

Arbeitsanleitung/Manual

# MPO ELISA Kit

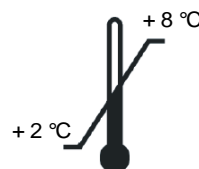
*Zur in vitro Bestimmung von Myeloperoxidase (MPO) in Serum  
und Plasma*

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

Gültig ab/valid from 27.09.2005



K 6631



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer  
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von MPO (Myeloperoxidase) in 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 Stoffwechselschub 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 Voraussage des unmittelbaren Myokardinfarkttrisikos sowie eine

prognostische Abschätzung für das nächste halbe Jahr ermöglicht. Im Gegensatz zu Troponin T, der Kreatinkinase-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

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6631MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6631WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 6631PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	50 ml
K 6631ST	STD	MPO Standard, lyophilisiert	4 vials
K 6631KO	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 vials
K 6631K	CONJ	Konjugat, Kaninchen anti-MPO, Peroxidase-markiert, Konzentrat	50 µl
K 6631TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6631AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	7 ml

### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

## 5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte 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 des angegebenen Haltbarkeitsdatums verwendet werden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.); gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der lyophilisierte **Standard** (STD) und die lyophilisierte **Kontrolle** (CTRL) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Standard und Kontrolle werden mit **500 µl** aqua dest. rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierter Standard und Kontrolle können **nicht gelagert** werden.

Die Lösungen für die Standardkurve werden aus dem **MPO-Standardkonzentrat** (35 ng/ml = S1) mit Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) in **1:2 Verdünnungsschritten** wie folgt hergestellt.

**S1 (35 ng/ml)**

**250 µl S1 + 250 µl SAMPLEBUF = S2 (17.5 ng/ml)**

**250 µl S2 + 250 µl SAMPLEBUF = S3 (8.75 ng/ml)**

**250 µl S3 + 250 µl SAMPLEBUF = S4 (4.4 ng/ml)**

**250 µl S4 + 250 µl SAMPLEBUF = S5 (2.2 ng/ml)**

**Als Standard 0 ng/ml wird Probenverdünnungspuffer verwendet.**

- Das **Konjugat** (CONJ) wird **1:500** in **Waschpuffer** (WASHBUF) verdünnt (20 µl CONJ + 10 ml WASHBUF). Unverdünntes Konjugat ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat 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. PROBENVORBEREITUNG

### *Probenverdünnung*

#### **Serum/Plasma Proben**

##### 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 Werteverchiebung.

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.

Immundiagnostik AG empfiehlt daher, zur Bestimmung der MPO Konzentration Serum zu verwenden.

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.

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

**25 µl Probe + 975 µl SAMPLEBUF.**

**EDTA-Plasmaproben** werden vor dem Einsatz im Test **1:10** in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt. Zum Beispiel:

**100 µl Probe + 900 µl SAMPLEBUF.**

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

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

Teststandards, Kontrollen und verdünnte Patientenseren, die MPO enthalten, werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, deren Vertiefungen mit einem hochaffinen polyklonalen anti-human MPO Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird die MPO aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat (ein zweiter Peroxidase markierter polyklonaler anti-MPO Antikörper) zugegeben und es bildet sich folgende Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes MPO - Peroxidase Konjugat. 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. Parallel dazu wird eine Standardkurve - Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

## Pipettierschema

<p>Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen</p>
<p>Markieren Sie die Positionen für STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) im Protokollblatt</p>
<p>Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden</p>
<p>Waschen Sie die Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer). Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen</p>
<p>Pipettieren Sie 100 µl STD /SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen. Als STD 0 ng/ml wird der Verdünnungspuffer der Proben eingesetzt</p>
<p>Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren</p>
<p>Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen</p>

Pipettieren Sie 100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen
Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
Pipettieren Sie 100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen
20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen, gut mischen
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 gelesen. 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. 0.01).

### 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 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. 0.01).

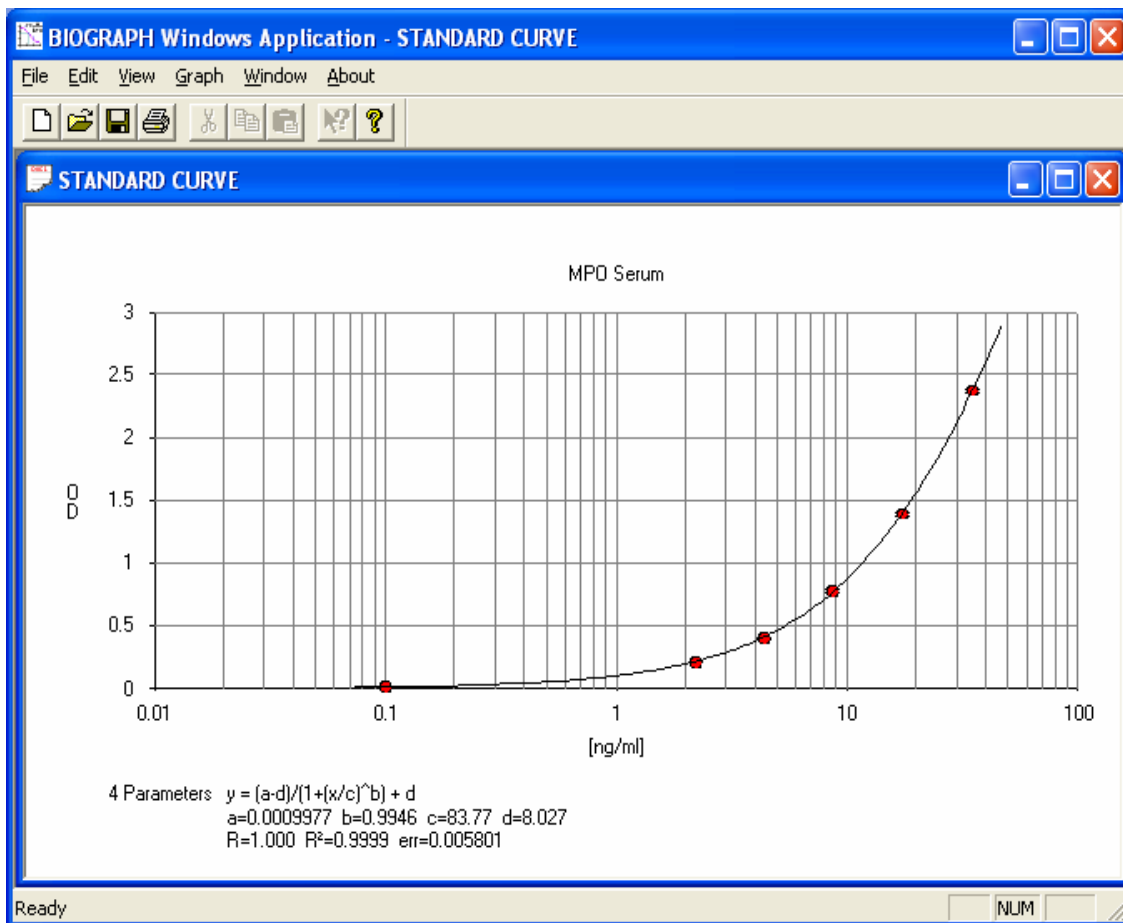
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

### Serum/Plasma Proben

Um die Konzentration in **Serum** zu bestimmen, wird der ermittelte MPO-Wert mit **40** multipliziert.

Um die Konzentration in **Plasma** zu bestimmen, wird der ermittelte MPO-Wert mit **10** multipliziert.

## Mustereichkurve



STD	OD1	OD2	mittlere OD	CV (%)	Conc. [ng/ml]
1	0.013	0.013	0.013	-	0
2	0.207	0.209	0.208	0.7	2.2
3	0.398	0.405	0.401	1.2	4.4
4	0.785	0.774	0.780	1.0	8.75
5	1.404	1.380	1.392	1.2	17.5
6	2.389	2.361	2.375	0.8	35

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

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Serum/Plasma mit MPO Konzentrationen, die größer als der höchste Standard sind werden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und nochmals bestimmt.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

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

### *Erwartete Ergebnisse*

#### **Normwerte**

MPO aus Serum (n = 42):                      Mittelwert 340 ng/ml (SD 176.7)

MPO aus EDTA-Plasma (n = 41):            Mittelwert 98.31 ng/ml (SD 62.9)

Anhand einer laborinternen Studie mit Stuhlproben von augenscheinlich Gesunden wurden die Mittelwerte berechnet.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

Intra-Assay (n=20)		
Probe	MPO [ng/ml]	Vk [%]
1	147.1	4.3
2	288.6	4.8

Inter-Assay (n=20)		
Probe	MPO [ng/ml]	Vk [%]
1	171.7	12
2	239.9	15

### *Wiederfindung*

2 Proben wurden mit 3 unterschiedlichen MPO Standardmengen versetzt und gemessen.

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	MPO erwartet [ng/ml]	MPO gemessen [ng/ml]
116	320	436	401
116	200	316	336
116	125	241	254
92	320	412	388
92	200	292	297
92	125	217	204

### *Sensitivität*

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

Probe	MPO Mittelwert [OD]	Standardab- weichung (SD)	Nachweis- grenze [ng/ml]
1	0.013	0.003	1.6

### *Linearität*

Zwei Patientenproben wurden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	1:40	14.5	14.5
	1:80	7.2	7.1
	1:160	3.6	3.5
B	1:40	19.5	19.5
	1:80	9.75	10.1
	1:160	4.8	5.2

### *Kreuzreaktivität*

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen im Serum/Plasma 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

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. 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 Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- 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.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet 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 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 zurück zu senden.

## 15. LITERATUR

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

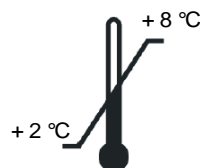
# MPO ELISA KIT

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

Valid from September 27th, 2005



K 6631



## 1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of MPO (Myeloperoxidase) in serum and plasma. It is 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 generated in the course of 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 identified 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

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 6631MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6631WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K 6631PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	50 ml
K 6631ST	STD	MPO-Standard, lyophilized	4 vials
K 6631KO	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	4 vials
K 6631K	CONJ	Conjugate, rabbit anti-MPO peroxidase labelled antibody, concentrate	50 µl
K 6631TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6631AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	7 ml

### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm  
(reference wave length 620 or 690 nm)

## 5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, make sure that the reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml a. bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals have to be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** could be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- The lyophilized **standard** (STD) and the lyophilized **control** (CTRL) are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Standard and control have to be reconstituted with **500 µl** aqua bidest. Allow the vial content to solve for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle conversion to insure complete reconstitution. Reconstituted standard and control are **not stable.**

The solutions for the standard curve have to be prepared from the **MPO standard concentrate** (35 ng/ml = S1) in **1:2** dilution steps by adding sample dilution buffer (SAMPLEBUF) as follows:

**S1 (35 ng/ml)**

**250 µl S1 + 250 µl SAMPLEBUF = S2 (17.5 ng/ml)**

**250 µl S2 + 250 µl SAMPLEBUF = S3 (8.75 ng/ml)**

**250 µl S3 + 250 µl SAMPLEBUF = S4 (4.4 ng/ml)**

**250 µl S4 + 250 µl SAMPLEBUF = S5 (2.2 ng/ml)**

**Sample dilution buffer is used as standard 0 ng/ml.**

- The **conjugate** (CONJ) has to be diluted **1:500** in **wash buffer** (WASHBUF) (20 µl CONJ + 10 ml WASHBUF). The conjugate is stable at **2-8 °C** until expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C.**

## 6. SAMPLE PREPARATION

### *Dilution of samples*

#### **Serum/plasma 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.

Immundiagnostik AG recommends the use of serum samples for MPO determinations.

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.

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

**25 µl sample + 975 µl SAMPLEBUF.**

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*

The assay utilizes the two-site “sandwich” technique with two selected polyclonal antibodies that 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*

<p>Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well.</p>
<p>Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (Standards/samples/Control) on a protocol sheet</p>
<p>Take the required microtiter strips out of the kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label</p>
<p>Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper</p>
<p>Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective wells. Use sample dilution buffer as STD 0 ng/ml.</p>
<p>Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer</p>
<p>Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper</p>
<p>Add 100 µl CONJ (Conjugate) into each well</p>

Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer

Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper

Add 100 µl of SUB (Substrate) into each well

Incubate for 20 - 30 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark\*

Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly

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 to observe the procedure of the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

## 8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

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

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

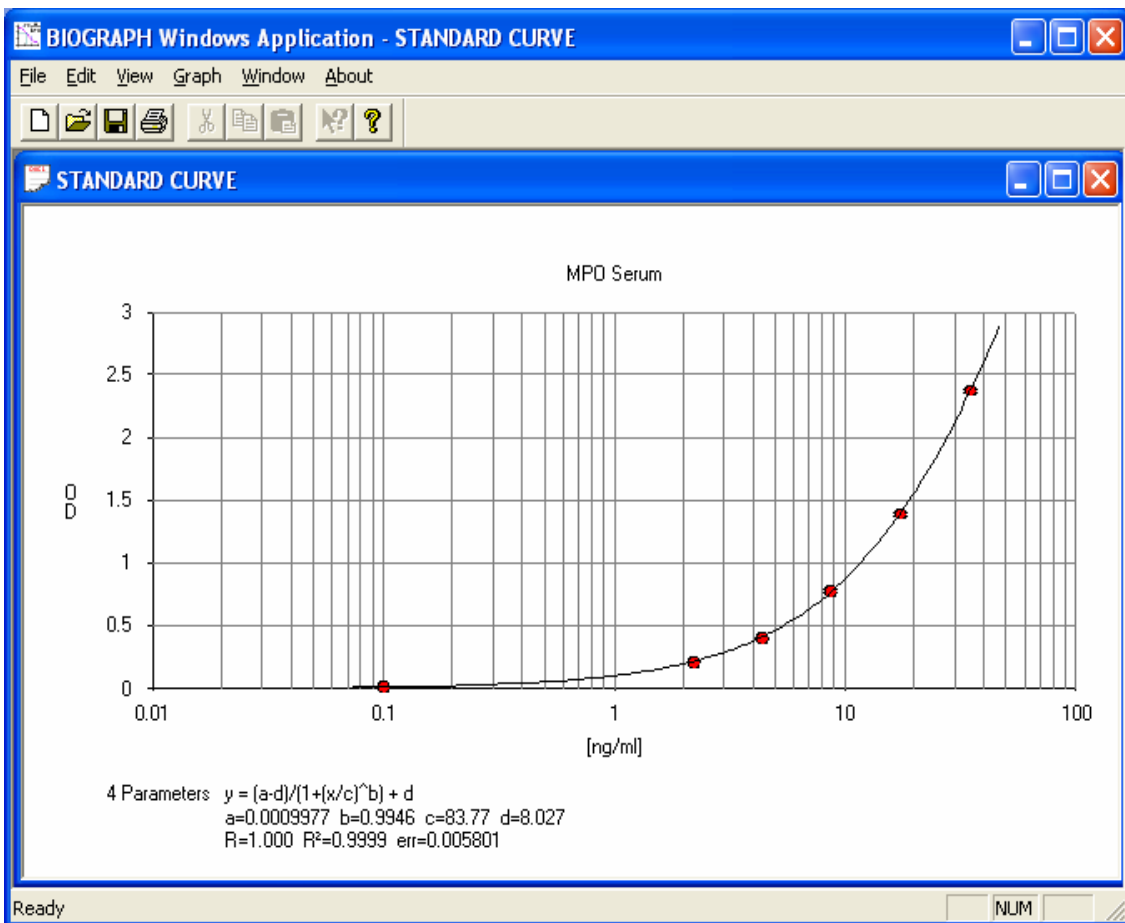
The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

### Serum/plasma samples

For the calculation of the MPO concentration in **serum** samples the result has to be multiplied by **40**.

For the calculation of the MPO concentration in **plasma** samples the result has to be multiplied by **10**.

## Typical calibration curve



STD	OD1	OD2	mean OD	CV (%)	Conc. [ng/ml]
1	0.013	0.013	0.013	-	0
2	0.207	0.209	0.208	0.7	2.2
3	0.398	0.405	0.401	1.2	4.4
4	0.785	0.774	0.780	1.0	8.75
5	1.404	1.380	1.392	1.2	17.5
6	2.389	2.361	2.375	0.8	35

The data is for demonstration only and cannot be used for the evaluation of the test results.

## 9. LIMITATIONS

Serum/plasma with MPO levels greater than the highest standard value should be diluted with sample dilution buffer and re-assayed.

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

Control samples should be analyzed 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 sample may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

### *Expected values*

#### **Normal ranges**

MPO in Serum (n = 42):                      mean 340 ng/ml (SD 176.7)

MPO in EDTA-Plasma (n = 41):            mean 98.3 ng/ml (SD 62.9)

Based on Immundiagnostik AG studies of evidently healthy persons a mean value was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

Intra-Assay (n=20)		
Probe	MPO [ng/ml]	Vk [%]
1	147.1	4.3
2	288.6	4.8

Inter-Assay (n=20)		
Probe	MPO [ng/ml]	Vk [%]
1	171.7	12
2	239.9	15

### *Recovery*

2 samples were spiked with 3 different MPO standards and measured using this assay.

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	MPO expected [ng/ml]	MPO measured [ng/ml]
116	320	436	401
116	200	316	336
116	125	241	254
92	320	412	388
92	200	292	297
92	125	217	204

### *Sensitivity*

The sensitivity was set as  $B_0 + 2SD$ . The zero-standard was measured 20 times.

Sample	MPO mean value [OD]	Standard variation (SD)	Detection limit [ng/ml]
1	0.013	0.003	1.6

### *Linearity*

Two patient samples were diluted with sample dilution buffer and analyzed. The results are shown below:

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
A	1:40	14.5	14.5
	1:80	7.2	7.1
	1:160	3.6	3.5
B	1:40	19.5	19.5
	1:80	9.75	10.1
	1:160	4.8	5.2

### *Cross reactivity*

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

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

No cross reactivity with MPO in mouse serum was observed.

## 12. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be observed.
- Human material used in the kit components was 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.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulphuric acid, a strong acid. Even diluted, it still has to be handled with care. It can cause acid 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.

## 13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the 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.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

## 14. 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.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- 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 this.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

## 15. REFERENCES

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