

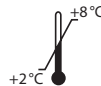
IDK[®] MPO ELISA

***Zur in-vitro Bestimmung von Myeloperoxidase (MPO)
in Serum und Plasma***

***For the in vitro determination of myeloperoxidase (MPO)
in serum and plasma***

Gültig ab / Valid from: 2017-01-24

REF K 6631B



IVD



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Präanalytik</i>	5
<i>Serumproben</i>	6
<i>EDTA-Plasmaproben</i>	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	11
<i>Spezifität</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	13
<i>Allgemeine Publikationen</i>	13
<i>Publikationen mit dem IDK® MPO-ELISA</i>	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von MPO (Myeloperoxidase) aus Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

MPO ist Teil des Abwehrmechanismus der polymorphnukleären Leukozyten gegen körperfremde Stoffe. Wenn es zu einer bakteriellen Infektion kommt, wandern diese Leukozyten, stimuliert durch chemotaktisch wirksame Substanzen (Leukotriene, Komplementfaktoren, Bakterientoxine u.a.), zum Infektionsort. Dort lagern sie sich an die Fremdkörper an und umschließen diese. Befindet sich der Fremdkörper in einer Vakuole, werden verschiedene Stoffe zur intrazellulären Verdauung eingesetzt: Dazu zählen MPO, kationische Proteine, Lysozym, Lactoferrin und einige saure Hydrolasen. Ein starker Schub des oxidativen Stoffwechsels findet statt, wobei in erhöhtem Maß Sauerstoffradikale entstehen. Durch diese Moleküle wird der Fremdstoff zerstört. Bei diesem Vorgang gelangen einige dieser Abwehrstoffe in den extrazellulären Raum. Dies geschieht besonders dann, wenn die Leukozyten den Fremdkörper aufgrund der Größe nicht umschließen können oder wenn sie selbst zerstört werden (durch Bakterientoxine, kristalline Substanzen u.a.).

MPO bildet mit Wasserstoffperoxid und einem Halogen ein sehr starkes antimikrobielles System, das eine Vielzahl von Mikroorganismen wirksam bekämpfen kann. MPO ist in den neutrophilen Leukozyten in hoher Konzentration vorhanden, während Wasserstoffperoxid erst durch den Stoffwechschelschub in stärkerem Maß gebildet oder durch die angegriffenen Mikroorganismen freigesetzt wird. Das MPO-System wird durch Katalase, überschüssiges H_2O_2 und einige andere Reduktionsmittel (z.B. Ascorbinsäure, Glutathion) gehemmt. Fehlen diese Substanzen, so kann das MPO-System im extrazellulären Raum auch andere Zellen angreifen. Dazu gehören Spermatozyten, Erythrozyten, Leukozyten und Tumorzellen.

Auch bei nicht-infektiösen Krankheiten spielt die MPO eine Rolle, z.B. bei der Atherosklerose (MPO wurde in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen), bei Lungenkrebs, der Alzheimer-Krankheit oder bei der Multiplen Sklerose. Verschiedene Untersuchungen lassen vermuten, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen MPO, Inflammation und akuten wie auch chronischen Manifestationen bei kardiovaskulären Erkrankungen besteht.

Brennan et al. (2003) zeigten anhand von 604 Patienten mit Brustschmerzen, dass eine einzige initiale Messung von MPO im Serum eine unabhängige, frühe Voraussetzung des unmittelbaren Myokardinfarkttrisikos sowie eine prognostische Abschätzung für das nächste halbe Jahr ermöglicht. Im Gegensatz zu Troponin T, der Kreatinkina-

se-MB-Isoform und CRP ist MPO bereits erhöht, ohne dass zuvor eine Myokardnekrose stattgefunden hat.

Fazit: Die Messung von MPO könnte künftig der Risikostratifizierung kardiovaskulärer Krankheiten sowohl bei chronischer Erkrankung als auch der Identifizierung von Risikopatienten dienen.

Indikationen

- Marker für Entzündungsaktivitäten im gastrointestinalen Bereich (Stuhl)
- Nierentransplantat-Abstoßung (Urin)
- Oxidativer Stress (Serum)
- Zur Differenzierung von allergischem und infektbedingtem Asthma (Bronchiallavage, Atemluftkondensat, Sputum)
- Verbesserte Risikoabschätzung bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (Serum)

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6631B	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6631B	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 6631B	CONJ	Konjugatkonzentrat, Kaninchen anti-MPO, Peroxidase-markiert	1 x 50 µl
K 6631B	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentration s. Spezifikation)	4 x 6 vials
K 6631B	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentration s. Spezifikation)	4 x 1 vial
K 6631B	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentration s. Spezifikation)	4 x 1 vial
K 6631B	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 6631B	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6631B	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für STDs und CTRLs sind dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STDs und CTRLs) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.

- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:301** in **Waschpuffer** verdünnt (40 µl CONJ + 12 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat (1:301 verdünntes CONJ) ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Präanalytik

Bei den Untersuchungen von Plasma oder Serum können sich die ermittelten MPO-Werte deutlich unterscheiden. Die Ursachen dafür sind:

- Im Serum werden während des Gerinnungsprozesses die Granulozyten zur kompletten Freisetzung der Granulozyten-Aktivierungsmarker angeregt. Die Standzeit der Proben sowie wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen führen zu keiner Werteververschiebung.
- Anders im Plasma: je länger die Probe vor dem Zentrifugationsschritt steht und je mehr Einfrier- und Auftauzyklen die Probe durchlebt, desto höhere MPO Konzentrationen werden ermittelt. Bei Verwendung von Plasma muss die Präanalytik konstant sein. Das gilt generell und unabhängig von dem verwendeten Testsystem.
- Frisch abgenommenes Serum/Plasma sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden. Es kann entweder am gleichen Tag im Test eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test Proben gut mischen. Wir empfehlen alle Werte in Doppelbestimmungen zu ermitteln.
- Die Präanalytik ist entscheidend für akkurate und stabile/reproduzierbare MPO-Messergebnisse.
- Shih et al. (2008) berichten über immer höhere MPO-Konzentrationen in Serum und Heparin-Plasma-Proben im Vergleich zu EDTA- oder Citrat-Plasma-Proben und empfehlen die Analyse von EDTA-Plasma-Proben. Ferner untersuchten die Autoren den Einfluss der Präanalytik, der Lagerungs-Temperatur und -Zeit auf die MPO-Messergebnisse von EDTA-, Lithium-Heparin- und Citrat-Plasma-Proben. Alle Proben ergaben einen Unterschied von weniger als 10% nach Lagerung bei Raumtemperatur für 2 Tage, bei 2–8 °C für 8 Tage und nach 3 Zyklen Einfrieren/Auftauen.

- Videm (1996) beschreibt bei Heparin-Konzentrationen, wie bei klinischer Dosierung verwendet werden, eine dosisabhängige Erhöhung der Granulozyten-Aktivität, die durch quantitative ELISA Bestimmung der MPO-Freisetzung untersucht wurde. Daher sollte bei der Auswertung der MPO-Ergebnisse für Proben von Patienten unter systematischer Heparintherapie der direkte Einfluss von Heparin auf Granulozyten bzw. auf die MPO-Freisetzung und -Konzentration berücksichtigt werden.

Serumproben

Serumproben werden vor dem Einsatz im Test 1:40 in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt.

Zum Beispiel: 25 µl Probe + 975 µl SAMPLEBUF.

EDTA-Plasmaproben

Plasmaproben werden vor dem Einsatz im Test 1:10 in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt.

Zum Beispiel: 100 µl Probe + 900 µl SAMPLEBUF.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

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

Teststandards, Kontrollen und verdünnte Proben, die MPO enthalten, werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, deren Vertiefungen mit einem hochaffinen polyklonalen anti-humanen-MPO-Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird die MPO aus der Probe vom gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat (ein peroxidasemarkierter polyklonaler anti-MPO-Antikörper) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes MPO – Peroxidasekonjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch folgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem MPO-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

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

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl Standards/Kontrollen/Proben (STDs/CTRLs/SAMPLEs) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl verdünntes Konjugat (CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	10–20 min* bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, mischen.

11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.
-----	--

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

8. ERGEBNISSE

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

1. 4-Parameter-Funktion

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

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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

Serum

Der ermittelte MPO-Spiegel der Serumproben wird mit dem Verdünnungsfaktor 40 multipliziert.

Plasma

Der ermittelte MPO-Spiegel der Plasmaproben wird mit dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert.

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

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Serum- und EDTA-Plasmaproben von augenscheinlich Gesunden wurde folgender Referenzbereich ermittelt

MPO aus Serum (n = 20) Median = 444 ng/ml

MPO aus EDTA-Plasma (n = 20) Median = 108 ng/ml

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 40)

Probe	MPO [ng/ml]	VK [%]
1	465,9	2,6
2	198,9	2,3

Inter-Assay (n = 13)

Probe	MPO [ng/ml]	VK [%]
1	459,0	4,2
2	198,3	4,1

Analytische Sensitivität

Leerwert (*limit of blank*, LoB)

0,161 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD)

0,294 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie:EP-17-A durchgeführt.

Spike-Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen MPO-Mengen versetzt und gemessen (n = 2).

Probe	Ungespikte Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	MPO erwartet [ng/ml]	MPO gemessen [ng/ml]
A	5,1	2,6	7,7	6,6
	5,0	4,3	9,3	8,1
	4,8	7,9	12,7	10,6
B	5,0	2,6	7,6	6,8
	4,9	4,3	9,2	8,8
	4,7	7,9	12,6	11,7

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Patientenproben (1 Serum, 1 EDTA-Plasma) wurden verdünnt und im IDK® MPO ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2)

Probe	Verdünnung	MPO erwartet [ng/ml]	MPO gemessen [ng/ml]
A	1:80	-	8,9
	1:160	4,5	5,0
	1:320	2,5	2,7
	1:640	1,4	1,4
	1:1280	0,7	0,8
B	1:20	-	6,5
	1:40	3,2	3,6
	1:80	1,8	2,0
	1:160	1,0	1,1
	1:320	0,5	0,6

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Serumproteinen gefunden.

- Alpha-1-Antitrypsin 0 %
- Albumin 0 %
- CRP 0 %
- Lysozym 0 %
- slgA 0 %
- PMN-Elastase 0 %
- Calprotectin 0 %

Es wurde keine Kreuzreaktivität mit MPO im Mausserum gefunden.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird emp-

fohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.

- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.

- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- IDK® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

Allgemeine Publikationen

1. Klebanoff SJ (1999) *Proc Assoc Am Physicians* **111**(5):383-9
2. Oremek et al. (1995) *MTA* **4**: 273-278
3. Markant et al. *Pharmazeutische Zeitung* **26**/1995, 140. Jahrgang: 9-25
4. Saiki (1998) Kurume *Med J* **45**: 69-73
5. Zhang R et al. (2001) *JAMA* **286** : 2136-2142
6. Brennan M et al. (2003) *N Engl J Med* **349** : 1595-1604
7. Baldus S et al. (2003) *Circulation* **108** : 1440-1445
8. Shih et al. (2008) Affect of Collection Tube Type and Preanalytical Handling on Myeloperoxidase Concentrations *Clinical Chemistry* **54**:6 1076–1079
9. Videm V. (1996) Heparin in clinical doses, primes' granulocytes to subsequent activation as measured by myeloperoxidase release. *Scand J Immunol. Apr*; **43**(4):385-90.

Publikationen mit dem IDK® MPO-ELISA

10. Exner M et al. (2006) *JACC* **47** (11) 2212-2218
11. Holz O et al. (2005) *J Clin Pharmacol* **45**(5):498-503
12. Stepan H et al. (2003) *Hypertens Pregnancy* **22**(3):239-45

13. Stepan H et al. (2002) Poster zum 10. Kongress der DGPG

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer

*In-Vitro*-Diagnostikum

Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Chargenbezeichnung



Verwendbar bis



Achtung

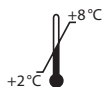
IDK[®] MPO ELISA

***For the in vitro determination of myeloperoxidase (MPO)
in serum and plasma***

Valid from 2017-01-24



K 6631B



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	19
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	20
<i>Preanalytic handling</i>	20
<i>Serum samples</i>	21
<i>EDTA-plasma samples</i>	21
7. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	24
<i>Reference range</i>	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Analytical Sensitivity</i>	24
<i>Spiking Recovery</i>	25
<i>Dilution recovery</i>	25
<i>Specificity</i>	26
12. PRECAUTIONS	26
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27
15. REFERENCES	27
<i>General literature</i>	27
<i>Literature using IDK® MPO ELISA</i>	28

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of MPO (myeloperoxidase) in serum and plasma For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

MPO is part of the defence mechanism of the polymorphonuclear leukocytes against exogenic substances. During bacterial infection, these leukocytes are stimulated by chemotactically effective substances (leukotrienes, complement factors, bacterial toxins etc.). They move to the site of the infection and encapsulate the foreign substances. If the foreign agent is located in an intracellular vacuole, different substances are used for the intracellular digestion. Amongst these are MPO, cationic proteins, lysozyme, lactoferrin and some acidic hydrolases. A strong surge of oxidative metabolism takes place, producing a high number of oxygen radicals which leads to the destruction of foreign proteins. Some of these molecules can leak into the extracellular space during this process. This happens to a greater extent, when the leukocytes cannot encapsulate the foreign body because of its size or in cases where the neutrophils are destroyed (by bacterial toxins, crystalline substances etc.).

MPO, together with hydrogen peroxide and a halogen, forms a very strong anti microbial system, which can effectively combat a number of microorganisms. MPO is present at high concentration in neutrophil granulocytes, whereas hydrogen peroxide is produced during infection/ inflammation. The MPO system is inhibited by catalase, excess of hydrogen peroxide and other reducing substances (e.g. ascorbic acid, glutathione). In the absence of these agents other cells in the extracellular space can be affected (e.g. spermatoocyte, erythrocytes, leukocytes, and tumor cells)

Apart from its implications in host defence, involvement of MPO has been described in numerous non-infectious diseases such as atherosclerosis, lung cancer, Alzheimer's disease, and multiple sclerosis. MPO is present and active within atherosclerotic lesions. Numerous lines of evidence suggest mechanistic links between myeloperoxidase, inflammation and both acute and chronic manifestations of cardiovascular disease.

Brennan et al. (2003) showed that in 604 sequentially ascertained patients presenting with chest pain, a single initial measurement of plasma myeloperoxidase was an independent early predictor of myocardial infarction, as well as the risk of major adverse cardiac events in ensuing 30-day and 6-month periods. In contrast to troponin T, creatine kinase MB isoform, and C-reactive protein levels, MPO levels may identify patients at risk for cardiac events in the absence of myocardial necrosis.

Summary: The inflammatory protein myeloperoxidase is present, active and mechanistically poised to participate in the initiation and progression of cardiovascular disease. The many links between myeloperoxidase, oxidation and cardiovascular disease suggest this leukocyte protein may have clinical utility in risk stratification for cardiovascular disease status and outcomes.

Indications

- Marker for inflammatory activities in the gastrointestinal tract (Stool)
- Renal transplant rejection (Urine)
- Oxidative stress (Serum)
- For the differentiation between allergic and infectious asthma (bronchial lavage, respiratory condensate, sputum)
- Prediction of risk in patients with acute coronary syndromes (Serum)

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6631B	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 6631B	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 6631B	CONJ	Conjugate concentrate, rabbit anti-MPO peroxidase labelled antibody	1 x 50 µl
K 6631B	STD	MPO-Standard, lyophilised (see specification for concentration)	4 x 6 vials
K 6631B	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for concentration)	4 x 1 vial
K 6631B	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for concentration)	4 x 1 vial
K 6631B	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K6631B	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K6631B	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Standards and controls** (reconstituted STDs and CTRLs) **are not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:301** in wash buffer (40 µl CONJ + 12 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:301 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored**.

- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8°C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Preanalytic handling

Significant differences in the MPO levels can be observed due to different sample preparation procedures, e.g. analysis of plasma or serum samples. The reasons are as follows:

- The granulocytes are activated during the serum clotting and release granulocyte-activating markers. The time between serum collecting and analysis as well as repeated freeze-thaw cycles don't cause a MPO concentration shift.
- On the contrary, in the case of plasma samples, varying the time between sampling and analysis or the number of freeze-thaw cycles will cause variation in the observed MPO levels. Therefore, the preanalytical conditions of plasma samples should be held constant. This is a general requirement independent of the test-system used.
- Fresh collected serum/plasma should be centrifuged within one hour. Store samples at -20°C if not assayed on the same day. Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicate analyses for each sample.
- The preanalytical handling is critical for accurate and consistent/reproducible MPO measurement results.
- Shih et al. (2008) report that MPO concentrations were consistently higher in serum and heparin plasma samples than in samples in EDTA or citrate and recommend the analysis of EDTA plasma samples. Furthermore, the authors investigated the effects of preanalytical handling, storage temperature and time for EDTA plasma, lithium-heparin and citrate preparation. Less than 10% differences were found after storage of samples at room temperature for 2 days, after storage at 2–8°C for 8 days, and after 3 freeze-thaw cycles for all sample types
- Videm (1996) describes at heparin concentrations, as applied in clinical practice, a dose-dependent increase in granulocyte activation as measured by MPO release, quantitated in enzyme-immunoassay. Thus, direct effects of heparin on granulocytes, e.g. MPO release and concentration, should be taken into consideration for the evaluation of MPO results of samples from patients receiving systemic heparin therapy.

Serum samples

Prior to analyses, the serum samples should be diluted 1:40 with sample dilution buffer (SAMPLEBUF).

For example: 25 µl sample + 975 µl SAMPLEBUF.

EDTA-plasma samples

Prior to analyses the EDTA-plasma samples should be diluted 1:10 with sample dilution buffer (SAMPLEBUF).

For example: 100 µl sample + 900 µl SAMPLEBUF.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the determination of human MPO and utilizes the two-site sandwich technique. Two selected polyclonal antibodies bind to human MPO.

Assay standards, controls and prediluted patient samples containing human MPO are added to wells of microplate that was coated with a high affine polyclonal anti-human MPO antibody. After the first incubation period, antibody immobilized on the wall of microtiter wells captures human MPO in the sample. Then a peroxidase-conjugated polyclonal anti-human MPO antibody is added to each microtiter well and a "sandwich" of capture antibody – human MPO – Peroxidase conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of MPO in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. MPO, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

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

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

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

We recommend to carry out the tests in duplicate.

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

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

8. RESULTS

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

1. 4 parameter algorithm

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

2. Point-to-point calculation

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

3. Spline algorithm

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

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

Serum

The obtained MPO levels of serum samples have to be multiplied with the dilution factor of **40**.

Plasma

The obtained MPO levels of EDTA plasma samples have to be multiplied with the dilution factor of **10**.

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

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

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

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

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

LoB × sample dilution factor to be used

10. QUALITY CONTROL

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

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

Reference range

Based on Immundiagnostik studies of serum and EDTA-plasma samples of apparently healthy persons the following reference range was estimated.

MPO from serum (n = 20) median = 444 ng/ml

MPO from EDTA-plasma (n = 20) median = 108 ng/ml

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 40)

Sample	MPO [ng/ml]	VK [%]
1	465.9	2.6
2	198.9	2.3

Inter-Assay (n = 13)

Sample	MPO [ng/ml]	VK [%]
1	459.0	4.2
2	198.3	4.1

Analytical Sensitivity

Limit of blank, LoB

0.161 ng/ml

Limit of detection, LoD

0.294 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2.

Spiking Recovery

Two samples were spiked with different MPO concentrations and measured using the IDK® MPO ELISA (n = 2).

Sample	Unspiked sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	MPO expected [ng/ml]	MPO measured [ng/ml]
A	5.1	2.6	7.7	6.6
	5.0	4.3	9.3	8.1
	4.8	7.9	12.7	10.6
B	5.0	2.6	7.6	6.8
	4.9	4.3	9.2	8.8
	4.7	7.9	12.6	11.7

Dilution recovery

Two samples (1 serum, 1 EDTA-plasma) were diluted and analyzed. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	MPO expected [ng/ml]	MPO measured [ng/ml]
A	1:80	-	8.9
	1:160	4.5	5.0
	1:320	2.5	2.7
	1:640	1.4	1.4
	1:1280	0.7	0.8
B	1:20	-	6.5
	1:40	3.2	3.6
	1:80	1.8	2.0
	1:160	1.0	1.1
	1:320	0.5	0.6

Specificity

No cross reactivity with other plasma proteins in serum/plasma was observed.

• Alpha-1-Antitrypsin	0 %
• Albumin	0 %
• CRP	0 %
• Lysozym	0 %
• sIgA	0 %
• PMN-Elastase	0 %
• Calprotectin	0 %

No cross reactivity with MPO in mouse serum was observed.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

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

- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- IDK® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

General literature

1. Klebanoff SJ (1999) *Proc Assoc Am Physicians* **111**(5):383-9
2. Oremek et al. (1995) *MTA* **4**: 273-278
3. Markant et al. *Pharmazeutische Zeitung* **26**/1995, 140. Jahrgang: 9-25
4. Saiki (1998) *Kurume Med J* **45**: 69-73
5. Zhang R et al. (2001) *JAMA* **286** : 2136-2142
6. Brennan M et al. (2003) *N Engl J Med* **349** : 1595-1604
7. Baldus S et al. (2003) *Circulation* **108** : 1440-1445
8. Shih et al. (2008) Affect of Collection Tube Type and Preanalytical Handling on Myeloperoxidase Concentrations *Clinical Chemistry* **54**:6 1076–1079

9. Videm V. (1996) Heparin in clinical doses, primes' granulocytes to subsequent activation as measured by myeloperoxidase release. *Scand J Immunol. Apr*; **43**(4):385-90.

Literature using IDK® MPO ELISA

10. Exner M et al. (2006) *JACC* **47** (11) 2212-2218
 11. Holz O et al. (2005) *J Clin Pharmacol* **45**(5):498-503
 12. Stepan H et al. (2003) *Hypertens Pregnancy* **22**(3):239-45
 13. Stepan H et al. (2002) Poster zum 10. Kongress der DGPG

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by



Attention