

# Lysozym ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung des Lysozym in Serum und Stuhl*

# Lysozyme ELISA Kit

*For the in vitro determination of Lysozyme in serum and stool*

Gültig ab/valid from 29.06.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 6900

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C



Inhaltsverzeichnis	Seite
Table of contents	2
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>3</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>4</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>4</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN</b>	<b>6</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>7</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>8</b>
HINWEISE	8
PIPETTIERSHEMA	8
<b>10. ERGEBNISSE</b>	<b>10</b>
MUSTEREICHKURVE	10
<b>11. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>11</b>
<b>12. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>11</b>
ERWARTETE ERGEBNISSE	11
<b>13. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>12</b>
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	12
WIEDERFINDUNG	13
SENSITIVITÄT	14
KREUZREAKTIVITÄT	14
LINEARITÄT	14
<b>14. LITERATUR</b>	<b>14</b>
<b>15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>15</b>

Table of content	Page
<b>1. INTENDED USE</b>	<b>17</b>
<b>2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST</b>	<b>17</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>19</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>20</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>20</b>
SERUM	20
FAECES	20
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>21</b>
PROCEDURAL NOTES	21
TEST PROCEDURE	21
<b>10. RESULTS</b>	<b>23</b>
TYPICAL CALIBRATION CURVE	23
<b>11. LIMITATIONS</b>	<b>24</b>
<b>12. QUALITY CONTROL</b>	<b>24</b>
EXPECTED VALUES	24
<b>13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>25</b>
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	25
RECOVERY	26
SENSITIVITY	26
MEAN VALUE	26
STANDARD	26
DETECTION LIMIT	26
CROSS REACTIVITY	27
SAMPLE DILUTION	27
<b>14. REFERENCES</b>	<b>27</b>
<b>15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>28</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Lysozym in Serum und Stuhl geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

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

### Indikation:

- Verlauf und Diagnose bei Morbus Crohn
- Früherkennung von Nierentransplantat-Abstoßungsreaktionen
- Unterscheidung und Verlaufskontrolle von Leukosen
- Verlaufs- und Therapiekontrolle kindlicher Harnwegsinfekte
- Unterscheidung bakterieller von abakteriellen Meningitiden bei Kindern
- Erkennung einer Sepsis Neugeborener.

## 3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung von Lysozym aus Stuhlproben und Serum. In diesem ELISA wird das Lysozym aus den Proben an die auf der Mikrotiterplatten fixierten Antikörper gebunden und anschließend durch Zugabe eines zweiten lysozymspezifischen Antikörpers (Kaninchen anti Lysozym POD-Markiert) quantifiziert. Die gebundene Peroxidase-Menge ist dem Lysozymgehalt direkt proportional. Als Substrat wird TMB eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung kann photometrisch - nach Zugabe der Stopplösung - bei 450 nm gemessen und anhand einer mitgeführten Eichkurve quantifiziert werden.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
K 6900MTP	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 6900WP	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6900VP	POD-Verdünnungspuffer	1 x 15 ml
K 6900K	Konjugat, (Schaf anti Lysozym, Peroxidase-markiert)	1 x 50 µl
K 6900ST	Standards, gebrauchsfertig (0; 1.1; 3.3; 10; 30 ng/ml)	5 x 1 ml
K 6900KO	Kontrolle	1 x 1ml
K 6900TMB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6900AC	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

#### 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 1,5 ml Reaktionsgefäße (z.B. Eppendorf)
- div. Pipetten. Beim Arbeiten mit kleinen Volumina ist auf die Verwendung geeichter Pipetten und auf besonders sorgsamem Umgang zu achten (z. B. Pipettenspitze nach der Entnahme abstreifen).
- Zentrifuge
- ELISA-Reader
- Mikrotiterplattenschüttler

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bei mehrfach Ansatz der Platte ist bitte darauf zu achten, daß die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden** (z.B. Peroxidase-markierter Antikörper ist in der größten Verdünnungsstufe nicht haltbar). Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen (Innerhalb des angegebenen Verfallsdatums) verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** muß vor Gebrauch **1:10** in aqua dest. verdünnt werden (50 ml Konzentrat + 450 ml aqua dest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur/37 °C Wasserbad auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C 1 Monat** (in einem geschlossenen Gefäß) haltbar.
- Das **Konjugat** (Peroxidase markierter Antikörper) wird **1:1000** mit POD-Verdünnungspuffer verdünnt. (10 ml POD-Verdünnungspuffer + 10 µl PO-Antikörper.) Der PO-Antikörper ist im unverdünnten Zustand bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil.

**Alle Testreagenzien sind bei 2-8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.**

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter  $H_2SO_4$ .  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muß auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muß die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. PROBENVORBEREITUNG

### Stuhlproben

Ca. **100 mg** Stuhl einwiegen und die genau eingewogene Stuhlmenge notieren und in **5 ml** Waschpuffers lösen (sehr gut mischen). Danach wird die Suspension für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wird abgenommen, in ein Eppendorfröhrchen überführt und ein weiteres Mal in einer Eppendorfzentrifuge bei 13000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der erhaltene Überstand ist bei -20°C für ca. einen Monat haltbar.

Nach jedem Auftauen wird der Überstand vor dem Testansatz für **2 Minuten** bei 13000 rpm in der Eppendorfzentrifuge anzentrifugiert. Danach wird der Überstand **1:2** mit Waschpuffer weiterverdünnt (z.B. 200 µl des Überstandes + 200 µl des Waschpuffer). Aus diesen Einzelverdünnungen resultiert eine Endverdünnung von **1:100**. Von dieser Endverdünnung werden dann **100 µl** pro Vertiefung in den Test eingesetzt.

Zur einfacheren Dosierung und Homogenisierung des Probenmaterials empfehlen wir das Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 745804).

### Serum

Serum kann 5 Tage bei 2-8°C gelagert werden; bei längerer Lagerung empfiehlt sich die Proben bei -20°C zu lagern.

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 sorgsamem Umgang zu achten (z. B. Pipettenspitze nach der Entnahme abstreifen).

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Hinweise*

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumen sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer, nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

### *Pipettierschema*

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch **5x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

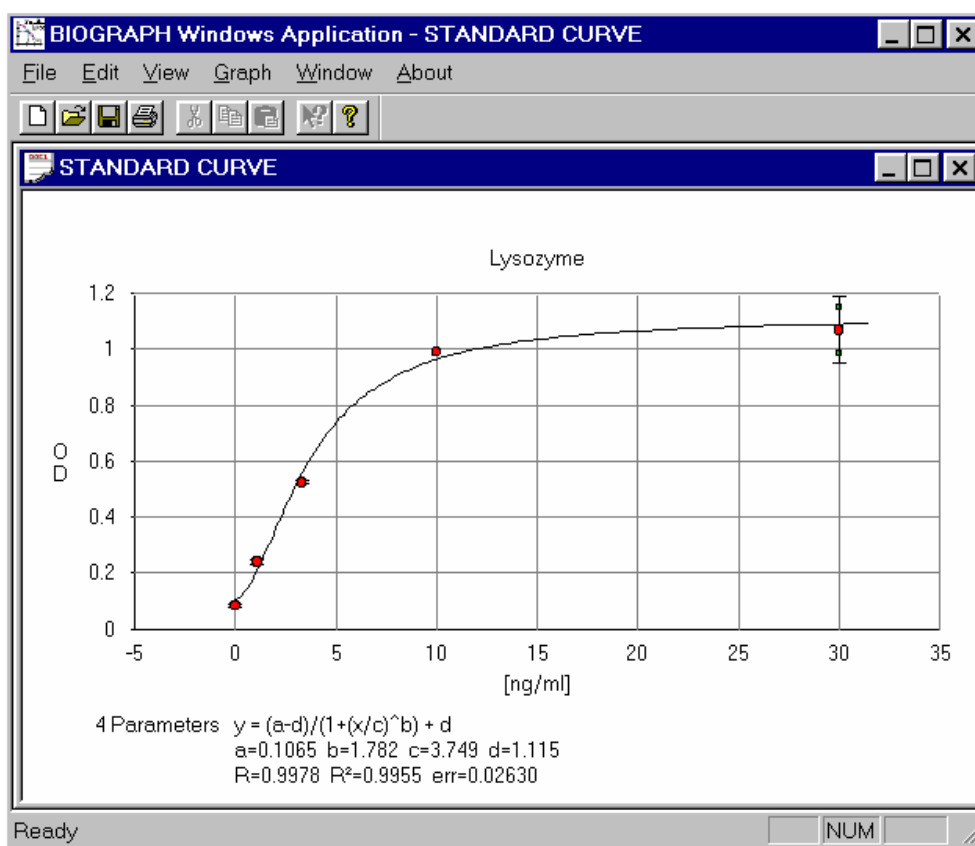
1. **100 µl** Standards und Patientenproben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. Inhalt der Platte verwerfen, die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen.
4. **100 µl** Peroxidase-Konjugat pro Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Inhalt der Platte verwerfen, die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen.
7. **100 µl** TMB-Substrat in jede Vertiefung pipettieren und **10 - 20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis ausreichend große Farbdifferenzen auftreten.

8. **50 µl** Stopplösung in jede Vertiefung pipettieren.
9. Die Extinktion wird **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) gemessen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Meßbereich des Photometers übersteigen, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

## 10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

### Mustereichkurve



Konzentration [ng/ml]	30	10	3.3	1.1	0
OD Mittelwert	1.257	1.05	0.519	0.224	0.063

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Assays verwendet werden.

**Stuhlproben:**

Die ermittelte Lysozym Konzentration der Stuhlprobe wird wie im folgenden Beispiel berechnet:

Einwaage: 80 mg (1ml Stuhl = 1g) = 0,08 ml

Verdünnungsstufe 1: 5ml / 0,08ml = 62,5

Verdünnungsstufe 2: 2

Verdünnungsfaktor: 62,5 x 2 = 125

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **125** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln. **Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.**

**Serumproben:**

Die ermittelte Serumkonzentration wird je nach Verdünnungsstufe mit **500** oder **1000** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

## 11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Lysozym Konzentration größer dem größten Standard sollten mit Waschpuffer verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

## 12. QUALITÄTSKONTROLLE

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

### *Erwartete Ergebnisse*

**Normwerte:**

Lysozym-Konzentration (Stuhl): < 600 ng/ml

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

## 13. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

#### Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Meßserie wurde geprüft. Eine Normalprobe und eine pathologische Probe wurden 20 mal in einem Lysozym ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 20

Probe	Lysozym [ng/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	6.8	8
2	1.4	13

#### Inter-Assay-Variation

Es wird die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen geprüft. Eine Normalprobe und eine pathologische Probe wurden an verschiedenen Tagen und verschiedenen Personen im Lysozym ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 20

Probe	Lysozym [ng/ml]	Inter-Assay Vk [%]
1	5.6	17

### Wiederfindung

Verschiedene Lysozym Proben wurden mit unterschiedlichen Spikes gemessen.

Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Lysozym erwartet [ng/ml]	Lysozym Gemessen [ng/ml]
1.5	1	2.5	3.5
1.5	3	4.5	5.5
1.5	6	7.5	7.1
0.75	15	15.8	12.1
0.75	5	5.8	5.7
0.75	1.7	2.4	2.7
0.75	0.7	1.4	1.5

### Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 + 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 20 mal der Standard null.

Probe	Lysozym Mittelwert [OD]	Standardab- weichung	Nachweis- grenze [ng/ml]
1	0.184	0.029	0.5

### Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen im Stuhl gefunden.

### Linearität

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	unverdünnt	15.3	15.3
	1:2	7.7	7.5
	1:4	3.8	3.9
	1:8	1.9	<NWG
B	unverdünnt	9.3	9.3
	1:2	4.65	6.0
	1:4	2.3	4.1
	1:8	1.16	1.6

## 14. LITERATUR

- 1.Hemrika et al., 1989; *Neth. J. Med.*34, 174
- 2.Arndt et al. 1993; *Crohn; Klin. Lab.* 11, 867 - 876
- 3.Stein, J. 1996; 3. *Post-graduiertenkurs der DGVS*

## 15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humansenen verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik 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 zurück zu senden.

Manual

# Lysozyme ELISA Kit

*For the in vitro determination of Lysozyme in serum and stool*

Gültig ab/valid from 29.06.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 6900

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C



## 1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of **Lysozyme** in serum and stool. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

**Lysozyme** (muramidase) is a protein with a molecular weight of approx. 15 kD and belongs to the group of alkaline glycosidases. **Lysozyme** is made 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.

### Indication

- Diagnosis and monitoring of Crohn's Disease, Boech's Disease (in serum)
- Bacterial, viral, allergenic or autoimmune caused bowel inflammations

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is suitable for the quantitative determination of Lysozyme from human serum and stool. In a first incubation step, the Lysozyme in the patient samples is captured by the precoated antibody. The quantification of the bound Lysozyme is carried out by adding an rabbit anti Lysozym- Peroxidase-labelled conjugate. Finally the solid phase is incubated with the substrate, Tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stop solution is used to stop the reaction. The color converts from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of Lysozyme in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using results obtained from the calibrators. Lysozyme, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

#### 4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Kit Components	Quantity
K 6900MTP	one holder with precoated strips	96
K 6900WB	ELISA wash concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6900VP	POD dilution buffer	1 x 15 ml
K 6900K	Conjugate, (Sheep-anti-Lysozym, Peroxidase-labelled)	1 x 50 $\mu$ l
K 6750ST	Calibrators, ready to use (0; 1.1; 3.3; 10; 30 ng/ml)	5 x 1 ml
K 6750KO	Control	1 x 1 ml
K 6750TMB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	1 x 15 ml
K 6750AC	ELISA stop solution, ready to use	1 x 7 ml

#### 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Deionized water
- Precision pipettors calibrated to deliver 50-100  $\mu$ l
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Microplate reader 450 nm

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, please make sure that the reagents are carefully stored as mentioned. Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.
- The **washing buffer concentrate** should be diluted with Aqua dest. **1:10** before use (add 450 ml Aqua. dest. to 50 ml concentrate). Crystals could occur due to high salt concentration. The crystals have to be resuspended **before dilution of the buffer solutions** using a water bath (37°C). The buffer concentrates are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted solutions could be stored at 2-8°C for 1 month.
- The **Conjugate** (POD antibody) has to be diluted **1:1000** in POD dilution buffer (10 µl POD antibody and 10 ml POD dilution buffer). The antibody is stable at 2-8 °C until expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready for use. The test reagents are stable up to the date of expiry (see label of test package) when stored at 2-8°C.

## 7. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- The calibrators and controls contain human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2, and anti-HCV. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HCV or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- Stop Solution consists of diluted Sulfuric Acid. This is 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 out immediately with copious quantities of water. Do not breath vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### *Serum*

Samples are diluted between **1:500** and **1:1000**.

Use this dilution factor to calculate the Lysozyme concentration.

### *Faeces*

Give about **100 mg** of the sample (please note the real weight for the calculation) to **5 ml** of the washing buffer and mix. Centrifuge the diluted sample for 10 min at 3000 rpm. 1 ml supernatant is given into an eppendorf tube and centrifuged once more at 13.000 rpm for 5 min. The resulting supernatant could be stored at -20°C for about 1 month.

After thawing, the supernatant is centrifuged at 13.000 rpm for 2 min. Afterwards the supernatant is diluted **1:2** in washing buffer (200µl supernatant is added to 200 µl sample dilution buffer). **100 µl** of this solution is used for the assay.

Immundiagnostik recommends the use of the sample tubes from Boehringer / Mannheim for sample preparation.

## 9. ASSAY PROCEDURE

### *Procedural notes*

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- Carry out the assay with the actual manual delivered with the kit.

### *Test procedure*

Wash the precoated microtiter plate 5 x with 250 µl ELISA wash buffer. Carry out the tests in duplicate.

1. Add **100 µl** calibrators and patient samples (serum and stool diluted, see above).
2. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
3. Decant the content of the plate and wash the cavities **5 x with 250 µl** of the diluted ELISA wash buffer solution.
4. Add **100 µl** of Peroxidase-labelled conjugate.
5. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
6. Decant the content of the plate and wash the cavities **5 x with 250 µl** of the diluted washing buffer solution.
7. Add **100 µl** of TMB substrate solution.
8. Incubate for **10-20 minutes** at room temperature until colour differences are sufficient.

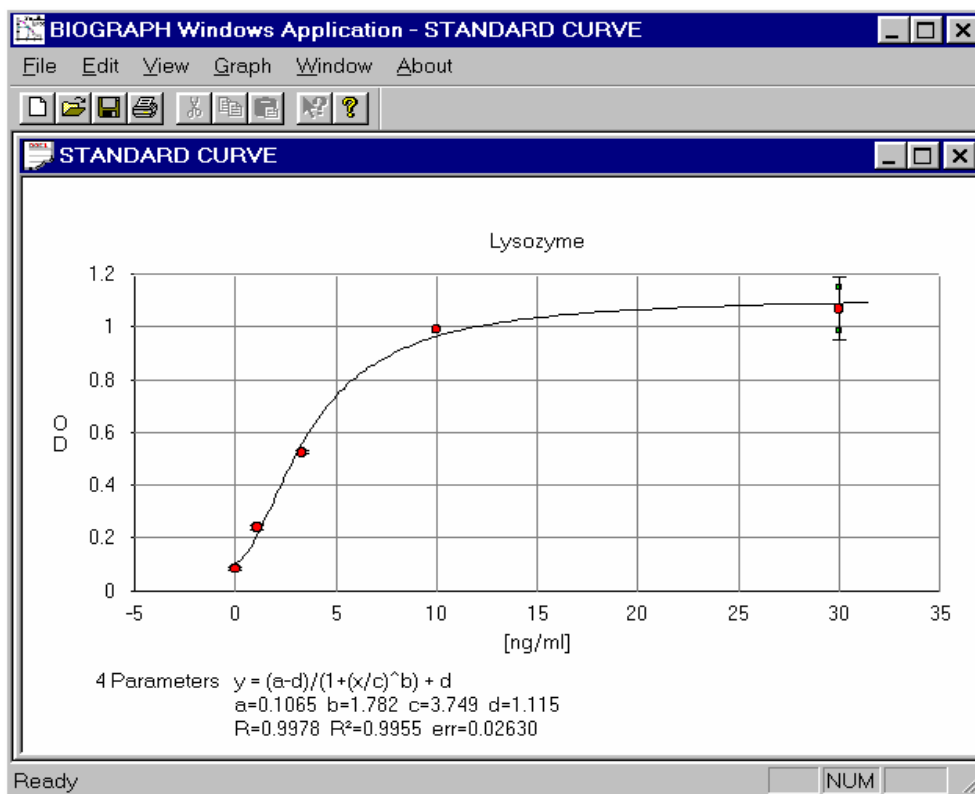
9. Add **50 µl** of stop solution and mix shortly.
10. Determine absorption with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as reference.

## 10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the calibrators. Commercially available software can be used as well as graph paper. Results of the samples are read from this calibration curve.

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a spline- or 4PL algorithm is recommended.

### *Typical calibration curve*



Concentration [ng/ml]	30	10	3.3	1.1	0
OD mean value	1.257	1.05	0.519	0.224	0.063

The data is for demonstration only and cannot be used in place of data generations at the time of the assay.

### Serum

The result has to be multiplied with **500** or **1000** to calculate the serum value.

### Faeces

For the Lysozyme concentration of faeces samples, calculate as described in the following example:

weight: 80 mg (1ml stool = 1g) = 0,08 ml

dilution step 1: 5ml / 0,08ml = 62,5

dilution step 2: 2

dilution factor:  $62,5 \times 2 = 125$

Multiply the result with **125** to get the real concentration. The dilution factor depends on the weight of the faeces.

## 11. LIMITATIONS

Samples with Lysozyme levels greater than the highest calibrator, should be diluted and re-assayed.

## 12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercial control samples for internal quality control.

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

### *Expected values*

Lysozyme concentration (faeces): < 600 ng/ml

## 13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik Lysozyme ELISA test was calculated from 20 replicate determinations on each of one samples.

Intra-Assay CV n= 20

Sample	Lysozyme [ng/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	6.8	8
2	1.4	13

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik Lysozyme ELISA test was calculated from data on 2 samples obtained in 20 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of three months.

Inter-Assay CV n= 20

Sample	Lysozyme [ng/ml]	Inter-Assay CV [%]
1	5.6	17

*Recovery*

Two samples were spiked with Lysozyme calibrator and measured with this assay.

Recovery n=2

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Lysozyme expected [ng/ml]	Lysozyme measured [ng/ml]
1.5	1	2.5	3.5
1.5	3	4.5	5.5
1.5	6	7.5	7.1
0.75	15	15.8	12.1
0.75	5	5.8	5.7
0.75	1.7	2.4	2.7
0.75	0.7	1.4	1.5

*Sensitivity*

n=20

Sample	Lysozyme mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [ng/ml]
1	0.184	0.029	0.5

### *Cross reactivity*

No cross reactivity to other proteins in serum and stool.

### *Sample dilution*

Linearity n= 2

Two patient serum samples were diluted with ELISA wash buffer. The results are shown below:

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

## 14. REFERENCES

1. Hemrika et al.: 1989; Neth. J. Med. 34, 174
2. Arndt et al.: 1993, Crohn; Klein. Lab. 11, 867
3. Stein, J. et al.: 1996; 3. Post-Graduiertenkurs der DGVS

## 15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components which are made of human serum are tested for Australia antigen and HIV and found to be negative. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. The normal precautions for laboratory working should be observed.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for in-vitro diagnostics only.
- The reagents should not be used after the date of expiry (see label on the test package).
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.