Arbeitsanleitung / Manual

Lysozym ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung von Lysozym aus Serum, Urin und Liquor

Lysozyme ELISA

For the in vitro determination of lysozyme in serum, urine and liquor

Gültig ab / Valid from 2018-05-15

REF **K 6903**

Σ 96

+8 °C / +2 °C

IVD

CE

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 2

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL 3

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN 3

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG 4

7. TESTDURCHFÜHRUNG 5

Testprinzip 5
Pipettierschema 5

8. ERGEBNISSE 7

9. EINSCHRÄNKUNGEN 7

10. QUALITÄTSKONTROLLE 8

Referenzwerte 8

11. TESTCHARAKTERISTIKA 9

Präzision und Reproduzierbarkeit 9
Spike-Wiederfindung 9
Analytische Sensitivität 9
Spezifität 9
Wiederfindung in der Verdünnung 10

12. VORSICHTSMASSNAHMEN 10

13. TECHNISCHE MERKMALE 10

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST 11

15. LITERATUR 11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Lysozym aus humanem Serum, Urin und Liquor geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

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

Indikationen

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

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6903	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6903	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6903	CONJBUF	Konjugat-Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 6903	CONJ	Konjugatkonzentrat, (Kaninchen-anti-Lysozym, peroxidasemarkiert)	1 x 50 µl
K 6903	CAL	Kalibrator, gebrauchsfertig (Konzentration der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 ml
K 6903	CTRL1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 ml

Art.-Nr.	Bezeich-nung	Kit-Komponenten	Menge
K 6903	CTRL2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 ml
K 6903	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 6903	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6903	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

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

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz 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.
- Als **Leerwert** (Blank) werden **100 µl Waschpuffer** (verdünntes WASHBUF) pipettiert.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:1001** in **Konjugatverdünnungspuffer (CONJBUF)** verdünnt (10 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:1001 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Serum

Frisch abgenommenes Serum wird innerhalb einer Stunde abzentrifugiert. Es wird entweder gleich im Test eingesetzt oder bei **-20 °C gelagert.**

Die Lysozym-Bestimmung sollte innerhalb von **8 Stunden** erfolgen, danach tritt bei **Raumtemperatur** ein Konzentrationsabfall auf. Bei **4 °C** beträgt die Stabilität **6 Tage**.*

Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test Proben gut mischen.

Für die Messung empfehlen wir die Serumproben zwischen **1:500** und **1:1000** zu verdünnen. Für die Verdünnungen wird **Waschpuffer** verwendet.

Beim Arbeiten mit kleinen Volumina ist auf die Verwendung geeichter Pipetten und auf besonders sorgsamen Umgang zu achten (z. B. Pipettenspitze nach der Entnahme abstreifen).

*Thomas, L., 1998, Labor und Diagnose, 5th ed. TH-Books, Frankfurt.

Urin

Für die Messung empfehlen wir die Urinproben **1:5 mit Probenverdünnungspuffer** zu verdünnen.

Liquor

Für die Messung empfehlen wir die Liquorproben **1:50 mit Waschpuffer** zu verdünnen.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

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

Kalibrator, Kontrollen und verdünnte Proben, die auf humanes Lysozym zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen anti-human-Lysozym-Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Lysozym aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat, ein peroxidasemarkierter anti-Lysozym-Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes Lysozym – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Lysozym-Gehalt direkt proportional. Anhand eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Musterkalibrierkurve lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

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

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automatenspezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gege-

benheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen **vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	**100 µl Kalibrator/Kontrollen/Leerwert/verdünnte Proben** in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15–30 °C) **unter Schütteln*** inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	**100 µl Konjugat** (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15–30 °C) **unter Schütteln*** inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	**100 µl Substrat** (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	**10–20 Minuten**** 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.

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

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

8. ERGEBNISSE

Für die Auswertung der Messwerte verwenden Sie bitte ein 4-parametrisches Logit-Log-Modell unter Verwendung der Angaben zum Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators (CAL), welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind.

Abhängig von der verwendeten Software kann der Kalibrationskurvenverlauf sowohl durch die Parameter A, B, C und D als auch durch die Wertepaare aus Konzentration und optischer Dichte der Standards beschrieben werden.

Achtung: Die Parameterwerte müssen genau eingegeben werden, da selbst geringe Abweichungen der Zahlenwerte zu massiven Störungen der Auswertung führen können.

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.

Serumproben

Die ermittelten Ergebnisse werden je nach Verdünnungsstufe mit dem **entsprechenden Verdünnungsfaktor** multipliziert, um die tatsächliche Konzentrationen zu ermitteln.

Urinproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 5** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Liquorproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 50** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

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

9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

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

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Nachweisgrenze × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

Referenzwerte

Serum*

700–2580 ng/ml

Die Lysozymkonzentration wird durch Produktion in Monozyten, Makrophagen, Granulozyten sowie im Nierenparenchym beeinflusst.

Lysozym erhöht bei: myelo-monozytäre Leukosen, Sarkoidose

Lysozym vermindert: Neugeborenen-Sepsis, Panmyelopathie

Urin*

1,7–123 ng/ml

Lysozym im Urin ist erhöht bei: myelomonozytären Leukämien, kindlichen Harnwegsinfekten

Lysozym im Urin ist vermindert bei: Panmyelopathien

Liquor*

< 62 ng/ml

* Labor Dr. Limbach, Heidelberg, http://www.labor-limbach.de

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 26)

Probe	Lysozym [ng/ml]	VK [%]
A	658,4	2,2
B	397,9	2,8

Inter-Assay (n = 18)

Probe	Lysozym [ng/ml]	VK [%]
1	696,5	4,6
2	391,4	6,4

Spike-Wiederfindung

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

Probe	Ungespikte Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Lysozym erwartet [ng/ml]	Lysozym gemessen [ng/ml]
A	0,46	1,8	2,26	2,17
		2,7	3,16	3,21
		5,0	5,46	5,51
B	0,74	1,8	2,54	2,48
		2,7	3,44	3,50
		3,7	4,44	4,65

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als B_0 + 1,645 SD. Gemessen wurde 21-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,144 ng/ml.

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen gefunden.

Wiederfindung in der Verdünnung

Eine Probe wurde verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 1)

Probe	Verdünnung	Lysozym erwartet [ng/ml]	Lysozym gemessen [ng/ml]
A	1:500	626,3	626,3
	1:1000	313,2	324,2
	1:2000	156,6	173,0

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Langhorst, Jost, Sigrid Elsenbruch, Twyla Mueller, Andreas Rueffer, Guenther Spahn, Andreas Michalsen, and Gustav J Dobos. 2005. "Comparison of 4 Neutrophil-Derived Proteins in Feces as Indicators of Disease Activity in Ulcerative Colitis." *Inflammatory Bowel Diseases* **11** (12) (December): 1085–91.
2. Pettersson, C, H Karlsson, M Ståhlman, T Larsson, B Fagerberg, M Lindahl, O Wiklund, J Borén, and L Fogelstrand. 2011. "LDL-Associated Apolipoprotein J and Lysozyme Are Associated with Atherogenic Properties of LDL Found in Type 2 Dia-

betes and the Metabolic Syndrome." *Journal of Internal Medicine* **269** (3) (March): 306–21. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02292.x.

3. Schwaab M., Euteneuer M., Lautermann J., Sudhoff H. 2005. "Lysozym Und Laktoferrin in Adenoiden, Hyperplastischen Und Chronisch Entzündeten Tonsillen - Eine Quantitative Analyse." *Laryngo-Rhino-Otologie* **84**: 660–664. doi:10.1055/s.
4. Volman, Julia J, Ronald P Mensink, Wim a Buurman, and Jogchum Plat. 2011. "In Vivo Effects of Dietary (1→3), (1→4)-B-D-Glucans from Oat on Mucosal Immune Responses in Man and Mice." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **46** (5) (May): 603–10. doi:10.3109/00365521.2010.545830.
5. West, N P, D B Pyne, J M Kyd, G M Renshaw, P A Fricker, and A W Cripps. 2010. "The Effect of Exercise on Innate Mucosal Immunity." *British Journal of Sports Medicine* **44** (4) (March): 227–31. doi:10.1136/bjsm.2008.046532.

Verwendete Symbole:


Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit


Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung


Verwendbar bis


Achtung


Gebrauchsanweisung beachten

Manual

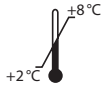
Lysozyme ELISA

For the in vitro determination of lysozyme in serum, urine and liquor

Valid from 2018-05-15

REF **K 6903**





IVD CE

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 15

2. INTRODUCTION 15

3. MATERIAL SUPPLIED 15

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED 16

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS 16

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES 17

7. ASSAY PROCEDURE 17

Principle of the test 17
Test procedure 18

8. RESULTS 19

9. LIMITATIONS 20

10. QUALITY CONTROL 20

Reference range 20

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS 21

Precision and reproducibility 21
Dilution recovery 21
Spiking Recovery 22
Analytical Sensitivity 22
Specificity 22

12. PRECAUTIONS 22

13. TECHNICAL HINTS 23

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE 23

15. REFERENCES 23

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of Lysozyme in human serum, urine and liquor. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

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

Indications

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

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6903	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 6903	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
K 6903	CONJBUF	Conjugate dilution buffer, ready-to-use	2 x 15 ml
K 6903	CONJ	Conjugate concentrate, (rabbit-anti-lysozyme, peroxidase-labelled)	1 x 50 µl
K 6903	CAL	Calibrator, ready-to-use (see specification for concentration)	1 x 1 ml
K 6903	CTRL1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 ml
K 6903	CTRL2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6903	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 50 ml
K 6903	SUB	Substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 6903	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- 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
- 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**.

- Use **100 µl of wash buffer** (diluted WASHBUF) as **blank**. Pipet into the respective well.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:1001** in **conjugate dilution buffer (CONJBUF)** (10 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:1001 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2**–**8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Serum

Serum should be centrifuged within one hour after collection. **Store samples at -20 °C** if not assayed on the same day.

Lysozyme should be determinated within **8 hours,** after this time the concentration decreases at **room temperature**. The sample can be stored **6 days at 4 °C**.*

Lipemic or hemolytic samples may give false results. Samples should be mixed well before assaying. Samples are diluted between **1:500** and **1:1000** with wash buffer.

Use this dilution factor to calculate the Lysozyme concentration.

*Thomas, L., 1998, Labor und Diagnose, 5th ed. TH-Books, Frankfurt.

Urine

We recommend a dilution of **1:5** with sample dilution buffer for the urine samples before analysis.

Liquor

We recommend a dilution of **1:50** in wash buffer for the liquor samples before analysis.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

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

Calibrator, controls and diluted samples, which are assayed for human lysozyme, are added into the wells of a micro plate coated with a high affine anti-human lysozyme

antibody. During the first incubation step, lysozyme is bound by the immobilised antibody. Then a peroxidase-conjugated anti-human lysozyme antibody is added into each microtiter well and a "sandwich" of capture antibody - human lysozyme – peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the enzymatic reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of lysozyme. Samples are quantified by referring their optical density to a lot-dependent master calibration curve and the use of the calibrator that is run with each test.

Test procedure

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

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

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2–8 ° C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

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

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	**Before use**, wash the wells **5 times** with **250 µl wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each **100 µl calibrator/controls/blank/diluted samples** into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for **1 hour** at room temperature (15–30 °C) on a **horizontal shaker***.
4.	Discard the content of each well and wash **5 times** with **250 µl wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add **100 µl conjugate** (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for **1 hour** at room temperature (15–30 °C) on a **horizontal shaker***.
7.	Discard the content of each well and wash **5 times** with **250 µl wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.

8.	Add **100 µl substrate** (SUB) into each well.
9.	Incubate for **10–20 min**** at room temperature (15–30 °C) in the **dark**.
10.	Add **100 µl stop solution** (STOP) into each well and mix well.
11.	Determine **absorption immediately** with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** against 620 nm as a reference.

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

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

8. RESULTS

For result evaluation, please use a four parametric logit-log model based on the standard curve of the respective kit lot and the calibrator value (CAL). All essential information on the standard curve is provided on the QC data sheet of the respective product lot.

The calibration curve can be expressed either by the concentration of each standard with its corresponding optical density or by the four parameters A,B,C and D. In both cases the optical density of the calibrator (CAL) is essential. Depending on your evaluation software program, either the one or the other kind of data described above should be entered.

Caution: Please make sure that all parameters and values are transferred accurately into your software as minor deviations can cause severe errors during evaluation.

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 results have to be multiplied with the **corresponding dilution factor** to get the actual concentrations.

Urine

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 5** to get the actual concentrations.

Liquor

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 50** to get the actual concentrations.

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 (see definition below) must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

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

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

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

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

detection limit × *sample dilution factor to be used*

10. QUALITY CONTROL

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

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

Reference range

Serum*

700–2580 ng/ml

The lysozyme concentration depends on its production by monocytes, macrophages, granulocytes as well as kidney parenchyma cells.

Lysozyme is elevated in: myelomonocytic leukosis, sarcoidosis

Lysozym is reduced in: newborn sepsis, panmyelopathy

Urine*

1.7–123 ng/ml

Lysozyme in urine is elevated in: myelomonocytic leukemia, urinary passage infection of children

Lysozyme in urine is reduced in: panmyelopathy

Liquor*

< 62 ng/ml

* Labor Dr. Limbach, Heidelberg, http://www.labor-limbach.de

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 26)

Sample	Lysozyme [ng/ml]	CV [%]
A	658.4	2.2
B	397.9	2.8

Inter-Assay (n = 18)

Sample	Lysozyme [ng/ml]	CV [%]
A	696.5	4.6
B	391.4	6.4

Dilution recovery

A patient sample was diluted and analysed. The results are shown below (n = 1):

Sample	Dilution	Lysozyme expected [ng/ml]	Lysozyme measured [ng/ml]
A	1:500	626.3	626.3
	1:1000	313.2	324.2
	1:2000	156.6	173.0

Spiking Recovery

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

Sample	Unspiked Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Lysozyme expected [ng/ml]	Lysozyme measured [ng/ml]
A	0.46	1.8	2.26	2.17
		2.7	3.16	3.21
		5.0	5.46	5.51
B	0.74	1.8	2.54	2.48
		2.7	3.44	3.50
		3.7	4.44	4.65

Analytical Sensitivity

The zero standard was measured 21 times. The detection limit was set as B_0 + 1.645*SD and estimated to be 0.144 ng/ml.

Specificity

No cross reactivity to other plasma proteins 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 colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

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

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

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

15. REFERENCES

1. Langhorst, Jost, Sigrid Elsenbruch, Twyla Mueller, Andreas Rueffer, Guenther Spahn, Andreas Michalsen, and Gustav J Dobos. 2005. "Comparison of 4 Neutrophil-Derived Proteins in Feces as Indicators of Disease Activity in Ulcerative Colitis." *Inflammatory Bowel Diseases* **11** (12) (December): 1085–91.

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

Used symbols:


Temperature limitation

REF Catalogue Number

IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

→REF To be used with


Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests

LOT Lot number


Use by


Attention


Consult instructions for use