

Product information

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



User's Manual

PMN Elastase ELISA



DEH3311



96 wells



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

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	Quality Control	9
9	Performance Characteristics	9
10	Limitations of Procedure	11
11	Legal Aspects	11
12	References	12
13	Short Instruction	13
14	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	Qualitätskontrolle	21
9	Testcharakteristika	21
10	Grenzen des Tests	23
11	Rechtliche Grundlagen	23
12	Literatur	24
13	Kurzanleitung	25
14	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 manual quantitative determination of PMN Elastase in human EDTA or citrated plasma and seminal plasma. For in vitro diagnostic use only. For professional use in medical laboratories only. For single use.

1.2 DESCRIPTION OF THE ANALYTE

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 blood-stream 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 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'-Tetramethylbenzidine), 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.

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. All reagents containing human material should be handled as potentially infectious material.
4. The microplate contains break-apart strips. Unused wells must be stored at 2-8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing substrate solution that had previously been used for conjugate solution may turn solution coloured. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the washing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable protective gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. 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 be slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
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 please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH or on Demeditec homepage (www.demeditec.com).
20. All serious incidents occurring in relation to products made available on the EU market in accordance with Article 2(61) of Regulation (EU) 2017/746 shall be notified to the manufacturer and to the competent authority of the Member State where the user or patient is established in accordance with Article 82 of Regulation (EU) 2017/746.
21. If product information, including labeling, is incorrect or inaccurate, please contact the kit manufacturer or supplier.

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 plasma/buffer matrix containing PMN Elastase/ α1-PI complex
For reconstitution and concentrations see "Preparation of Reagents" (4.4).
3. **CONTROL 1-2 PMN Elastase Controls** in plasma/buffer matrix, 2 vials, lyophilized.
For control values and ranges please refer to QC-Datasheet.
For reconstitution see "Preparation of Reagents" (4.4).
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" (4.4).

4.2 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader capable for endpoint measurements at 450 nm
- Vortex mixer
- Microplate mixer operating at 900 rpm
- Distilled water
- Graduated cylinders for 1000 ml
- Plastic containers for storage of the wash solution
- Calibrated variable precision micropipettes

4.3 STORAGE CONDITIONS

When stored at 2-8°C unopened reagents will be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2-8°C. After first opening the reagents are stable for 30 days if performed and stored properly. Keep reagents away from heat and direct sunlight.

The Wash Buffer is stable for 12 weeks after dilution.

Store Calibrators and Controls at ≤-20 °C (in aliquots), they will be stable for 30 days after reconstitution. Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Protect TMB-Substrate Solution from light.

4.4 PREPARATION OF REAGENTS

PMN Elastase Master Calibrator:

For plasma: Reconstitute lyophilized Master Calibrator with **2 ml Calibrator/Sample Diluent** 30 min. before use (final concentration of 1000 ng/ml). Make a dilution serie with Calibrator/Sample Diluent to get calibrators with 1000; 500; 250; 125; 62.5; 31.3 and 15.6 ng/ml.

For seminal plasma: Reconstitute lyophilized Master Calibrator with **1 ml Calibrator/Sample Diluent** 30 min. before use (final concentration of 2000 ng/ml). Make a dilution serie with Calibrator/Sample Diluent to get calibrators with 2000; 1000; 500; 250; 125; 62.5 and 31.3 ng/ml.

PMN Elastase Controls:

For plasma and seminal plasma: Reconstitute with **1 ml Calibrator/Sample Diluent** 30 min before use.

Wash Solution:

Dilute 50 ml of 10X concentrated Wash Solution with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml. The diluted Wash Solution is stable for at least 12 weeks at room temperature (18-25°C).

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

4.5 DISPOSAL OF THE KIT

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet.

4.6 DAMAGED TEST KIT

In case of any severe damage of the test kit or components, DEMEDITEC DIAGNOSTICS GmbH has to be informed in writing within one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

For determination of PMN Elastase EDTA or citrated plasma are the preferred sample matrixes. For determination of PMN Elastase in seminal plasma please find a separate protocol in chapter 14 (see page 14).

Exudates, bronchial lavage and cerebrospinal fluid as sample material are not validated with this test. Therefore these sample material could be used for research purposes only, but not for use in in-vitro diagnostics.

Serum is not suitable, because during clotting PMN Elastase can be released *in vitro*. Culture supernatants are not suitable; because 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 \leq -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 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.
- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18-25°C) before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross-contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Respect the incubation times as stated in this instructions for use.
- Calibrators, controls and samples should at least be assayed in double determinations.
- A calibrator curve must be established for every test run.

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 (1000 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 must **not** to be diluted.
3. Prepare a sufficient number of microplate wells to accomodate 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** with new disposable tips into the wells according to the template.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18-25°C) on a plate mixer (900 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 (18-25°C) on a plate mixer (900 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 (18-25°C) in the dark without shaking.
12. Add **50 µl** of **Stop Solution** to each well and mix carefully.
13. Determine the absorbance of each well at 450 nm. It is recommended to read the wells within 15 minutes.

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

6.3 CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample, determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the package insert have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be determined directly from this calibrator curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted. For the calculation of the concentrations, this dilution factor has to be taken into account.

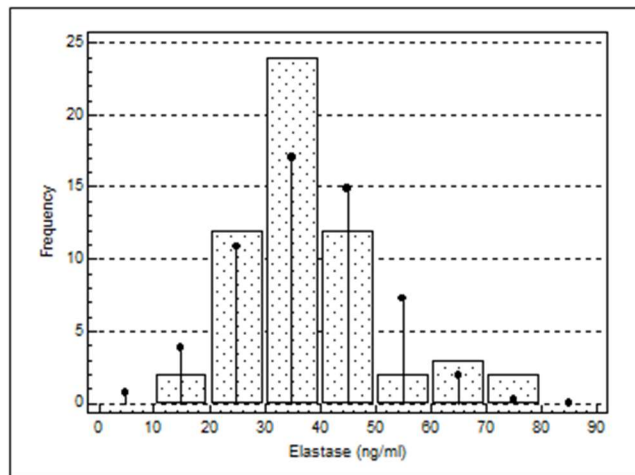
6.4 EXAMPLE OF TYPICAL CALIBRATOR CURVE

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

Calibrator		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)

The results alone should not be the only reason for any diagnostic or therapeutical consequences. They have to be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

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 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day-to-day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate included in the kit. The values and ranges stated on the QC certificate always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results. It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices, microtiter plate reader, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or Demeditec directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 ANALYTICAL SENSITIVITY

The lowest analytical detectable level of PMN Elastase that can be distinguished from the Zero Calibrator is 2.31 ng/ml at the 2SD confidence limit.

9.2 SPECIFICITY

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

9.3 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 (ng/ml)	CV (%)
1	80	5.2
2	241	4.7
3	358	4.6

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

9.4 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.	Spiking Solution	measured Concentration [ng/ml]	expected Concentration [ng/ml]	Recovery [%]
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

9.5 LINEARITY

In dilution experiments samples 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 [ng/ml]	expected Concentration [ng/ml]	Recovery [%]
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

10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 INTERFERING SUBSTANCES

To simulate moderate and severe icterus, four samples were spiked with 100 and 200 mg bilirubin per liter. All samples were assayed, both spiked and unspiked, by the Demeditec PMN Elastase procedure, with the following results:

Sample No.	Unspiked	+100 mg/l Bilirubin	+200 mg/l Bilirubin
	[ng/ml]	[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.

Icteric, lipaemic, and haemolytic samples and samples should not be used in this assay.

10.2 DRUG INTERFERENCES

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of PMN Elastase in a sample.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 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 Diagnostics GmbH.

11.2 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.

11.3 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 11.2. 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.

12 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

13 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 (18-25°C) on a plate mixer (900 rpm)											
Decant Wash 4x with 300 μl of buffered wash solution											
Pipet	Enzyme conjugate	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
Incubate for 60 min at RT (18-25°C) on a plate mixer (900 rpm)											
Decant Wash 4x with 300 μl of buffered wash solution											
Pipet	Substrate Solution	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Incubate for 20 min at RT (18-25°C) without shaking in the dark											
Pipet	Stop Solution	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Read at $\lambda = 450 \text{ nm}$											

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

14 PROTOCOL FOR SEMINAL PLASMA

Separate the sperm by centrifugation (5 min).

Take the supernatant and freeze the seminal plasma at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ for longer storage.

Preparation of the Calibrators and Controls

1. Reconstitute PMN Elastase Master Calibrator with **1 ml Calibrator/Sample Diluent** 30 min. before use (Calibrator H: final concentration of 2000 ng/ml). Label six tubes: G (1000 ng/ml), F (500 ng/ml), E (250 ng/ml), D (125 ng/ml), C (62.5 ng/ml), and B (31.3 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 (1000 ng/ml) and mix thoroughly. Transfer 0.5 ml from tube G (1000 ng/ml) to tube F (500 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 (2000 ng/ml). Use the PMN Elastase Calibrator/Sample Diluent as the zero calibrator A (0 ng/ml).

G = 1000 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 $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
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 ($18-25^{\circ}\text{C}$) on a plate mixer (900 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 ($18-25^{\circ}\text{C}$) on a plate mixer (900 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 ($18-25^{\circ}\text{C}$) in the dark without shaking.
12. Add **50 μl of Stop Solution** to each well and mix carefully.
13. Determine the absorbance of each well at 450 nm. It is recommended to read the wells within 15 minutes.

Interpretation of results:

Interpretation	Concentration
no inflammation	0 - 250 ng/ml
moderate inflammation	> 250 - 1,000 ng/ml
massive inflammation	> 1,000 ng/ml

The results alone should not be the only reason for any diagnostic or therapeutical consequences. They have to be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

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 seminalplasma PMN Elastase. The given ranges should be regarded as guidelines only.

1 EINLEITUNG

1.1 ZWECKBESTIMMUNG

Der Demeditec PMN Elastase ELISA ist ein Enzymimmunoassay zur manuellen, quantitativen Bestimmung von PMN Elastase in humanem EDTA- oder Citrat-Plasma und Seminalplasma. Nur für In-vitro Diagnostik und für den Einsatz in medizinischen Laboratorien. Nur zur einmaligen Anwendung.

1.2 BESCHREIBUNG DES ANALYTEN

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 Proteinasen, um diese körperfremden Stoffe oder Gewebetrümmer zu verdauen. Eine dieser Proteinasen 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 -PI nachgeliefert wird, wird in der Zirkulation schließlich alle freigesetzte Elastase gebunden. Die Konzentration des PMN Elastase/ α_1 -PI-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. Überschüssiges Enzymkonjugat wird durch erneutes Waschen eliminiert.

Ein chromogenes Substrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), wird anschließend 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 zu 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.

3 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Dieses Kit ist nur zum in vitro-diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Lesen Sie vor dem Testansatz sorgfältig die komplette Arbeitsanleitung. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene Arbeitsanleitung.
3. Reagenzien mit humanem Material sollten wie potenziell infektiöses Material gehandhabt werden.
4. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen sollten im verschlossenen Folienbeutel bei 2-8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
5. Proben und Reagenzien sollten so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
6. Verwenden Sie für jedes Reagenz einen separaten Pipettenaufsatz. Das gilt besonders für die Substratlösung. Wenn der Pipettenaufsatz der Substratlösung vorher z. B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substrat-Lösung. Gießen Sie Reagenzien nie zurück ins Fläschchen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
7. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
8. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
9. Bringen Sie die Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (18-25°C). Die Temperatur wirkt sich auf die Optische Dichte des Assays aus.
10. Nicht mit dem Mund pipettieren und Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
11. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika verwenden.
12. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Handschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
14. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
15. Alle in der Packungsbeilage angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
16. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander austauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um die gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen.
17. Der Kontakt mit der Stopplösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verätzungen verursachen kann.
18. Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
19. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt. Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich. Sie finden diese auch unter www.demeditec.de zum Herunterladen.
20. Alle im Zusammenhang mit den Produkten, die auf dem EU-Markt bereitgestellt werden, auftretende schwerwiegende Ereignisse gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 2, Absatz 61 sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender oder Patient niedergelassen ist, gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 82 zu melden.
21. Sollten Produktinformationen, einschließlich Etikettierung falsch oder inkorrekt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits.

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 Master Standard**, 1 Fläschchen (2 µg), lyophilisiert; PMN Elastase/α₁-PI Komplex in Plasma-Puffermatrix; Rekonstitution und Konzentrationen siehe "Vorbereitung der Reagenzien" (4.4).
3. **CONTROL 1-2 PMN Elastase Kontrollen** in Plasma-Puffermatrix, 2 Fläschchen, lyophilisiert; Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt. Rekonstitution siehe "Vorbereitung der Reagenzien" (4.4).
4. **ENZ CONJ Enzymkonjugat**, 1 Fläschchen, 16 ml, gebrauchsfertig; Enzym-markierter anti-α₁-PI Antikörper, enthält einen polyklonalen Antikörper, markiert mit Meerrettichperoxidase.
5. **SAM DIL Standard-/Probenverdünnungspuffer**, 1 Fläschchen, 50 ml, gebrauchsfertig
6. **SUB TMB Substratlösung**, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig; Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP SOLN Stopplösung**, 1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 M Salzsäure
8. **WASH SOLN 10x Waschlösung**, 1 Fläschchen, 50 ml (**10X** konzentriert); siehe "Vorbereitung der Reagenzien" (4.4).

4.2 ERFORDERLICHE HILFSMITTEL

- Mikrotiter-Platten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm
- Wirbelmischer (Vortex)
- Mikrotiterplatten-Schüttler (900 rpm)
- destilliertes Wasser
- Messzylinder für 1000 ml
- Plastikgefäße zur Aufbewahrung des Waschpuffers
- Kalibrierte variable Mikropipetten

4.3 LAGERUNG DER KOMPONENTEN

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden. Nach dem ersten Öffnen sind die Reagenzien bei sachgemäßer Abarbeitung und Lagerung 30 Tage stabil. Reagenzien vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18-25°C) für mindestens 12 Wochen stabil.

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 und bewahren diese zusammen mit dem Trocknungsmittel in dem verschließbaren Beutel auf.

Schützen Sie die TMB-Substratlösung vor Licht.

4.4 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

PMN Elastase Master Standard:

Für Plasma: 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.

Für Seminalplasma: Den lyophilisierten Standard mit **1 ml Standard-/Probenverdünnungspuffer** 30 min. vor Gebrauch auflösen (Endkonzentration: 2.000 ng/ml); Verdünnungsreihe ansetzen, um Standards mit 2.000; 1.000; 500; 250; 125; 62,5 und 31,3 ng/ml zu erhalten.

PMN Elastase Kontrollen:

Für Plasma und Seminalplasma: Die lyophilisierten Kontrollen mit **1 ml Standard-/Probenverdünnungspuffer** 30 min. vor Gebrauch auflösen.

Waschlösung:

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18-25°C) für mindestens 12 Wochen stabil.

ACHTUNG: Zur Bestimmung der PMN Elastase in Seminalplasma ist ein separates Protokoll mit weiteren Details zur Vorbereitung der Reagenzien in Kapitel 14 (siehe Seite 26) aufgeführt.

4.5 ENTSORGUNG DES KITS

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

4.6 BESCHÄDIGTE TESTKITS

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC DIAGNOSTICS GmbH in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Die Bestimmung der PMN Elastase wird vor allem mit EDTA- oder Citrat-Plasma durchgeführt. Zur Bestimmung der PMN Elastase in Seminalplasma ist in Kapitel 14 (siehe Seite 26) ein separates Protokoll aufgeführt.

Exsudate, Bronchiallavage und Liquor als Probenmaterial sind mit diesem Test nicht validiert. Daher können diese Probenmaterialien zu Forschungszwecken verwendet werden, aber nicht für die Verwendung in der In-vitro-Diagnostik.

Serum ist nicht verwendbar, da Elastase während der Serumgewinnung aus PMN-Zellen *in vitro* freigesetzt werden kann. Kulturüberstände sind nicht für die Verwendung geeignet; da 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 μ l Probe zu 990 μ l Puffer gegeben.

Es ist keine Nüchtern-Blutentnahme oder spezielle Vorbehandlung erforderlich. Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Plasma 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.
- Die als Konzentrat gelieferten Reagenzien müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf ihre Endkonzentration verdünnt werden. Gut mischen, aber Schaumbildung vermeiden.
- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe sollte eine neue Pipettenspitze verwendet werden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Vertiefungen in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.
- Standards, Kontrollen und Proben sollten zumindest in Doppelansätzen bestimmt werden.
- Jeder Testlauf muss eine eigene Standardkurve beinhalten.

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), und 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 Master 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** mit neuen Einwegspitzen entsprechend der Plattenbelegung auf den Boden der Vertiefungen pipettieren.
- 60 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Schüttler (900 rpm) inkubieren.
- Dekantieren und **4 mal** jeweils mit **300 µl** Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
- 150 µl Enzymkonjugat** in jede Vertiefung pipettieren.
- 60 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Schüttler (900 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 (18-25°C) **im Dunkeln** ohne Schütteln inkubieren.
- 50 µl** Stopplösung in jede Vertiefung pipettieren und vorsichtig mischen.
- Die Optische Dichte bei **450 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmen.

Zur Bestimmung der PMN Elastase in Seminalplasma ist in Kapitel 14 (siehe Seite 26) ein separates Protokoll aufgeführt.

6.3 AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

- Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards und Proben bestimmen.
- Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
- Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
- Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
- Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

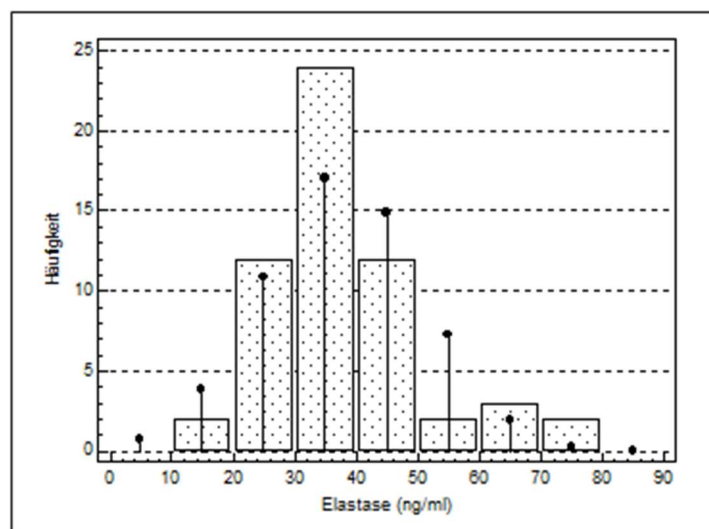
6.4 AUSWERTUNGSBEISPIEL

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 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)**

Diagnostische und therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests. 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 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag-Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalen als auch pathologischen Werten eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Es wird empfohlen, an den einschlägigen Ringversuchen teilzunehmen.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma Demeditec in Verbindung.

9 TESTCHARAKTERISTIKA

9.1 SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert zuzüglich der zweifachen Standardabweichung des Standards 0, beträgt 2,31 ng/ml.

9.2 SPEZIFITÄT

Der Demeditec PMN Elastase-Test erfasst spezifisch humane PMN Elastase bzw. den PMN Elastase/ α_1 -PI-Komplex.

9.3 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 (ng/ml)	VK (%)
1	80	5,2
2	241	4,7
3	358	4,6

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

9.4 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 Plasmaproben 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 Konzentration	erwartete Konzentration	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

9.5 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.

Probe	Verdünnungs- faktor	gemessene Konzentration	erwartete Konzentration	Linearität [%]
		[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
	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
	1:8	58,7	58,2	101

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren unter vollständiger Beachtung der Anweisungen auf der Packungsbeilage und unter Einhaltung der guten Laborpraxis durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 INTERFERENZEN

Um unterschiedlich schwere Gelbsucherkrankungen vorzutäuschen, wurden 100 bzw. 200 mg/l Bilirubin zu vier Proben hinzugegeben. Alle Proben wurden pur sowie mit Bilirubin versetzt 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]	[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.

Ikterische, lipämische und hämolytische Proben sollten nicht verwendet werden.

10.2 BEEINFLUSSUNG DURCH MEDIKAMENTE

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des PMN Elastase-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 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.

11.2 THERAPEUTISCHE KONSEQUENZEN

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. 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.

11.3 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 11.2. 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.

12 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-inflam-
matory treatment.
Andrologia 29, 1996: 187 – 192

13 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 (18-25°C) auf einem Schüttler (900 rpm) inkubieren											
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 (18-25°C) auf einem Schüttler (900 rpm) inkubieren											
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 (18-25°C) im Dunkeln ohne Schüt- teln inkubieren											
Pipettieren	Stopplö- sung	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.

14 PROTOKOLL FÜR SEMINALPLASMA

Ejakulat in Eppendorfgefäßen durch Zentrifugation (5 min) trennen. Überstand abnehmen und das Seminalplasma gegebenenfalls bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ einfrieren.

Vorbereitung der Standards und Kontrollen












1. PMN Elastase Master Standard mit **1 ml** Standard-/Probenverdünnungspuffer 30 min vor Gebrauch auflösen und gut mischen. Dieser **Standard H** entspricht einer Konzentration von **2.000 ng/ml**. Zur Lagerung aliquotiert bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ einfrieren.
Sechs Röhrchen beschriften: G (1.000 ng/ml), F (500 ng/ml), E (250 ng/ml), D (125 ng/ml), C (62,5 ng/ml), und B (31,3 ng/ml). **0,5 ml des Standard-/Probenverdünnungspuffers** in alle Röhrchen pipettieren. 0,5 ml des rekonstituierten PMN Elastase Standards in Röhrchen G (1.000 ng/ml) pipettieren und sorgfältig mischen. 0,5 ml aus dem Röhrchen G (1.000 ng/ml) in Röhrchen F (500 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 (2.000 ng/ml). Der Standard-/Probenverdünnungspuffer dient als Null-Standard A (0 ng/ml).
G = 1000 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-/Probenverdünnungspuffer)
2. Kontrollen mit **1 ml** Standard-/Probenverdünnungspuffer 30 min. vor Gebrauch auflösen und gut mischen. Zur Lagerung portioniert bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ wegfrieren.
3. Die Seminalplasmen **1:100** mit Standard-/Probenverdünnungspuffer 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 ($18-25^{\circ}\text{C}$) auf einem Schüttler (900 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** in jede Vertiefung pipettieren.
8. **60 Minuten** bei Raumtemperatur ($18-25^{\circ}\text{C}$) auf einem Schüttler (900 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 ($18-25^{\circ}\text{C}$) **im Dunkeln** ohne Schütteln inkubieren.
12. **50 μl Stopplösung** in jede Vertiefung pipettieren und vorsichtig mischen.
13. Die Optische Dichte bei **450 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmen.

Interpretation der Ergebnisse:

Befund	Messergebnis
keine Entzündung	0 - 250 ng/ml
mäßige Entzündung	> 250 - 1.000 ng/ml
massive Entzündung	> 1.000 ng/ml

Diagnostische und therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests. 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-Konfirmitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Ussage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	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