

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

PMN Elastase ELISA

IVD



REF

DEH3311



96 Wells

CONTENTS

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE.....	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4
4	REAGENTS.....	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	6
6	ASSAY PROCEDURE.....	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	8
8	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	9
9	EFFECTS OF BILIRUBIN AND HEMOLYSIS.....	11
10	LEGAL ASPECTS	11
11	REFERENCES	12
12	SHORT INSTRUCTION	13
13	PROTOCOL FOR SEMINAL PLASMA	14
1	EINLEITUNG	15
2	METHODIK UND TESTPRINZIP	15
3	HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	16
4	KITBESTANDTEILE	17
5	PROBENENTNAHME UND –VORBEREITUNG	18
6	TESTDURCHFÜHRUNG	18
7	NORMALWERTE	20
8	TESTCHARAKTERISTIKA.....	21
9	EFFEKTE VON BILIRUBIN UND HÄMOLYSE	23
10	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	23
11	LITERATUR.....	24
12	KURZANLEITUNG	25
13	PROTOKOLL FÜR SEMINALPLASMA.....	26
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS	28

1 INTRODUCTION

1.1 INTENDED USE

The Demeditec PMN Elastase ELISA is an enzyme immunoassay for the quantitative measurement of PMN elastase in EDTA or citrated plasma, exudate, bronchoalveolar lavage fluid, cerebrospinal fluid and seminal plasma.

1.2 SUMMARY AND EXPLANATION

The human organism reacts with an inflammatory response to attacks of invading pathogens (micro-organisms and viruses) or damaged tissue (after accidents or surgery). Polymorphonuclear (PMN) granulocytes play an important role as primary defence cells in this inflammatory reaction. Different bloodstream mediators (cytokines, leukotrienes, complement factors, bacterial endotoxins, clotting and fibrinolysis factors) attract and stimulate these cells to phagocytize and destroy not naturally occurring agents.

PMN granulocytes use proteinases to digest these agents and tissue debris. One of these proteinases is PMN elastase which is localised in the azurophilic granules of the polymorphonuclear granulocytes. During phagocytosis of foreign substances these enzymes are also partially excreted into the extracellular surrounding, where the activity of PMN elastase is regulated by inhibitors (esp. the α_1 -proteinase inhibitor, α_1 -PI). An overwhelming release of PMN elastase, however, can exceed the inhibitory potential of the α_1 -proteinase inhibitor. Thus, enzymatically active PMN elastase, together with simultaneously produced oxidants (O_2 -radicals, H_2O_2 , OH-radicals), can cause local tissue injury.

Due to the bloodstream and lymphatic system, however, α_1 -PI is delivered subsequently and eventually able to form a complex with all excreted elastase. Therefore, the concentration of the PMN elastase/ α_1 -PI complex correlates with the released PMN elastase and can be used as a measure for the activity of granulocytes during an inflammatory response.

Primarily, determinations of PMN elastase find its application in observation of the course of trauma, shock and sepsis. Further indications are the areas of hemodialysis, infections by obstetrics, joint diseases, effusions of sport injuries, intestinal affection, pancreatitis, cystic fibrosis and male adnex affections.

2 PRINCIPLE

The test kit is a solid phase enzyme immunometric assay (ELISA) in the microplate format, designed for the quantitative measurement of the complex of human PMN elastase and α_1 proteinase inhibitor (α_1 -PI) in plasma. The microplate is coated with a first polyclonal antibody against human PMN elastase (antigen).

Calibrators, controls and patient samples are pipetted into the antibody coated microplate. During a 60 minutes incubation present antigens in the sample bind to the antibodies fixed on the inner surface of the wells. Non-reactive sample components are removed by a washing step.

Afterwards, a second polyclonal antibody against α_1 -PI, which is labeled with horseradish peroxidase, is added. During a 60 minutes incubation, the PMN elastase/ α_1 -PI complex bound to the first antibody is specifically recognized by the enzyme labeled antibodies, and a sandwich complex is formed. An excess of enzyme conjugate is washed out.

A chromogenic substrate, TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine), is added. During a 20 minutes incubation, the substrate is converted to a colored endproduct (blue) by the fixed enzyme. Enzyme reaction is stopped by dispensing of hydrochloric acid as stop solution (change from blue to yellow). The color intensity is direct proportional to the concentration of PMN elastase present in the sample.

The optical density of the color solution is measured with a microplate reader at 450 nm. Bi-chromatic measurement with a 600 - 690 nm reference filter is recommended.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
4. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
5. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
6. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
9. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
11. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
12. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
13. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
14. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
15. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
16. Avoid contact with *Stop Solution*. It may cause skin irritation and burns.
17. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
18. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
19. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets.
20. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH. The Safety Data Sheets fit the demands of: EU-Guideline 2001/58/EC.

4 REAGENTS

4.1 REAGENTS PROVIDED

1. **SORB | MT** **Microtiterplate**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with polyclonal antibodies against PMN elastase.
2. **CAL** **PMN Elastase Master Calibrator**, 1 vial (2 µg), lyophilized;
in serum/buffer matrix containing PMN elastase/ α1-PI complex
Concentrations: 1,000 - 500 - 250 - 125 - 62.5 - 31.3 and 15.6 ng/ml
For reconstitution see "Reagent preparation".
3. **CONTROL | 1-2** **PMN Elastase Controls** in serum/buffer matrix, 2 vials, lyophilized;
For control values and ranges please refer to QC-Datasheet.
For reconstitution see "Reagent preparation".
4. **ENZ | CONJ** **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 16 ml, ready to use;
Enzyme labeled anti-α₁ PI antibody, containing polyclonal antibodies labeled with horseradish peroxidase;
5. **SAM | DIL** **Calibrator/Sample Diluent**, 1 vial, 50 ml, ready to use
6. **SUB | TMB** **Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, ready to use;
Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP | SOLN** **Stop Solution**, 1 vial, 7 ml, ready to use;
contains 2 M hydrochloric acid.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **WASH | SOLN | 10x** **Wash Solution**, 1 vial, 50 ml (10X concentrated);
see „Preparation of Reagents“.

4.2 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader capable for endpoint measurements at 450 nm (optional reference filter in the range of 600 - 690 nm)
- Vortex mixer
- Microplate mixer operating at 350 – 400 rpm
- Distilled water
- Graduated cylinders for 100 and 1000 ml
- Plastic containers for storage of the wash solution
- Pipets for 10 and 100 µl
- Adjustable pipette for up to 1000 µl
- Dispenser or repeatable pipet for 10 µl, 50 µl, 100 µl and 1000 µl

4.3 REAGENT PREPARATION

Master Calibrators:

Reconstitute lyophilized Master Calibrator with **2 ml Calibrator/Sample Diluent** 30 min. before use (end concentration of 1,000 ng/ml). Make a dilution serie with Calibrator/Sample Diluent to get calibrators with 1,000; 500; 250; 125; 62.5; 31.3 and 15.6 ng/ml.

PMN Elastase Controls:

Reconstitute with **1 ml Calibrator/Sample Diluent** 30 min before use.

Wash Buffer:

Dilute with 450 ml dist. water to a final volume of 500 ml.

Attention: For the determination of PMN Elastase in seminal plasma, please find detailed information about the reagent preparation in chapter 13 (see page 14).

4.4 STORAGE CONDITIONS

When stored at 2°C to 8°C all reagents are stable until expiration date or 30 days after opening.

The Wash Buffer is stable for 3 months after dilution or until the expiration date.

Store Calibrators and Controls at -20 °C or below (in aliquots), it will be stable for 30 days after reconstitution or until expiration date.

Protect divisible Microplate from moisture. Store together with desiccant and carefully sealed in the plastic bag.

Protect TMB-Substrate Solution from light.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

For determination of PMN elastase EDTA or citrated plasma are the preferred sample matrixes. Exsudate, bronchoalveolar lavage fluid, cerebrospinal fluid and seminal plasma can be used.

For determination of PMN Elastase in seminal plasma please find a separate protocol in chapter 13 (see page 14).

Serum is not suitable, because during clotting PMN elastase can be released *in vitro*. Culture supernatants are as well not suitable; the reason is that the assay detects only the PMN elastase/ α_1 -PI complex and α_1 PI is normally not present in culture medium.

All samples are prediluted 1:100 with Calibrator/Sample Diluent. Therefore 10 μ L of sample may be diluted with 990 μ L of Calibrator/Sample diluent.

The patients need not to be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture into vacutainers and separate plasma from the cells by centrifugation. Plasma samples can be stored at 2 - 8 °C up to 5 days. For longer storage samples should be stored frozen at -20°C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted. Patient samples expected to contain higher PMN elastase concentrations than the highest calibrator (1000 ng/mL) should be diluted in the Calibrator/Sample Diluent before further assaying. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 GENERAL REMARKS

- Do not interchange components of different lots.
- All components should be at room temperature (18 – 28 °C) before use.
- All components of these test kits, supplied as concentrate should be diluted to their final concentration at least 30 minutes prior to use. Mix well, but prevent of foam formation.
- Use a disposable-tip micropipette to dispense plasma samples. Pipet directly to the bottom of the wells. Change the tip between samples, to avoid carryover contamination.

6.2 ASSAY PROCEDURE

1. Preparation of calibrators:

Label six tubes: G (500 ng/ml), F (250 ng/ml), E (125 ng/ml), D (62.5 ng/ml), C (31.3 ng/ml), and B (15.6 ng/ml). Pipet **0.5 ml** of the Calibrator/Sample Diluent into all tubes. Pipet 0.5 ml of the reconstituted PMN Elastase Master Calibrator into tube G (500 ng/ml) and mix thoroughly. Transfer 0.5 ml from tube G (500 ng/ml) to tube F (250 ng/ml) and mix thoroughly. Repeat this process successively to complete the 2-fold dilution series. The reconstituted PMN Elastase Master Calibrator will serve as the highest calibrator H (1,000 ng/ml). Use the PMN Elastase Calibrator/Sample Diluent as the zero calibrator A (0 ng/ml).

2. Dilute all patient samples 1:100 with Calibrator/Sample Diluent before assay. Therefore combine 10 µl of sample with 990 µl of Calibrator/Sample Diluent in a polystyrene tube. Mix well. Calibrators and controls are ready to use and need **not** to be diluted.
3. Prepare a sufficient number of microplate wells to accommodate calibrators, controls and prediluted patient samples in duplicates.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	A	E	C1	P..								
b	A	E	C1	P..								
c	B	F	C2									
d	B	F	C2									
e	C	G	P1									
f	C	G	P1									
g	D	H	P2									
h	D	H	P2									

4. For determination of PMN Elastase pipet **100 µl** of calibrators, controls and prediluted patient samples into the wells according to the template.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18 - 28 °C) on a plate mixer (350 – 400 rpm).
6. Discard the content of the wells and wash **4 times** with **300 µl** buffered wash solution. Remove as much wash solution as possible by beating the microplate carefully.
7. Pipet **150 µl** of enzyme conjugate into each well.
8. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18 - 28 °C) on a plate mixer (350 – 400 rpm).
9. Again discard the content of all wells and wash **4 times** with **300 µl** buffered wash solution. Remove as much wash solution as possible by beating the microplate carefully.
10. Dispense **200 µl** of TMB substrate solution into each well.
11. Incubate for **20 minutes** at room temperature (18 - 28 °C) in the dark.
12. Add **50 µl** of stop solution to each well and mix carefully.
13. Read the optical density at **450 nm**. Bi-chromatic measurement with a reference at 600 - 690 nm is recommended.

The developed color is stable for at least 15 minutes. Read optical densities during this time.

6.3 CALCULATION OF RESULTS

For evaluation of PMN Elastase a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density (linear scale) and concentration (logarithmic scale) is recommended.

Spline approximation with lin-log coordinates and log-log coordinates are also suitable.

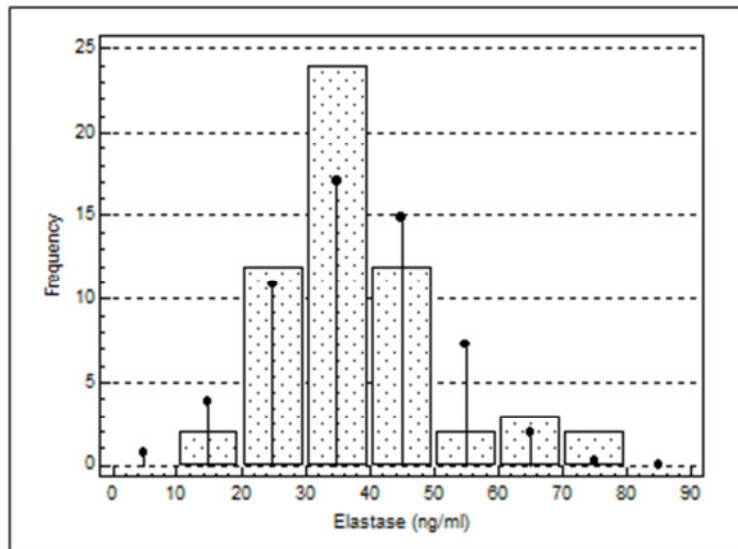
6.4 EXAMPLE OF TYPICAL CALIBRATOR CURVE

The figure below shows typical results for Demeditec PMN Elastase test. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

Calibrator	Concentration (ng/ml)	Optical Density (450 nm)
Calibrator A	0.0 ng/ml	0.098
Calibrator B	15.6 ng/ml	0.187
Calibrator C	31.3 ng/ml	0.292
Calibrator D	62.5 ng/ml	0.441
Calibrator E	125 ng/ml	0.699
Calibrator F	250 ng/ml	1.231
Calibrator G	500 ng/ml	1.916
Calibrator H	1000 ng/ml	2.751

7 EXPECTED NORMAL VALUES

In a normal range study with plasma samples from healthy blood donors (n = 57) the following ranges have been established with the Demeditec PMN Elastase test:



Frequency distribution of PMN elastase in citrated plasma of healthy blood donors (median = 35 ng/ml, 95 % percentile = 64.9 ng/ml)

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually. It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of plasma PMN elastase. The reference ranges should be regarded as guidelines only.

8 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

8.1 ANALYTICAL SENSITIVITY

The lower detection limit for PMN Elastase was 0.2 ng/ml.

8.2 SPECIFICITY

The Demeditec PMN Elastase test is specific human PMN elastase only, respectively the PMN elastase/ α_1 -PI complex.

8.3 REPRODUCIBILITY

Statistics for Coefficients of variation (CV) were calculated for each of three samples from the results of 10 determinations in a single run for Intra-Assay precision and the Inter-Assay precision was calculated from the results of 10 different runs of four samples:

Intra-Assay		
Sample No.	Mean \bar{x} (ng/ml)	CV (%)
1	80	5.2
2	241	4.7
3	358	4.6

Inter-Assay		
Sample No.	Mean \bar{x} (ng/ml)	CV (%)
1	128	5.7
2	216	6.4
3	346	4.4
4	681	5.7

8.4 RECOVERY

Three spiking solutions were prepared using the Calibrator/Sample Diluent (922, 615 and 478 ng/ml). A 50 µl aliquot of each solution (A,B,C) was spiked into 950 µl aliquots of three different patient plasma samples, for a spiking ratio of 1 to 20, leaving the plasma matrix of the spiked samples relatively intact. All samples were then assayed by the Demeditec PMN Elastase procedure.

Sample No.	Diluted Solution	measured Concentration	expected Concentration	Recovery [%]
		[ng/ml]	[ng/ml]	
1	-	23.2	-	-
	A	72.4	69.4	104
	B	59.3	54.1	109
	C	49.6	47.2	101
2	-	30.6	-	-
	A	73.4	76.7	96
	B	59.3	61.4	97
	C	56.8	54.4	104
3	-	61.7	-	-
	A	118.0	107.8	109
	B	100.8	92.5	109
	C	94.8	85.6	110

8.5 LINEARITY

In dilution experiments sera with high PMN elastase concentrations were diluted with Calibrator/Sample Diluent and assayed in the Demeditec PMN Elastase test. The assay showed linearity over the full measuring range.

Sample No.	Dilution Factor	measured Concentration	expected Concentration	Recovery [%]
		[ng/ml]	[ng/ml]	
1	1:1	250.1	-	-
	1:2	145.2	125.1	116
	1:4	75.3	62.5	120
	1:8	37.1	31.3	119
2	1:1	465.5	-	-
	1:2	209.2	232.8	90
	1:4	111.1	116.4	95
	1:8	58.7	58.2	101

9 EFFECTS OF BILIRUBIN AND HEMOLYSIS

To simulate moderate and severe icterus, four samples were spiked with 100 and 200 milligrams of bilirubin per liter. All samples were assayed, both spiked and unspiked, by the Demeditec PMN Elastase procedure, with the following results (ng/ml):

Sample No.	Unspiked	100 mg/l Bilirubin	200 mg/l Bilirubin
		[ng/ml]	[ng/ml]
1	100	106	104
2	249	245	261
3	572	575	534
4	903	964	910

The results show that severe icterus (bilirubin up to 200 mg/l) has no clinically significant effect on the Demeditec PMN Elastase procedure.

Samples with hemolysis normally show no effect on the Demeditec PMN Elastase procedure. In single cases hemolysis can lead to an increase due to the decay of granulocytes *in vitro*.

10 LEGAL ASPECTS

10.1 RELIABILITY OF RESULTS

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

10.2 THERAPEUTIC CONSEQUENCES

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

10.3 LIABILITY

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 10.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

11 REFERENCES

1. Jochum M., Machleidt, W., Neuhof, H., and Fritz, H.
Proteinases. In: Schlag G, Redl H (eds), Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure.
Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993: 46-60.
2. Jochum M., Machleidt, W., and Fritz, H.
Proteolytic Enzyme Systems. In: Schlag G, Redl H (eds), Pathophysiology of Shock, Sepsis, and
Organ Failure.
Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993: 531-548.
3. Elastase
In: Thomas, L. (Hrsg.) Labor und Diagnose
Die Medizinische Verlagsgesellschaft, 4. Auflage, 1992: 795 - 801
4. Elastase, Elastase- α 1-Proteinase Inhibitor Complex
In: Friedman, R.B., Young, D.S (Eds.) Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests
AACC Press, Washington, 3rd Edition, 1997: 3-161
5. Reinhardt, A., Haidl, G., and Schill, W-B.
Granulocyte elastase indicates silent male genital tract inflammation and appropriate anti-
inflammatory treatment.
Andrologia 29, 1996: 187 - 192

12 SHORT INSTRUCTION

(all sample sizes given in µl)

MP Well	ng/ml	A	B	C	D	E	F	G	H	Control 1/2	Sample
		0	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000		
Steps	Solution										
Pipet	Calibrator	100	100	100	100	100	100	100	100	-	-
Pipet	Control	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
Pipet	Prediluted sample	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Incubate for 60 min at RT on a plate mixer	Decant Wash 4x with 300 µl of buffered wash solution										
Pipet											
Incubate for 60 min at RT on a plate mixer	Decant Wash 4x with 300 µl of buffered wash solution										
Pipet											
Incubate for 20 min at RT in the dark	Pipet										
Pipet											
Read at $\lambda = 450 \text{ nm}$											

For a detailed description of the procedure see also page 7.

13 PROTOCOL FOR SEMINAL PLASMA

Separate the seminal plasma by centrifugation (5 min).
Take the supernatant and freeze the seminal plasma at -20°C for longer storage.

Preparation of the Calibrators and Controls

1. Reconstitute PMN Elastase Calibrator with **1 ml Calibrator/Sample Diluent** 30 min. before use (Calibrator H: end concentration of 2,000 ng/ml). Make a dilution serie with Calibrator/Sample Diluent to get calibrators with 1,000; 500; 250; 125; 62.5 and 31.3 ng/ml. Store these calibrators in aliquots at -20°C . Please label six tubes, A-G. Then pipet 0.5 ml Calibrator/Sample Diluent into each tube and add 0.5 ml Calibrator H into G (1,000 ng/ml). Mix well and continue the dilution serie as follows:
 G = 1.000 ng/ml
 F = 500 ng/ml
 E = 250 ng/ml
 D = 125 ng/ml
 C = 62,5 ng/ml
 B = 31,3 ng/ml
 A = 0 ng/ml (Calibrator-/Sample Diluent)
2. Reconstitute controls with **1 ml** Calibrator-/Sample Diluent 30 min. before use and mix well. For storage keep the controls frozen in aliquots at -20°C .
3. Dilute seminal plasma **1:100** with Calibrator-/Sample Diluent (e.g. 10 μl seminal plasma + 990 μl Calibrator-/Sample Diluent)
4. Pipet **100 μl** Calibrators, Controls and diluted seminal plasma into the wells according to the template.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature ($18 - 28^{\circ}\text{C}$) on a plate mixer (350 – 400 rpm).
6. Discard the content of the wells and wash **4 times** with **300 μl** buffered wash solution. Remove as much wash solution as possible by beating the microplate carefully.
7. Pipet **150 μl** of enzyme conjugate into each well.
8. Incubate for **60 minutes** at room temperature ($18 - 28^{\circ}\text{C}$) on a plate mixer (350 – 400 rpm).
9. Again discard the content of all wells and wash **4 times** with **300 μl** buffered wash solution. Remove as much wash solution as possible by beating the microplate carefully.
10. Dispense **200 μl** of TMB substrate solution into each well.
11. Incubate for **20 minutes** at room temperature ($18 - 28^{\circ}\text{C}$) in the dark.
12. Add **50 μl** of stop solution to each well and mix carefully.
13. Read the optical density at **450 nm**. Bi-chromatic measurement with a reference at 600 – 690 nm is recommended.

Interpretation of results:

Interpretation	Concentration
no inflammation	0 - 250 ng/ml
moderate inflammation	> 250 – 1.000 ng/ml
massive inflammation	> 1.000 ng/ml

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually. It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of plasma PMN elastase. The given ranges should be regarded as guidelines only.

1 EINLEITUNG

1.1 VERWENDUNG

Der Demeditec PMN Elastase ELISA ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von PMN Elastase in EDTA- oder Citrat-Plasma, Exsudat, Bronchiallavage, Liquor und Seminalplasma.

1.2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Der menschliche Organismus reagiert auf Attacken durch eingedrungene Krankheitserreger (Mikroorganismen, Viren) oder auf absterbendes Gewebe (nach Unfällen oder Operationen) mit einer Entzündungsreaktion. Im Rahmen dieser Entzündungsreaktion spielen neutrophile Granulozyten als primäre Abwehrzellen eine besondere Rolle. Sie werden durch verschiedene Mediatoren (Zytokine, Leukotriene, Komplementfaktoren, Bakterien-Endotoxine, Faktoren des Gerinnungs- und Fibrinolyse-systems) aus der Blutbahn angelockt und zur Beseitigung körperfremder Stoffe stimuliert.

Die neutrophilen Granulozyten benutzen Proteinase, um diese körperfremden Stoffe oder Gewebetrümmer zu verdauen. Eine dieser Proteinase ist die PMN Elastase, die in den azurophilen Granula der polymorphkernigen (PMN) Granulozyten lokalisiert ist. Während dieses Verdauungsvorganges werden die Enzyme auch partiell extrazellulär sezerniert.

Die extrazelluläre Aktivität der PMN Elastase wird durch Inhibitoren (v.a. durch den α_1 -Proteinase-Inhibitor = α_1 -PI) reguliert. Bei starker Stimulation der Granulozyten und einer damit verbundenen übermäßigen Freisetzung der Elastase kann das Hemmpotential des α_1 -PI überschritten werden. Die nicht-inhibierte PMN Elastase löst dann zusammen mit den gleichzeitig gebildeten Oxidantien (O_2 -Radikale, H_2O_2 , OH-Radikale etc.) Gewebeschäden aus. Da über das Blut und die Lymphgefäße jedoch α_1 -Proteinase-Inhibitor nachgeliefert wird, wird in der Zirkulation schließlich alle freigesetzte Elastase gebunden. Die Konzentration des PMN Elastase/Inhibitor-Komplexes korreliert mit der Menge an freigesetzter PMN Elastase und ist somit ein Maß für die Aktivität der Granulozyten im Entzündungsgeschehen.

Der Nachweis der PMN Elastase findet seinen Einsatz somit hauptsächlich zur Verlaufsbeurteilung bei Trauma, Schock und Sepsis. Weitere Indikationsgebiete stellen die Bereiche Hämodialyse, Infektionen bei Geburtshilfe, Gelenkerkrankungen, Ergüsse bei Sportverletzungen, Darmerkrankungen, Pankreatitis, zystische Fibrose und Adnexaffektionen des Mannes dar.

2 METHODIK UND TESTPRINZIP

Der vorliegende Test ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay (ELISA) zur quantitativen Bestimmung des Komplexes aus humaner PMN Elastase und dem α_1 -Proteinase-Inhibitor (α_1 -PI) im Plasma. Die Festphase ist mit einem ersten polyklonalen Antikörper gegen humane PMN Elastase (Antigen) beschichtet.

Standards, Kontrollen und Patientenproben werden in die mit Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. In der Probe vorhandene PMN Elastase bindet während der ersten 60-minütigen Inkubation an den Antikörper, der an der inneren Oberfläche der Vertiefung gebunden vorliegt. Nicht gebundene Probenkomponenten werden durch einen Waschschrift entfernt.

Anschließend wird ein zweiter polyklonaler Antikörper zugegeben, der gegen α_1 -PI gerichtet und mit Meerrettichperoxidase markiert ist. Während einer 60-minütigen Inkubation wird der an den ersten Antikörper gebundene PMN Elastase/ α_1 -PI Komplex von dem enzymmarkierten Antikörper spezifisch erkannt und es bildet sich ein Sandwich-Komplex aus. Überschüssiges Enzymkonjugat wird durch erneutes Waschen eliminiert.

Ein chromogenes Substrat, 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin (TMB) wird zugegeben. Während einer 20-minütigen Inkubation wird das Substrat vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt (blau) umgesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Salzsäure beendet (Farbumschlag blau → gelb). Die Farbintensität ist zu der Konzentration an PMN Elastase in den Proben direkt proportional.

Die optische Dichte der Farblösung wird mit einem Mikrotiterplatten-Meßgerät bei 450 nm gemessen. Bi-chromatische Messung mit einer Referenzfilter-Wellenlänge im Bereich von 600 - 690 nm ist empfehlenswert.

3 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung sollten als mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
3. Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 2N HCl enthält. HCl kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
4. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
5. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
6. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
7. Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
8. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
9. Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
10. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
11. Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
12. Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich. Die Materialsicherheitsdatenblätter entsprechen den Verordnungen der EU-Richtlinie 2001/58/EC.

4 KITBESTANDTEILE

4.1 MITGELIEFERTE KOMPONENTEN

1. **SORB | MT** Mikrotiterplatte, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen; beschichtet mit polyklonalem Antikörper gegen humane PMN Elastase.
2. **CAL** PMN Elastase Standard, 1 Fl. (2 µg), lyophilisiert;
in Serumpuffermatrix, enthält aufgereinigten PMN Elastase/α₁-PI Komplex
Konzentrationen: 1.000 - 500 - 250 - 125 - 62.5 - 31.3 und 15.6 ng/ml
siehe "Vorbereitung der Reagenzien".
3. **CONTROL | 1-2** PMN Elastase Kontrollen in Serum/Puffer-Matrix, 2 Fl., lyophilisiert;
Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt.
siehe "Vorbereitung der Reagenzien".
4. **ENZ | CONJ** Enzymkonjugat, 1 Fl., 16 ml, gebrauchsfertig;
Enzym-markierter anti-α₁ PI Antikörper, enthält polyklonalen Antikörper, markiert mit Meerrettich-
peroxidase
5. **SAM | DIL** Standard-/Probenverdünnungspuffer, 1 Fl., 50 ml, gebrauchsfertig
6. **SUB | TMB** Substrat-Lösung, 1 Fl., 22 ml, gebrauchsfertig
Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP | SOLN** Stopp-Lösung, 1 Fl., 7 ml, gebrauchsfertig
enthält 2 M Salzsäure
8. **WASH | SOLN | 10x** Waschlösung, 1 Fl, 50 ml (10X konzentriert);
siehe "Vorbereitung der Reagenzien".

4.2 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Standard:

Den lyophilisierten Standard mit **2 ml Standard-/Probenverdünnungspuffer** 30 min. vor Gebrauch auflösen (Endkonzentration: 1.000 ng/ml); Verdünnungsreihe ansetzen, um Standards mit 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,3 und 15,6 ng/ml zu erhalten.

Kontrollen:

Die lyophilisierten Kontrollen mit **1 ml Standard-/Probenverdünnungspuffer** 30 min. vor Gebrauch auflösen.

Waschlösung:

Mit 450 ml dest. Wasser auf 500 ml auffüllen.

ACHTUNG: Zur Bestimmung der PMN Elastase in Seminalplasma ist ein separates Protokoll mit weiteren Details zur Vorbereitung der Reagenzien in Kapitel 13 (siehe Seite 26) aufgeführt.

4.3 LAGERUNG DER KOMPONENTEN

Bei einer Lagerung bei 2 °C bis 8 °C sind alle Komponenten bis zum angegebenen Verfallsdatum oder 30 Tage nach dem Öffnen haltbar.

Die Waschlösung ist bis zu 3 Monate nach der Verdünnung oder bis zum Verfallsdatum haltbar.

Lagern Sie die Standards und Kontrollen aliquotiert bei -20 °C, nach dem Auflösen sind diese 30 Tage oder bis zum Verfallsdatum haltbar.

Schützen Sie die Mikrotiterplatte vor Feuchtigkeit. Zusammen mit dem Trocknungsmittel in dem verschließbaren Beutel aufbewahren.

Schützen Sie die TMB-Substrat-Lösung vor Licht.

4.4 ERFORDERLICHE HILFSMITTEL

- Mikrotiter-Platten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm, optional mit Referenzwellenlänge von 600 - 690 nm
- Wirbelmischer (Vortex)
- Mikrotiterplatten-Schüttler (350 – 400 rpm)
- destilliertes Wasser
- Messzylinder für 100 - 1.000 ml
- Plastikgefäße zur Aufbewahrung des Waschpuffers
- Mikropipetten für 10 und 100 µl
- variable Mikropipette für bis zu 1.000 µl
- Dispenser bzw. Mehrkanalpipette für 10 µl, 50 µl, 100 µl und 1.000 µl

5 PROBENENTNAHME UND –VORBEREITUNG

Die Bestimmung der PMN Elastase wird vor allem mit EDTA- oder Citrat-Plasma durchgeführt. Exsudate, Bronchiallavage, Liquor und Seminalplasma kann ebenfalls verwendet werden. Zur Bestimmung der PMN Elastase in Seminalplasma ist in Kapitel 13 (siehe Seite 26) ein separates Protokoll aufgeführt. Serum ist nicht verwendbar, da Elastase während der Serumgewinnung aus PMN Zellen *in-vitro* freigesetzt werden kann. Kulturüberstände sind auch nicht für die Verwendung geeignet; der Grund ist, dass der Test nur den PMN Elastase/ α_1 -PI-Komplex erfasst und normalerweise kein α_1 -PI in Kulturmedien vorhanden ist.

Die Plasmaproben werden vor der Messung 1:100 mit Standard-/Probenverdünnungspuffer verdünnt. Dazu wird beispielsweise 10 µl Probe zu 990 µl Puffer gegeben.

Es ist keine Nüchtern-Blutentnahme oder spezielle Vorbehandlung erforderlich. Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Plasmaproben können gekühlt bei 2 - 8 °C bis zu fünf Tage aufbewahrt werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtigt, sollten die Proben aliquotiert und bei -20 °C tiefgefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Patientenproben, deren Konzentration an PMN Elastase höher als der höchste Kalibratorwert (1000 ng/ml) liegen könnte, sollten vor der Abarbeitung im Standard-/Probenverdünnungspuffer vorverdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnungsstufe ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 ALLGEMEINE ANMERKUNGEN

- Die Komponenten aus Testbestecken verschiedener Chargen nicht austauschen.
- Alle Komponenten auf Raumtemperatur (18 – 28 °C) bringen.
- Die als Konzentrat gelieferten Reagenzien müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf ihre Endkonzentration verdünnt werden. Gut mischen, aber Schaumbildung vermeiden.
- Zum Vorlegen der Plasmaproben sollten Pipetten mit Einmalspitzen verwendet werden. Direkt auf den Boden der Vertiefungen pipettieren. Für jede Probe die Spitzen wechseln, um Verschleppungen zu vermeiden.

6.2 TESTDURCHFÜHRUNG

1. Vorbereitung der Standards:

Sechs Röhrchen beschriften: G (500 ng/ml), F (250 ng/ml), E (125 ng/ml), D (62,5 ng/ml), C (31,3 ng/ml), and B (15,6 ng/ml). **0,5 ml des Standard-/Probenverdünnungspuffers** in alle Röhrchen pipettieren. 0,5 ml des rekonstituierten PMN Elastase Standards in Röhrchen G (500 ng/ml) pipettieren und sorgfältig mischen. 0,5 ml aus dem Röhrchen G (500 ng/ml) in Röhrchen F (250 ng/ml) pipettieren und sorgfältig mischen. Diesen Vorgang schrittweise bis zur kompletten 1:2 Verdünnungsreihe wiederholen. Der rekonstituierte PMN Elastase Standard dient als höchster Standard H (1000 ng/ml). Der Standard-/Probenverdünnungspuffer dient als Null-Standard A (0 ng/ml).

- Alle Patientenproben vor Testbeginn 1:100 mit Standard-/Probenverdünnungspuffer verdünnen. Dazu 10 µl Probe in einem Reagenzröhrchen vorlegen und 990 µl Standard-/ Probenverdünnungspuffer hinzupipettieren. Standards und Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen **nicht** verdünnt werden.
- Eine ausreichende Anzahl an Vertiefungen der Mikrotiter-Platte zum Ansatz von Standards, Kontrollen und vorverdünnten Patientenproben in Doppelbestimmung vorbereiten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	A	E	K1	P..								
b	A	E	K1	P..								
c	B	F	K2									
d	B	F	K2									
e	C	G	P1									
f	C	G	P1									
g	D	H	P2									
h	D	H	P2									

- Zur Bestimmung von PMN Elastase jeweils **100 µl** Standards, Kontrollen und vorverdünnte Patientenproben entsprechend der Plattenbelegung auf den Boden der Vertiefungen pipettieren.
- 60 Minuten** bei Raumtemperatur (18 - 28 °C) auf einem Schüttler (350 – 400 rpm) inkubieren.
- Dekantieren und **4 mal** jeweils mit **300 µl** Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
- 150 µl** Enzymkonjugat zu jeder Vertiefung zugeben.
- 60 Minuten** bei Raumtemperatur (18 - 28 °C) auf einem Schüttler (350 – 400 rpm) inkubieren.
- Erneut dekantieren und **4 mal** jeweils mit **300 µl** Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
- 200 µl** TMB-Substratlösung in jede Vertiefung pipettieren.
- 20 Minuten** bei Raumtemperatur (18 - 28 °C) **im Dunkeln** inkubieren.
- 50 µl** Stopp-Lösung in jede Vertiefung pipettieren und vorsichtig mischen.
- Optische Dichte bei **450 nm** messen. Bi-chromatische Messung mit einer Referenzfilterwellenlänge im Bereich von 600 - 690 nm ist empfehlenswert.

Die Färbung der Lösung ist mindestens 15 Minuten stabil. In dieser Zeit sollte gemessen werden.

6.3 AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Demeditec PMN Elastase Tests ist eine 4-Parameter Logistik mit lin-log-Koordinaten für die optischen Dichte (lineare Achse) und für die Konzentration (logarithmische Achse) die Kurvenanpassung der Wahl.

Eine geglättete Spline-Funktion mit lin-log- oder log-log-Koordinaten ist ebenso möglich.

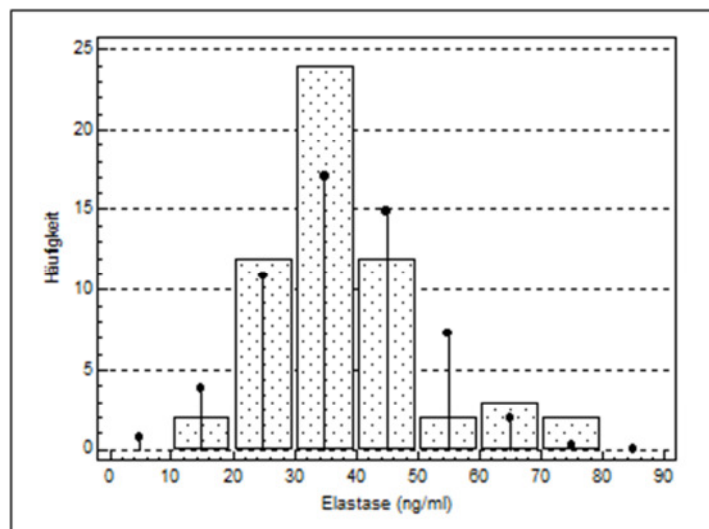
6.4 AUSWERTUNGSBEISPIEL

Die folgenden Tabellen zeigen typische Meßwerte am Beispiel des Demeditec PMN Elastase Tests. Die Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testansatzes danach zu berechnen.

Calibrator		Optische Dichte (450 nm)
Calibrator A	0.0 ng/ml	0.098
Calibrator B	15.6 ng/ml	0.187
Calibrator C	31.3 ng/ml	0.292
Calibrator D	62.5 ng/ml	0.441
Calibrator E	125 ng/ml	0.699
Calibrator F	250 ng/ml	1.231
Calibrator G	500 ng/ml	1.916
Calibrator H	1.000 ng/ml	2.751

7 NORMALWERTE

Im Rahmen einer Normbereichsstudie anhand von Blutspender-Plasmen (n = 57) wurden mit dem Demeditec PMN Elastase-Test die folgenden Werte ermittelt:



Häufigkeitsverteilung von PMN Elastase im Citrat-Plasma gesunder Blutspender (Median = 35 ng/ml, 95 % Perzentile = 64,9 ng/ml)

Positive Ergebnisse sollten hinsichtlich der klinischen Situationen kontrolliert werden, wobei im individuellen Einzelfall entschieden werden sollte, wann und wie eine Therapie notwendig erscheint. Es wird empfohlen, daß jeder Anwender seinen eigenen Normalbereich bezüglich seines Patientenkollektivs festlegt. Die angegebenen Normalwerte dienen zur Orientierung.

8 TESTCHARAKTERISTIKA

8.1 SENSITIVITÄT

Die untere Nachweisgrenze wurde für PMN Elastase mit 0,2 ng/ml ermittelt.

8.2 SPEZIFITÄT

Der Demeditec PMN Elastase Test erfaßt nur humane PMN Elastase bzw. den PMN Elastase/ α_1 -PI-Komplex.

8.3 REPRODUZIERBARKEIT

Nachfolgende Variationskoeffizienten (VK) wurden für die Intra-Assay-Varianz auf der Basis einer 10-fachen Bestimmung dreier Proben ermittelt; für die Inter-Assay-Varianz wurden die Ergebnisse aus 10 Assays für vier Proben herangezogen:

Intra-Assay		
Probe Nr.	Mittelwert \bar{x} (ng/ml)	Variationskoeffizient VK (%)
1	80	5,2
2	241	4,7
3	358	4,6

Inter-Assay		
Probe Nr.	Mittelwert \bar{x} (ng/ml)	Variationskoeffizient VK (%)
1	128	5,7
2	216	6,4
3	346	4,4
4	681	5,7

8.4 WIEDERFINDUNG

Dem Standard/Probenverdünnungspuffer wurden drei unterschiedliche Mengen PMN Elastase zugegeben (922, 615 und 478 ng/ml). 50 µl jeder Lösung wurden zu je 950 µl drei verschiedener Plasma-proben von Patienten hinzugefügt (Verdünnungsverhältnis von 1:20), um die Plasma-Matrix der Proben möglichst intakt zu lassen. Alle Proben wurden dann mit dem Demeditec PMN Elastase Test gemessen.

Probe	Lösung	Gemessene Werte	Erwartete Werte	Wiederfindung [%]
		[ng/ml]	[ng/ml]	
1	-	23,2	-	-
	A	72,4	69,4	104
	B	59,3	54,1	109
	C	49,6	47,2	101
2	-	30,6	-	-
	A	73,4	76,7	96
	B	59,3	61,4	97
	C	56,8	54,4	104
3	-	61,7	-	-
	A	118,0	107,8	109
	B	100,8	92,5	109
	C	94,8	85,6	110

8.5 LINEARITÄT

In Verdünnungsexperimenten wurden Plasmaproben mit hohen PMN Elastase Konzentrationen unverdünnt und verdünnt mit Standard-/Probenverdünnungspuffer getestet. Der Assay ist über den gesamten Messbereich linear.

Sample No.	Dilution Factor	measured Concentration	expected Concentration	Recovery [%]
		[ng/ml]	[ng/ml]	
1	1:1	250.1	-	-
	1:2	145.2	125.1	116
	1:4	75.3	62.5	120
	1:8	37.1	31.3	119
2	1:1	465.5	-	-
	1:2	209.2	232.8	90
	1:4	111.1	116.4	95
	1:8	58.7	58.2	101

9 EFFEKTE VON BILIRUBIN UND HÄMOLYSE

Um unterschiedlich schwere Gelbsucherkrankungen vorzutäuschen, wurden 100 bzw. 200 mg/l Bilirubin zu vier Proben hinzugegeben. Alle Proben wurden pur und gespikt mit dem Demeditec PMN Elastase Test untersucht; dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Probe	Unverdünnt	100 mg/l Bilirubin	200 mg/l Bilirubin
		[ng/ml]	[ng/ml]
1	100	106	104
2	249	245	261
3	572	575	534
4	903	964	910

Die Ergebnisse zeigen, daß schwere Gelbsucht (bis zu 200 mg/l Bilirubin) den Test nicht beeinflusst.

10 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

10.1 ZUVERLÄSSIGKEIT DER ERGEBNISSE

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

10.2 THERAPEUTISCHE KONSEQUENZEN

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 12.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

10.3 HAFTUNG

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 10.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

11 LITERATUR

1. Jochum M., Machleidt, W., Neuhof, H., and Fritz, H.
Proteinases. In: Schlag G, Redl H (eds), Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure.
Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993: 46-60.
2. Jochum M., Machleidt, W., and Fritz, H.
Proteolytic Enzyme Systems. In: Schlag G, Redl H (eds), Pathophysiology of Shock, Sepsis, and
Organ Failure.
Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993: 531-548.
3. Elastase
In: Thomas, L. (Hrsg.) Labor und Diagnose
Die Medizinische Verlagsgesellschaft, 4. Auflage, 1992: 795 - 801
4. Elastase, Elastase- α 1-Proteinase Inhibitor Complex
In: Friedman, R.B., Young, D.S (Eds.) Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests
AACC Press, Washington, 3rd Edition, 1997: 3-161
5. Reinhardt, A., Haidl, G., and Schill, W-B.
Granulocyte elastase indicates silent male genital tract inflammation and appropriate anti-
inflammatory treatment.
Andrologia 29, 1996: 187 – 192

12 KURZANLEITUNG(alle Volumenangaben in μl)

MT-Platten-Well	ng/ml	A	B	C	D	E	F	G	H	Kontrolle 1/2	Probe
		0	15,6	31,3	62,5	125	250	500	1000		
Schritte	Lösung										
Pipettieren	Standard	100	100	100	100	100	100	100	100		-
Pipettieren	Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
Pipettieren	verdünnte Probe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
60 min bei RT auf einem Schüttler in- kubieren											
Dekantieren 4x mit 300 μl Wasch- lösung waschen											
Pipettieren	Enzym- Konjugat	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
60 min bei RT auf einem Schüttler in- kubieren											
Dekantieren 4x mit 300 μl Wasch- lösung waschen											
Pipettieren	Substrat- Lösung	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
20 min bei RT im Dun- keln inkubieren											
Pipettieren	Stopp- Lösung	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Messen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$											

Vgl. auch Seite 19 für eine detaillierte Beschreibung der Testdurchführung.

13 PROTOKOLL FÜR SEMINALPLASMA

Ejakulat in Eppendorfgefäßen durch Zentrifugation (5 min) trennen.
Überstand abnehmen und das Seminalplasma gegebenenfalls bei -20°C einfrieren.

Vorbereitung der Standards und Kontrollen

1. PMN Elastase Standard mit **1 ml** Standard-/Probenpuffer 30 min vor Gebrauch auflösen und gut mischen. Dieser **Standard H** entspricht einer Konzentration von **2.000 ng/ml**. Zur Lagerung portioniert bei -20°C einfrieren. Sechs Röhrchen beschriften, A-G.

Geometrische Verdünnungsreihe ansetzen. Dazu **0,5 ml** Standard-/Probenpuffer in jedes Röhrchen vorlegen und 0,5 ml des Standards H in Röhrchen G (1.000 ng/ml) pipettieren. Sorgfältig mischen. 0,5 ml von G in F (500 ng/ml) pipettieren, mischen. Den Vorgang bis zur Verdünnung 1:64 (Std. B, 31,3 ng/ml) fortführen.

G = 1.000 ng/ml

F = 500 ng/ml

E = 250 ng/ml

D = 125 ng/ml

C = 62,5 ng/ml

B = 31,3 ng/ml

A = 0 ng/ml (Standard-/Probenpuffer)

2. Kontrollen mit **1 ml** Standard-/Probenpuffer 30 min vor Gebrauch auflösen und gut mischen. Zur Lagerung portioniert bei -20°C wegfrieren.
3. Die Seminalplasmen **1:100** mit Standard-/Probenpuffer verdünnen (z.B. 10 μl Seminalplasma + 990 μl Puffer)
4. Zur Bestimmung von PMN Elastase jeweils **100 μl** Standards, Kontrollen und vorverdünnte Patientenproben entsprechend der Plattenbelegung auf den Boden der Vertiefungen pipettieren.
5. **60 Minuten** bei Raumtemperatur (18 - 28 $^{\circ}\text{C}$) auf einem Schüttler (350 – 400 rpm) inkubieren.
6. Dekantieren und **4 mal** jeweils mit **300 μl** Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
7. **150 μl** Enzymkonjugat zu jeder Vertiefung zugeben.
8. **60 Minuten** bei Raumtemperatur (18 - 28 $^{\circ}\text{C}$) auf einem Schüttler (350 – 400 rpm) inkubieren.
9. Erneut dekantieren und **4 mal** jeweils mit **300 μl** Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
10. **200 μl** TMB-Substratlösung in jede Vertiefung pipettieren.
11. **20 Minuten** bei Raumtemperatur (18 - 28 $^{\circ}\text{C}$) **im Dunkeln** inkubieren.
12. **50 μl** Stopp-Lösung in jede Vertiefung pipettieren und vorsichtig mischen.
13. Optische Dichte bei **450 nm** messen. Bi-chromatische Messung mit einer Referenzfilterwellenlänge im Bereich von 600 - 690 nm ist empfehlenswert.











Die Färbung der Lösung ist mindestens 15 Minuten stabil. In dieser Zeit sollte gemessen werden.

Interpretation der Ergebnisse:







Befund	Messergebnis
keine Entzündung	0 - 250 ng/ml
mäßig gradige Entzündung	> 250 – 1.000 ng/ml
massive Entzündung	> 1.000 ng/ml

Positive Ergebnisse sollten hinsichtlich der klinischen Situationen kontrolliert werden, wobei im individuellen Einzelfall entschieden werden sollte, wann und wie eine Therapie notwendig erscheint. Es wird empfohlen, daß jeder Anwender seinen eigenen Normalbereich bezüglich seines Patientenkollektivs festlegt. Die angegebenen Werte dienen zur Orientierung.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consultez le Mode d'emploi	Consulte las Instrucciones	Consulti le istruzioni
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostica in vitro
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	No de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	For veterinary research use only	Nur für Veterinärfor- schungszwecke			
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di con- servazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeits- datum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de micro- titration	Pocillos de la Microplaca	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
<i>Enzyme Con- jugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Com- plex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzima- tique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate So- lution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de paro	Soluzione d' arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Standard 0	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Calibrador	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungs- medium	Solution pour dilution de l'échantillon		Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungs- medium	Solution pour dilution du conjugué		Diluyente del tracciante

Demeditec PMN Elastase ELISA DEH3311

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Instruções de uso	Brugermanual	Användar manual	Εγχειρίδιο χρήστη
IVD	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
REF	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
LOT	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
VET				
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevaringstemperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
<i>Distributed by</i>				
<i>Content</i>	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
<i>Volume/No.</i>	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθμ..
<i>Microtiterwells</i>	Alvéolos de microtitulação	Mikrotiterbrønde	Brunnar i Mikrotiter-platta	Πηγαδάκια Μικροτιτλοδοτήσεως
<i>Antiserum</i>	Anti-soro	Antiserum	Antiserum	Αντιορός
<i>Enzyme Conjugate</i>	Conjugado enzimático	Enzymkonjugat	Enzymkonjugat	Συζευγμένο ενζυμο
<i>Enzyme Complex</i>	Complexo enzimático	Enzymkompleks	Enzymkomplex	Σύμπλοκο ενζύμου
<i>Substrate Solution</i>	Solução de substrato	Substratopløsning	Substratlösning	Διάλυμα υποστρώματος
<i>Stop Solution</i>	Solução de paragem	Stopopløsning	Stopp lösning	Διάλυμα τερματισμού
<i>Zero Standard</i>	Padrão zero	Standard 0	Standard 0	Πρότυπο Μηδέν
<i>Standard</i>	Calibrador	Standard	Standard	Πρότυπα
<i>Control</i>	Controlo	Kontrol	Kontroll	Έλεγχος
<i>Assay Buffer</i>	Tampão de teste	Assay buffer	Assay Buffer	Ρυθμιστικό Διάλυμα Εξέτασης
<i>Wash Solution</i>	Solução de lavagem	Vaskebuffer	Tvätt lösning	Διάλυμα πλύσεως
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl
<i>Sample Diluent</i>				
<i>Conjugate Diluent</i>				