

# MPO ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung von Myeloperoxidase (MPO) in Stuhl  
und Urin*

*For the in vitro determination of Myeloperoxidase (MPO) in stool  
and urine*

Gültig ab/valid from 07.02.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 6630

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C

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



Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of contents	2
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>4</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>5</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>6</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMABNAHMEN</b>	<b>7</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>7</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>8</b>
HINWEISE	8
PIPETTIERSCHEMA	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	13
LINEARITÄT	14
KREUZREAKTIVITÄT	14
<b>14. LITERATUR</b>	<b>14</b>
<b>15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>15</b>

<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>
<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
SAMPLE DILUTION	27
CROSS REACTIVITY	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 **Myeloperoxidase (MPO)** aus Urin und Stuhl geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

**MPO** ist Teil des Abwehrmechanismus der polymorphnuklearen 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. Wenn sich der Fremdkörper in einer Vakuole befindet, werden verschiedene Stoffe zur intravesikulären Verdauung eingesetzt. Dazu zählen **MPO**, kationische Proteine, Lysozyme, Lactoferrin und einige saure Hydrolasen. Es findet ein starker Schub des oxidativen Stoffwechsels 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 in erhöhtem Maß, 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  $H_2O_2$  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 Stoffwechschel Schub in stärkerem Maß gebildet wird oder durch die angegriffenen Mikroorganismen freigesetzt wird. Als benötigtes Halogen dient Chlorid, das in den Leukozyten in ausreichender Menge vorhanden ist. Jod ist etwa 100-fach effektiver aber nur in geringen Konzentrationen im Serum. Es kann durch jodierte Hormone, Thyroxin und Triiodthyronin, ersetzt werden. Sie werden während der Phagozytose durch die Leukozyten dejodiert.

Das **MPO-System** wird durch Katalase, überschüssiges  $H_2O_2$  und einige andere Reduktionsmittel (z.B. Ascorbinsäure, Glutathion) inhibiert. Fehlen diese Stoffe, so kann das **MPO-System** im extrazellulären Raum auch andere Zellen angreifen. Dazu gehören Spermatozyten, Erythrozyten, Leukozyten und Tumorzellen. Die Wirkungsweise des Systems beruht auf der Halogenierung von Proteinen und der Erzeugung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff. **MPO** wird von den neutrophilen Granulozyten eingesetzt, um Chloridionen mittels  $H_2O_2$  zu oxidieren. Die resultierende hypochlorige Säure ist ebenfalls ein starkes antibakterielles Agens.

Untersuchungen an Patienten mit „inflammatory bowel disease“ zeigen eine Erhöhung des MPO-Gehalts im Stuhl in Abhängigkeit vom Entzündungsstadium.

### **Indikationen**

- Marker für Entzündungsaktivitäten im gastrointestinalen Bereich (Stuhl)
- Nierentransplantatabstoßung (Urin)
- Oxidativer Streß (Serum)
- Zur Differenzierung von allergischem und infektbedingtem Asthma (Bronchiallavage, Atemluftkondensat, Sputum)

### **3. TESTPRINZIP**

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung von MPO aus Stuhl und Urin. In diesem ELISA wird die MPO aus den Proben an Antikörper gebunden, welche an die Mikrotiterplatte fixiert sind. Die Quantifizierung des gebundenen MPO erfolgt nach einem Waschvorgang durch ein Antikörper-Peroxidase/TMB-System. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Eine Standardkurve wird erstellt, aus der die Konzentrationen ermittelt werden.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
K 6630MTP	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 6630WP	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 6630ST	Standards, lyophilisiert (Konzentrationsangabe der Spezifikation entnehmen)	4 x 5 vials
K 6630KO	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6630A2	Detektionsantikörper (monoklonaler Maus anti-MPO, biotinyliert), Konzentrat	1 x 200 µl
K 6630K	Konjugat (Streptavidin Peroxidase markiert), Konzentrat	1 x 200 µl
K 6630PV	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 6630TMB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6630AC	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

#### 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Die Komponenten sind in **unverdünntem** Zustand bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünnte Komponenten können **nicht** aufbewahrt werden. Bei Mehrfachansatz der Platte ist bitte darauf zu achten, daß die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert werden und nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt 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 (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua dest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur auf. Das **Waschpufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Waschpufferlösung** ist bei **2-8 °C 1 Monat** (in einem geschlossenen Gefäß) haltbar.
- Die lyophilisierten **Standards** und **Kontrollen** sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Standards und Kontrolle werden mit **500 µl** aqua dest. rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards und Kontrollen **können nicht gelagert werden**.
- Der **Detektionsantikörper** (AB) wird **1:101** in **Waschpufferpuffer** (WASHBUF) verdünnt (100 µl AB + 10 ml WASHBUF pipettieren). Der **unverdünnte Antikörper** ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Antikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden**.
- Das **Konjugat** (CONJ) wird **1:101** in **Waschpuffer** (WASHBUF) verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml WASHBUF). Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle Testreagenzien sind bei 2-8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (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** des 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 Eppendorfszentrifuge bei 13000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der erhaltene Überstand ist bei  $-20^{\circ}C$  für ca. einen Monat haltbar.

Der Überstand wird vor jedem Testansatz für **2 Minuten** bei 13000 rpm in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert und anschließend 1:10 mit dem Waschpuffer weiterverdünnt (z.B. 100  $\mu$ l Überstand + 900  $\mu$ l Waschpuffer pipettieren). Von dieser Endverdünnung werden dann **100  $\mu$ l** in den Test eingesetzt.

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

### Urin

Urin sollte bei  $-20^{\circ}C$  gelagert werden. Für den Einsatz im Assay wird Urin **1:10** mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. (100  $\mu$ l Urin + 900  $\mu$ l Verdünnungspuffer)

## 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 abzarbeiten.

### *Pipettierschema*

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

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

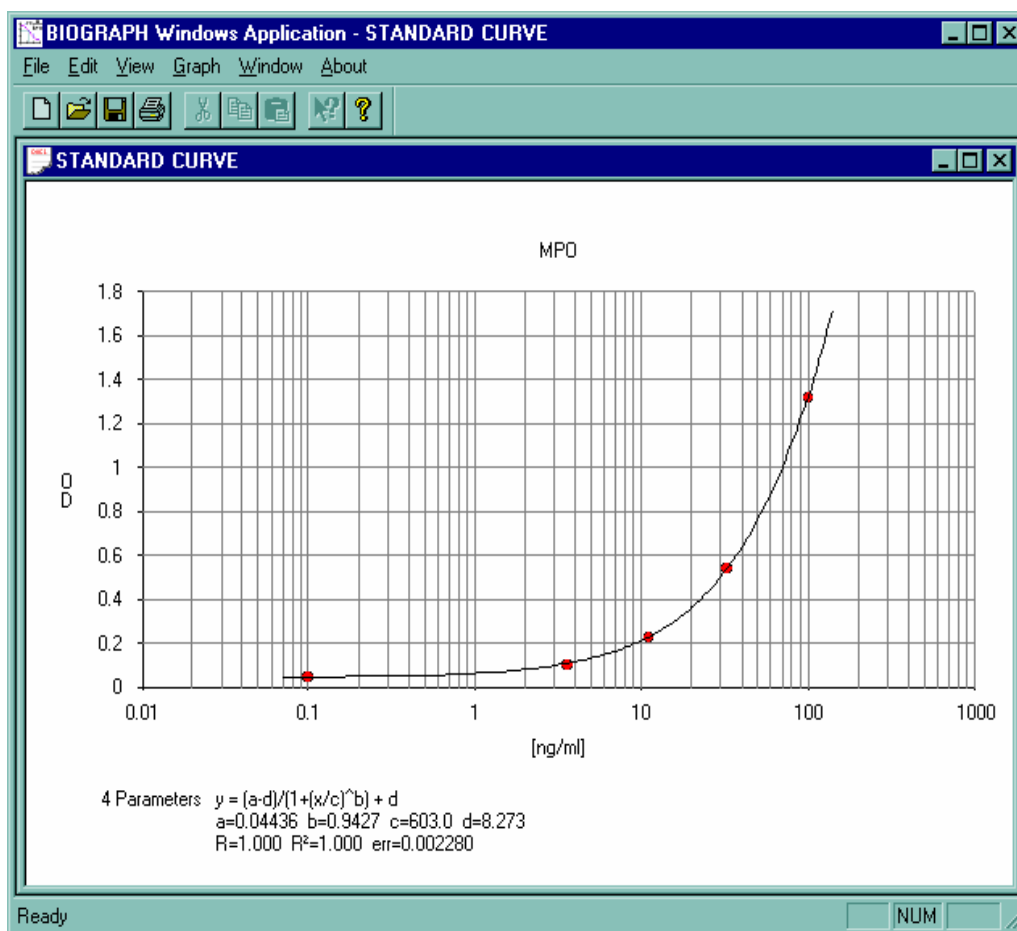
1. **100 µl** Standards, Kontrollen und Patientenproben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. Inhalt der Platte verwerfen, die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschwasser waschen.
4. **100 µl** des Biotin-markierten Antikörpers pro Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Inhalt der Platte verwerfen, die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschwasser waschen.
7. **100 µl** des Peroxidase-markierten Antikörper (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
8. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.

9. Inhalt der Platte verwerfen, die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen.
10. **100 µl** TMB-Substratlösung zugeben.
11. **5 - 15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis eine ausreichend große Farbdifferenz auftritt.
12. **50 µl** Stopplösung zusetzen und kurz mischen.
13. 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 Tests 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]	100	33	11	3.6	0
OD Mittelwert	1.322	0.543	0.232	0.106	0.048

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

### Stuhlproben:

Die ermittelte MPO Konzentration der Stuhlprobe wird wie im folgendem Beispiel berechnet:

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

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

Verdünnungsstufe 2: 10

Verdünnungsfaktor: 62,5 x 10 = 625

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **625** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln. **Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.**

### Urinproben

Die ermittelte Urinkonzentration wird mit **10** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

## 11. EINSCHRÄNKUNGEN

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

## 12. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen die Kontrollen oder Stuhl/Urin 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:

Normwert (Stuhl): < 2000 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 zwei Proben wurden 20 mal in einem MPO ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 20

Probe	MPO Mittelwert [ng/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	147.1	4.3
2	288.6	4.8

#### Inter-Assay-Variation

Es wird die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen geprüft. Zwei Proben wurden an verschiedenen Tagen und verschiedenen Personen im MPO ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 20

Probe	MPO Mittelwert [ng/ml]	Inter-Assay Vk [%]
1	171.7	12
2	239.9	15

### Wiederfindung

Verschiedene MPO Proben wurden mit unterschiedlichen Spikes gemessen.

Wiederfindung n=4

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	MPO erwartet [ng/ml]	MPO Gemessen [ng/ml]
116	500	616	514
116	320	436	401
116	200	316	336
116	125	241	254
92	500	592	504
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]	Standardabweichung	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0.013	0.003	1.6

## Linearität

n= 2

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 Stuhl gefunden:

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

## 14. LITERATUR

1. Saiki T et al.: 1998; Kurume Med. J. 45, 69

## 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 wurden, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden 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.

07.10.2005 07022005\_MPO\_stuhl.DOC

/Manual

# MPO ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung von Myeloperoxidase (MPO) in Stuhl  
und Urin*

•  
*For the in vitro determination of Myeloperoxidase (MPO) in stool  
and urine*

Gültig ab/valid from 07.02.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 6630

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 **Myeloperoxidase** in urine and stool, designed to be also suitable for small series of specimen. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The granules of neutrophils (approx. 70% of the white blood cells) contain a large number of different enzymes. **Myeloperoxidase** (MPO) catalyzes the oxidation of substances through  $H_2O_2$ . The **MPO**  $H_2O_2$ -system has a toxic effect on many micro-organisms such as bacteria, fungi, viruses and mycoplasma. The efficiency of the bacteria-destructive Myeloperoxidase  $H_2O_2$ -system is increased by PMN-Elastase. **MPO** determination in the stool reflects the inflammatory activity of Crohn's disease or ulcerative colitis.

### Indication

- Marker for inflammatory activities in the gastrointestinal tract
- Renal transplant rejection
- Oxidative stress
- For the differentiation between allergic and infectious asthma

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is suitable for the quantitative determination of Myeloperoxidase in urine and stool. In a first incubation step, the Myeloperoxidase in the samples is bound to an available excess of antibodies against Myeloperoxidase, which are immobilised to the surface of the microtitre plates. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a Peroxidase-labelled antibody against MPO is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, Tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stop solution is then added to stop the reaction. The color converts 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) vs. concentration is generated, using results obtained from the calibrators. MPO, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

#### 4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Kit Components	Quantity
K 6630MTP	one holder with precoated strips	96
K 6630WP	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 6630ST	Standarts, lyophilized (see specification for range)	4 x 5 vials
K 6630KO	Control, lyophilized (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6630A2	Detection antibody, (mouse monoclonal anti-MPO antibody, biotinylized), concentrate	1 x 200 µl
K 6630K	Conjugate, (streptavidin peroxidase labeled), concentrate	1 x 200 µl
K 6630PV	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 50 ml
K 6630TMB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 6630AC	ELISA stop solution, ready to use	1 x 7 ml

#### 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water
- Precision pipettes calibrated to deliver 10-100 µl
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Horizontal mixer
- Vortex
- Microplate reader 450 nm

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- The **ELISA wash buffer concentrate** should be diluted with aqua dest. **1:10** before use (add 900 ml a. dest. to 100 ml concentrate). Crystals may be formed due to high salt concentration. The crystals have to be dissolved **before dilution of the buffer solutions** using a water bath (37°C). The buffer concentrates are stable at 2-8°C up to the expiry date stated on the label. Diluted solutions can be stored at 2-8°C for 1 month.
- The **standards and controls** have to be reconstituted with **500 µl** aqua dest. Allow the vial to stand for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle conversion to insure complete reconstitution. Reconstituted standards and controls are **not stable**.
- The **detection antibody (AB)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (WASHBUF) (100 µl AB + 10 ml WASHBUF). The antibody is stable at 2-8 °C until expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and could not be stored.**
- The **conjugate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (WASHBUF) (100 µl CONJ and 10 ml WASHBUF). The antibody is stable at 2-8 °C until expiry date given on the label. **Diluted conjugate is not stable and could 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. The antibody coated microtitre plate should be stored dry and dark 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. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- The stop Solution consists diluted sulfuric 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 out immediately with copious quantities of water. Do not breath vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### Faeces

Give about **100 mg** of the sample (please note the real weight for the calculation) to **5 ml** of the wash 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 **1:10** in wash buffer (100 µl supernatant is added to 900 µl wash 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.

### Urine

Urine have to stored at -20°C. For assay use dilute the urine samples **1:10** in sample dilution buffer (100µl urine in 900µl sample dilution buffer).

## 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 responsible for any damage.
- 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** standard, control and prediluted patient samples.
2. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
3. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer.
4. Add **100 µl** of biotin-labelled detection antibody solution.
5. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
6. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer.
7. Add **100 µl** of Peroxidase-labelled antibody conjugate solution.
8. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
9. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer.

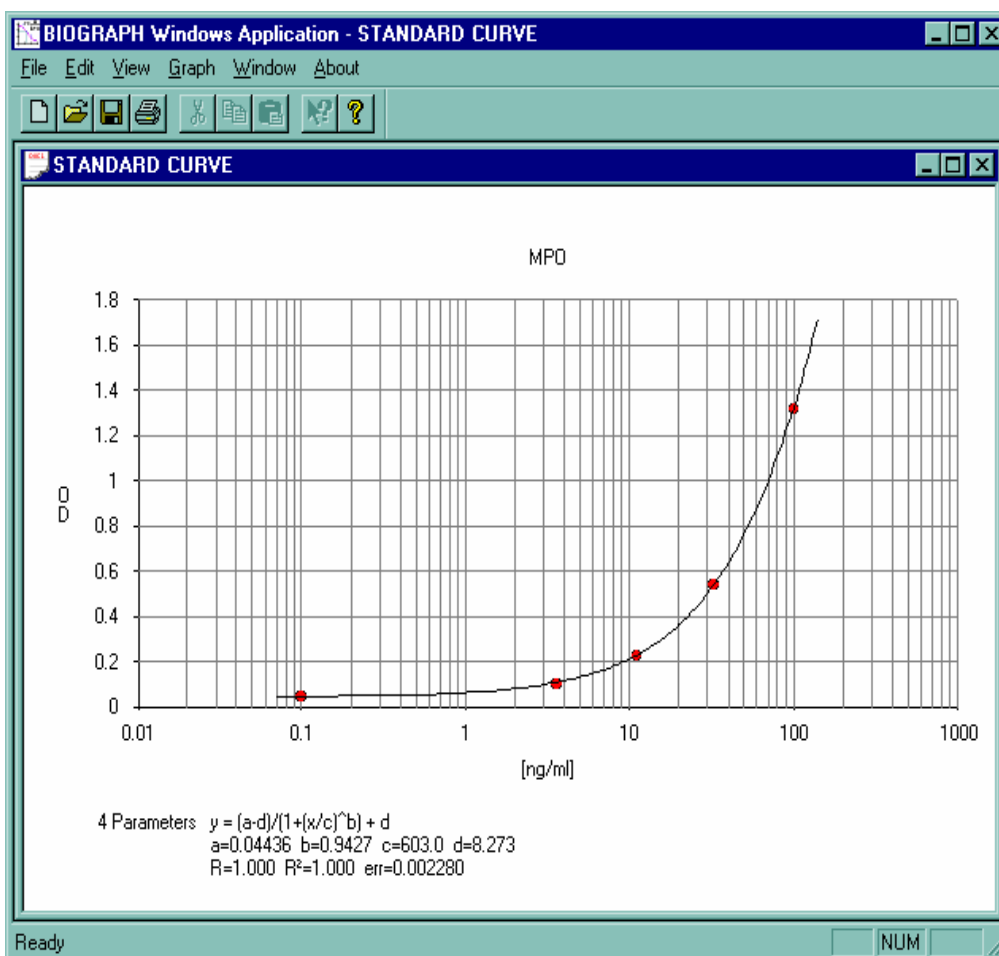
10. Add **100 µl** of substrate solution (TMB substrate solution).
11. Incubate for **5-15** minutes at room temperature until colour differences are sufficient.
12. Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly.
13. Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 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.

## 10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the calibrators measured in the assay. 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]	100	33	11	3.6	0
OD mean value	1.322	0.543	0.232	0.106	0.048

These data are for demonstration only and cannot be used instead of data obtained from the actual assay.

## Faeces

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

Amount of sample: 80 mg (1ml stool = 1g) = 0,08 ml

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

Dilution step 2: 10

Dilutionfactor: 62,5 x 10 = 625

The from the calibration curve calculated MPO concentration have to be multiplied by **625** to get the right concentration. **Caution: the multiplication factor is dependend on the amount of stool, one use at the beginning.**

## Urine samples:

The from the calibration curve calculated MPO concentration have to be multiplied by **10** to get the right concentration.

## 11. LIMITATIONS

Samples with Myeloperoxidase 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 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*

Myeloperoxidase concentration

Stool: < 2000 ng/g

These normal ranges should be used as a guideline only. It is recommended that each laboratory establishes an own expected range for its patient population.

### 13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

#### *Precision and reproducibility*

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

Intra-Assay CV n= 20

Sample	MPO mean value [ng/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	147.1	4.3
2	288.6	4.8

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik MPO 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	MPO mean value [ng/ml]	Inter-Assay CV [%]
1	171.7	12
2	239.9	15

*Recovery*

Two samples were spiked with MPO and measured with this assay.

Recovery n=2

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	MPO expected [ng/ml]	MPO measured [ng/ml]
116	500	616	514
116	320	436	401
116	200	316	336
116	125	241	254
92	500	592	504
92	320	412	388
92	200	292	297
92	125	217	204

*Sensitivity*

n=20

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

### Sample dilution

Linearity n= 2

Two patient serum samples were diluted with wash buffer. 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 to other plasma proteins in stool.

Alpha-1-Antitrypsin 0 %

Albumin 0 %

CRP 0 %

Lysozyme 0 %

slgA 0 %

PMN-Elastase 0 %

Calprotectin 0 %

## 14. REFERENCES

1. Saiki T et al.: 1998; Kurume Med. J. 45, 69

## 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 HBV 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 have been defined by the producer. Any alterations 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 responsible for any damage.