuten Schub des Morbus Crohn Lysozym nachgewiesen werden. Teilweise wird Lysozym von mononukleären Zellen auch aktiv in das Darmlumen sezerniert.

Indikationen

- Diagnose und Verlauf bei Morbus Crohn
- Früherkennung von Nierentransplantat-Abstoßungsreaktionen
- Unterscheidung und Verlaufskontrolle von Leukosen
- Verlaufs- und Therapiekontrolle kindlicher Harnwegsinfekte
- Differentialdiagnose zwischen viraler und bakterieller Meningitis bei Kindern
- Erkennung einer Sepsis bei Neugeborenen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6900	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6900	CONJBUF	Konjugatverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract® , 2,5 x	1 x 100 ml
K 6900	CONJ	Konjugatkonzentrat (Kaninchen- anti-Lysozym, peroxidase markiert)	1 x 50 µl
K 6900	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 1,1; 3,3; 10; 30 ng/ml)	5 x 1 ml
K 6900	CTRL1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6900	CTRL2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 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 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.

- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat *IDK Extract***® muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100ml *IDK Extract*® + 150ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37°C auf. Das *IDK Extract*® kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) ist **4 Monate bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:1 001 in Konjugatverdünnungspuffer (CONJBUF)** verdünnt (10 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Das CONJ ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat (1:1001 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

Die Probenstabilität ist wie folgt:

Rohstuhl: 3 Tage bei Raumtemperatur (15–30°C) oder 2–8°C, sowie 3 Monate bei -20°C.

Stuhlextrakt (1:100): 1 Tag bei Raumtemperatur (15–30°C), 5 Tage bei 2–8°C oder 7 Tage bei -20°C, maximal 1 Einfrier-/Auftauzyklus.

Stuhlprobenextraktion

Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) wird als **Probenextraktionspuffer** verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

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

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

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

SAS mit 1,5 ml Probenextraktionspuffer:

Aufgenommene Stuhlmenge: 15 mg

Puffervolumen: 1,5 ml

Verdünnungsfaktor: 1:100

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml** gebrauchsfertigem Probenextraktionspuffer (1:2,5 verdünntes **IDK Extract®**) befüllen. **Wichtig:** Probenextraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) Das Röhrchen so lange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. **Wichtig:** Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres Einweichen (ca. 10 min) des Stuhls in Probenextraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnung I:

1:100

Probenverdünnung

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:2 mit Waschpuffer** weiterverdünnt. Zum Beispiel:

125 µl Überstand (Verdünnung I) + **125 µl** Waschpuffer, mischen = **1:2 (Verdünnung II)**. Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von 1:200.

100 µl der **Verdünnung II** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik. Es werden zwei ausgewählte Antikörper, die humanes Lysozym erkennen, verwendet.

Standards, Kontrollen und verdünnte Proben, die auf humanes Lysozym zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen anti-human-Lysozym-Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Lysozym aus der Probe vom Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat, ein peroxidasemarkierter anti-human-Lysozym-Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte:

Fängerantikörper – humanes Lysozym – Peroxidase-Konjugat.

Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin 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 Lysozym-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

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

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	Je 100 µl Standards/Kontrollen/Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln* inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30°C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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

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

8. ERGEBNISSE

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

1. 4-Parameter-Funktion

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

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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

Stuhlproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 200** 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:

$$\text{Analytische Sensitivität} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (n = 80) wurde ein Referenzbereich von < 600 ng/ml ermittelt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 18)

Probe	Lysozym [ng/ml]	VK [%]
A	6,7	7
B	1,4	10

Inter-Assay (n = 16)

Probe	Lysozym [ng/ml]	VK [%]
A	5,9	14
B	1,7	12

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 ng/ml.

Spike-Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen Lysozymmengen versetzt und gemessen ($n = 2$).

Probe	Ungespikete Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Lysozym erwartet [ng/ml]	Lysozym gemessen [ng/ml]
A	1,5	3	4,5	5,5
		6	7,5	7,1
B	0,75	0,7	1,4	1,5
		1,7	2,4	2,7
		5	5,8	5,7

Wiederfindung in der Verdünnung

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

Probe	Verdünnung	Lysozym erwartet [ng/ml]	Lysozym gemessen [ng/ml]
A	unverdünnt	15,3	15,3
	1:2	7,7	7,5
	1:4	3,8	3,9
	1:8	1,9	<NWG
B	unverdünnt	9,3	9,3
	1:2	4,65	6,0
	1:4	2,3	4,1
	1:8	1,16	1,6

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen gefunden:

• α 1-Antitrypsin	< 0,1 %
• Albumin	< 0,1 %
• PMN-Elastase	< 0,1 %
• sIgA	< 0,1 %
• Hämoglobin	< 0,1 %
• Hb/Hp-Komplex	< 0,1 %
• CRP	< 0,1 %
• Pankreatische Amylase	< 0,1 %
• Chymotrypsin	< 0,1 %
• IgE	< 0,1 %

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 im 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.
- **IDK Extract®** 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. Langhorst, Jost, Sigrid Elsenbruch, Twyla Mueller, Andreas Rueffer, Guenther Spahn, Andreas Michalsen, and Gustav J Dobos. 2005. "Comparison of 4 Neutrophil-Derived Proteins in Feces as Indicators of Disease Activity in Ulcerative Colitis." *Inflammatory Bowel Diseases* **11** (12) (December): 1085–91.
2. Pettersson, C, H Karlsson, M Ståhlman, T Larsson, B Fagerberg, M Lindahl, O Wiklund, J Borén, and L Fogelstrand. 2011. "LDL-Associated Apolipoprotein J and Lysozyme Are Associated with Atherogenic Properties of LDL Found in Type 2 Diabetes and the Metabolic Syndrome." *Journal of Internal Medicine* **269** (3) (March): 306–21. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02292.x.
3. Schwaab M., Euteneuer M., Lautermann J., Sudhoff H. 2005. "Lysozym Und Laktoferrin in Adenoiden, Hyperplastischen Und Chronisch Entzündeten Tonsillen - Eine Quantitative Analyse." *Laryngo-Rhino-Otologie* **84**: 660–664. doi:10.1055/s.
4. Volman, Julia J, Ronald P Mensink, Wim a Buurman, and Jogchum Plat. 2011. "In Vivo Effects of Dietary (1→3), (1→4)-B-D-Glucans from Oat on Mucosal Immune Responses in Man and Mice." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **46** (5) (May): 603–10. doi:10.3109/00365521.2010.545830.
5. West, N P, D B Pyne, J M Kyd, G M Renshaw, P A Fricker, and A W Cripps. 2010. "The Effect of Exercise on Innate Mucosal Immunity." *British Journal of Sports Medicine* **44** (4) (March): 227–31. doi:10.1136/bjism.2008.046532.

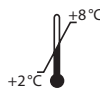
Verwendete Symbole:

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

Lysozyme ELISA

For the in vitro determination of lysozyme in stool

Valid from 2022-02-02



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	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
<i>Sample storage</i>	19
<i>Extraction of the stool samples</i>	19
<i>Dilution of samples</i>	20
7. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Spiking Recovery</i>	24
<i>Analytical Sensitivity</i>	25
<i>Specificity</i>	25
<i>Dilution recovery</i>	25
12. PRECAUTIONS	26
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27
15. REFERENCES	27

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of lysozyme in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Lysozyme (muramidase) is a protein with a molecular weight of approx. 15 kDa and belongs to the group of alkaline glycosidases. Lysozyme is produced by granulocytes, monocytes and macrophages. The main source for faecal lysozyme are the intestinal granulocytes. Lysozyme can be detected in all cells of the inflammatory infiltrate during an acute attack of Crohn's disease. To some extent, lysozyme is also secreted actively by mononuclear cells into the bowel lumen.

Indications

- Diagnosis and monitoring of Crohn's Disease
- Early diagnosis of rejection reactions in kidney transplantation cases
- Differential diagnosis and monitoring of leukosis
- Diagnosis and treatment monitoring of urinary tract infections in children
- Differential diagnosis between viral and bacterial meningitis in children
- Identification of sepsis in neonates

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6900	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract</i> ® 2.5x	1 x 100 ml
K 6900	CONJBUF	Conjugate dilution buffer, ready-to-use	2 x 15 ml
K 6900	CONJ	Conjugate concentrate (rabbit-anti-lysozyme, peroxidase-labelled)	1 x 50 µl
K 6900	STD	Calibrators, ready-to-use (0; 1.1; 3.3; 10; 30 ng/ml)	5 x 1 ml
K 6900	CTRL1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6900	CTRL2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 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).

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**.

- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate** *IDK Extract*[®] has to be diluted with ultrapure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract*[®] + 150 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 37 °C in a water bath. The *IDK Extract*[®] is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract*[®]) can be stored in a closed flask **for 4 months** at **2–8 °C**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate** (**CONJ**) has to be diluted **1:1 001** in **conjugate dilution buffer** (**CONJBUF**) (10 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:1001 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

The sample stability is as follows:

Raw stool: 3 days at room temperature (15–30 °C) and 2–8 °C as well as 3 months at -20 °C.

Stool extracts (1:100): 1 day at room temperature (15–30 °C), 5 days at 2–8 °C or 7 days at -20 °C, maximum 1 freeze-thaw cycle.

Extraction of the stool samples

Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract*[®]) is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

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

Stool sample tube – Instructions for use

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

SAS with 1.5 ml sample extraction buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	1.5 ml
Dilution Factor:	1:100

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty stool sample tube** with 1.5 ml **sample extraction buffer** (1:2.5 diluted *IDK Extract*[®]) before using it with the sample. **Important:** Allow the sample extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the orange dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Vortex the tube well until no stool sample remains in the notches. **Important:** Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with sample extraction buffer for ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution I: **1:100**

Dilution of samples

The supernatant of the sample preparation procedure (dilution I) is diluted **1:2 in wash buffer**. For example:

125 µl supernatant (dilution I) + **125 µl** wash buffer, mix well = **1:2 (dilution II)**
This results in a final dilution of 1:200.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution II** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilises the “sandwich” technique with two selected antibodies that recognise human lysozyme.

Standards, controls and diluted samples, which are assayed for human lysozyme, are added into the wells of a micro plate coated with a high affine anti-human lysozyme antibody. During the first incubation step, lysozyme is bound by the immobilised antibody. Then a peroxidase-conjugated anti-human lysozyme antibody is added into each microtiter well and a “sandwich” of capture antibody - human lysozyme – peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the enzymatic reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of lysozyme. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. Lysozyme present in the samples is determined directly from this curve.

Test procedure

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

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

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

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

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add 100 µl standards/controls/ prepared samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .

4.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
7.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
11.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

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

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

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the “4 parameter algorithm”.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

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

Stool

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 200** 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

Based on Immundiagnostik AG studies of stool samples of apparently healthy persons (n = 80), a reference value of lysozyme < 600 ng/ml was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 18)

Sample	Lysozyme [ng/ml]	CV [%]
A	6.7	7
B	1.4	10

Inter-Assay (n = 16)

Sample	Lysozyme [ng/ml]	CV [%]
A	5.9	14
B	1.7	12

Spiking Recovery

Two samples were spiked with different lysozyme concentrations and measured using this assay (n = 2).

Sample	Unspiked Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Lysozyme expected [ng/ml]	Lysozyme measured [ng/ml]
A	1.5	3	4.5	5.5
		6	7.5	7.1
B	0.75	0.7	1.4	1.5
		1.7	2.4	2.7
		5	5.8	5.7

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 ng/ml.

Specificity

No cross reactivity to other plasma proteins was observed:

- α 1-Antitrypsin < 0.1 %
- Albumin < 0.1 %
- PMN elastase < 0.1 %
- sIgA < 0.1 %
- Haemoglobin < 0.1 %
- Hb/Hp complex < 0.1 %
- CRP < 0.1 %
- Pancreatic amylase < 0.1 %
- Chymotrypsin < 0.1 %
- IgE < 0.1 %

Dilution recovery

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

Sample	Dilution	Lysozyme expected [ng/ml]	Lysozyme measured [ng/ml]
A	undiluted	15.3	15.3
	1:2	7.7	7.5
	1:4	3.8	3.9
	1:8	1.9	< detection limit
B	undiluted	9.3	9.3
	1:2	4.65	6.0
	1:4	2.3	4.1
	1:8	1.16	1.6

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

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

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on 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.
- **IDK Extract®** 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 sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Langhorst, Jost, Sigrid Elsenbruch, Twyla Mueller, Andreas Rueffer, Guenther Spahn, Andreas Michalsen, and Gustav J Dobos. 2005. "Comparison of 4 Neutrophil-Derived Proteins in Feces as Indicators of Disease Activity in Ulcerative Colitis." *Inflammatory Bowel Diseases* **11** (12) (December): 1085–91.
2. Pettersson, C, H Karlsson, M Ståhlman, T Larsson, B Fagerberg, M Lindahl, O Wiklund, J Borén, and L Fogelstrand. 2011. "LDL-Associated Apolipoprotein J and Lysozyme Are Associated with Atherogenic Properties of LDL Found in Type 2 Diabetes and the Metabolic Syndrome." *Journal of Internal Medicine* **269** (3) (March): 306–21. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02292.x.
3. Schwaab M., Euteneuer M., Lautermann J., Sudhoff H. 2005. "Lysozym Und Laktoferrin in Adenoiden, Hyperplastischen Und Chronisch Entzündeten Tonsillen - Eine Quantitative Analyse." *Laryngo-Rhino-Otologie* **84**: 660–664. doi:10.1055/s.
4. Volman, Julia J, Ronald P Mensink, Wim a Buurman, and Jogchum Plat. 2011. "In Vivo Effects of Dietary (1→3), (1→4)-B-D-Glucans from Oat on Mucosal Immune Responses in Man and Mice." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **46** (5) (May): 603–10. doi:10.3109/00365521.2010.545830.
5. West, N P, D B Pyne, J M Kyd, G M Renshaw, P A Fricker, and A W Cripps. 2010. "The Effect of Exercise on Innate Mucosal Immunity." *British Journal of Sports Medicine* **44** (4) (March): 227–31. doi:10.1136/bjism.2008.046532.

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