

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



# PMN Elastase ELISA



**DEH3311**



**96**



Demeditec Diagnostics GmbH  
Lise-Meitner-Strasse 2  
24145 Kiel – Germany  
[www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

**CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS**

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1  | Introduction .....                            | 3  |
| 2  | Principle .....                               | 3  |
| 3  | Warnings and Precautions .....                | 4  |
| 4  | Reagents .....                                | 5  |
| 5  | Specimen Collection and Preparation .....     | 6  |
| 6  | Assay Procedure .....                         | 7  |
| 7  | Expected Normal Values .....                  | 8  |
| 8  | Quality Control .....                         | 9  |
| 9  | Performance Characteristics .....             | 9  |
| 10 | Limitations of Procedure .....                | 12 |
| 11 | Legal Aspects .....                           | 13 |
| 12 | Revision History of Instruction for use ..... | 13 |
| 13 | References .....                              | 14 |
| 14 | Short Instruction .....                       | 15 |
|    |   |    |
| 1  | Einleitung .....                              | 16 |
| 2  | Testprinzip .....                             | 16 |
| 3  | Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen .....     | 17 |
| 4  | Bestandteile des Kits .....                   | 18 |
| 5  | Probenentnahme und -vorbereitung .....        | 19 |
| 6  | Testdurchführung .....                        | 20 |
| 7  | Erwartete Werte .....                         | 22 |
| 8  | Qualitätskontrolle .....                      | 22 |
| 9  | Testcharakteristika .....                     | 23 |
| 10 | Grenzen des Tests .....                       | 26 |
| 11 | Rechtliche Grundlagen .....                   | 26 |
| 12 | Änderungshistorie der Arbeitsanleitung .....  | 27 |
| 13 | Literatur .....                               | 28 |
| 14 | Kurzanleitung .....                           | 29 |

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended use

The Demeditec PMN Elastase ELISA is an enzyme immunoassay for the quantitative determination of the complex of PMN Elastase and the  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) in human EDTA or citrated plasma and seminal plasma. The assay is intended for *in-vitro* diagnostic use by professional users only. All therapeutic consequences must take not only the test result but always also all clinical and laboratory diagnostic results into account. The laboratory values themselves must never be the sole reason for therapeutic consequences derived from them.

Manual processing is validated. The usage of laboratory automates is the user's sole responsibility. The kit is intended for single use only.

### 1.2 Description of the analyte

The human organism reacts with an inflammatory response to attacks of invading pathogens (microorganisms and viruses) or damaged tissue (after accidents or surgery). Polymorphonuclear (PMN) granulocytes play an important role as primary defense cells in this inflammatory reaction. Different blood-stream mediators (cytokines, leukotrienes, complement factors, bacterial endotoxins, clotting, and fibrinolysis factors) attract and stimulate these cells to phagocytose and destroy not naturally occurring agents.

PMN granulocytes use proteinases to digest these agents and tissue debris. One of these proteinases is PMN Elastase, which is localized in the azurophilic granules of the PMN granulocytes. During phagocytosis of foreign substances, these enzymes are also partially excreted into the extracellular surrounding, where the activity of PMN Elastase is regulated by inhibitors (esp. the  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor,  $\alpha_1$ -PI). An overwhelming release of PMN Elastase, however, can exceed the inhibitory potential of the  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor. Thus, enzymatically active PMN Elastase, together with simultaneously produced oxidants ( $O_2$ -radicals,  $H_2O_2$ , OH-radicals, etc.), can cause local tissue injury.

Due to the bloodstream and lymphatic system,  $\alpha_1$ -PI is delivered subsequently and eventually able to form a complex with all excreted PMN Elastase. Therefore, the concentration of the PMN Elastase/ $\alpha_1$ -PI complex correlates with the released PMN Elastase and can be used as a measure for the activity of granulocytes during an inflammatory response.

Primarily, determinations of PMN Elastase find its application as an adjunct in the diagnostics and observation of the course of trauma, shock and sepsis (1-3). Further indications are the areas of hemodialysis, infections by obstetrics, joint diseases, intestinal affection and pancreatitis (8-13). The determination of PMN Elastase in seminal plasma can be used as an adjunct in the diagnostics of male adnex affections (5-7).

## 2 PRINCIPLE

The test kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the microplate format, designed for the quantitative measurement of the complex of human PMN Elastase and  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) in blood plasma and seminal plasma.

The microplate is coated with a polyclonal antibody directed against human PMN Elastase (antigen). Calibrators, controls and patient samples are pipetted into the antibody-coated microplate. During a 60 minutes incubation, antigens present in the sample bind to the antibodies fixed on the inner surface of the wells. Non-reactive sample components are removed by a washing step.

Afterwards, a second polyclonal antibody directed against  $\alpha_1$ -PI, which is labeled with horseradish peroxidase (enzyme conjugate), is added. During a 60 minutes incubation, the PMN Elastase/ $\alpha_1$ -PI complex bound to the first antibody is specifically recognized by the enzyme-labeled second antibodies, and a sandwich complex is formed. Excess of enzyme conjugate is washed out.

A chromogenic substrate, TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), is added. During a 30 minutes incubation, the substrate is converted to a colored endproduct (blue) by the fixed enzyme. Enzyme reaction is stopped by dispensing of hydrochloric acid as stop solution (change from blue to yellow). The color intensity is directly proportional to the concentration of PMN Elastase present in the sample. The optical density of the color solution is measured with a microtiter plate reader at 450 nm.

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for *in-vitro* diagnostic use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibodies to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents must be handled in the same manner as potentially infectious material.
4. The microtiter plate contains break apart strips. Unused wells must be stored at 2-8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing substrate solution that had previously been used for conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microtiter plate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the washing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable protective gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may be slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, CMIT and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
20. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH or on Demeditec homepage ([www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)).
21. All serious incidents occurring in relation to products made available on the EU market in accordance with Article 2(61) of Regulation (EU) 2017/746 shall be notified to the manufacturer and to the competent authority of the Member State where the user or patient is established in accordance with Article 82 of Regulation (EU) 2017/746.
22. If product information, including labeling, is incorrect or inaccurate, please contact the kit manufacturer or supplier.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **SORB MT Microtiter plate**, 12x8 (break-apart) strips, 96 wells.  
Wells coated with polyclonal antibodies against PMN Elastase.
2. **CAL LYO PMN Elastase Master Calibrator**, 1 vial (20 ng), lyophilized;  
in plasma/buffer matrix containing PMN Elastase/ $\alpha$ 1-PI complex  
For reconstitution and concentrations, see "Preparation of Reagents" (4.4).
3. **CONTROL 1-2 LYO PMN Elastase Controls** in plasma/buffer matrix, 2 vials, lyophilized.  
For control values and ranges please refer to QC-Datasheet.  
For reconstitution, see "Preparation of Reagents" (4.4).
4. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate**, 1 vial, 16 ml, ready to use; Enzyme-labeled anti- $\alpha$ 1-PI antibody,  
containing polyclonal antibodies labeled with horseradish peroxidase.
5. **SAM DIL Calibrator/Sample Diluent**, 1 vial, 50 ml, ready to use.
6. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, ready to use; Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 vial, 7 ml, ready to use; contains 2 N hydrochloric acid.  
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **WASH SOLN 10x Wash Solution**, 1 vial, 50 ml (10x concentrated); see "Preparation of Reagents" (4.4).

### 4.2 Materials required but not provided

- Microtiter plate photometer with optical filter for 450 nm
- Polypropylene tubes
- Vortex mixer
- Microtiter plate shaker operating at 900 rpm
- deionized water
- Manual or automatic equipment for microtiter plate washing
- Absorbent paper
- Timing device
- Calibrated variable micropipettes and multichannel pipettes with disposable pipette tips
- Semilogarithmic paper or software for data processing

### 4.3 Storage conditions

When stored at 2-8°C unopened reagents will be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2-8°C. After first opening, the reagents are stable for 30 days if performed and stored properly. Keep reagents away from heat and direct sunlight.

The Wash Solution is stable for 12 weeks at room temperature (18-25°C) after dilution.

Store Calibrators and Controls at 2-8°C for 7 days or at  $\leq$ -20 °C (in aliquots) for 30 days after reconstitution. Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Protect TMB Substrate Solution from light.

### 4.4 Preparation of reagents

#### PMN Elastase Master Calibrator:

Reconstitute lyophilized **Master Calibrator** with **2 ml Calibrator/Sample Diluent** 30 minutes before use (final concentration of 10 ng/ml). Make a dilution series with **Calibrator/Sample Diluent** to get calibrators with 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, and 0.16 ng/ml, respectively.

Label six polypropylene tubes: G (5 ng/ml), F (2.5 ng/ml), E (1.25 ng/ml), D (0.63 ng/ml), C (0.31 ng/ml), and B (0.16 ng/ml). The reconstituted **PMN Elastase Master Calibrator** will serve as the highest calibrator H (10 ng/ml). Use the **Calibrator/Sample Diluent** as the zero calibrator (A).

Pipet 0.5 ml of the **Calibrator/Sample Diluent** into all tubes (B-G). Pipet 0.5 ml of the **reconstituted PMN Elastase Master Calibrator** into tube G (5 ng/ml) and mix thoroughly. Transfer 0.5 ml from tube G (5 ng/ml) to tube F (2.5 ng/ml) and mix thoroughly. Repeat this process successively to complete the 2-fold dilution series.

#### PMN Elastase Controls:

Reconstitute with **1 ml Calibrator/Sample Diluent** 30 minutes before use. The **PMN Elastase Controls** must not be diluted.

**Wash Solution:**

Dilute 50 ml of 10x concentrated Wash Solution with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml. The diluted Wash Solution is stable for at least 12 weeks at room temperature (18-25°C). Precipitates may form when stored at 2-8°C, which should dissolve again by swirling at room temperature (18-25°C). The Wash Solution should only be used when the precipitates have completely dissolved.

**4.5 Disposal of the kit**

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet.

**4.6 Damaged test kit**

In case of any severe damage of the test kit or components, Demeditec Diagnostics GmbH has to be informed in writing within one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

**5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION**

For determination of PMN Elastase EDTA or citrated plasma as well as seminal plasma are the preferred sample matrixes. It is important that the preanalytics are constant.

EDTA or citrated plasma: The usual precautions for venipuncture should be observed (14). It is important to preserve the chemical integrity of a blood specimen from the moment it is collected until it is assayed. Collect blood by venipuncture into vacutainers and separate plasma immediately from cells by centrifugation. Use plasma samples at the same day. For longer storage (up to 12 months), samples should be stored frozen at  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ . To avoid repeated thawing and freezing the samples must be aliquoted. Mix the samples before use.

Do not use hemolytic, icteric or lipemic specimens. Furthermore, we recommend special caution when using gel collection systems, as an influence on the measurement results cannot be excluded in case of improper handling. Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

Seminal plasma: Separate the sperm by centrifugation. Take the supernatant for the assays. Freeze the seminal plasma at  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  for longer storage up to 12 months. To avoid repeated thawing and freezing the samples must be aliquoted. Mix the samples before use.

Serum is not suitable, because during clotting PMN Elastase can be released *in vitro*.

**Dilution of samples:**

Dilute **EDTA or citrated plasma samples 1:100** with **Calibrator/Sample Diluent** immediately before assay. Therefore, 10  $\mu\text{l}$  of sample must be diluted with 990  $\mu\text{l}$  of **Calibrator/Sample Diluent** in a polypropylene tube. After mixing, use 100  $\mu\text{l}$ /well of this 1:100 diluted sample in the assay. Do not store the diluted sample for a longer time; it has to be used freshly.

**Please note:** The dilution factor 100 has to be taken into account for the calculation of the results.

Dilute **seminal plasma samples 1:200** with **Calibrator/Sample Diluent** immediately before assay. Therefore, 5  $\mu\text{l}$  of sample must be diluted with 995  $\mu\text{l}$  of **Calibrator/Sample Diluent** in a polypropylene tube. After mixing, use 100  $\mu\text{l}$ /well of this 1:200 diluted sample in the assay. Do not store the diluted sample for a longer time; it has to be used freshly.

**Please note:** The dilution factor 200 has to be taken into account for the calculation of the results.

Patient samples expected to contain higher PMN Elastase concentrations than the highest calibrator (10 ng/ml) should be further diluted with **Calibrator/Sample Diluent** prior to assaying. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results.

**6 ASSAY PROCEDURE**

**6.1 General remarks**

- Do not interchange components of different lots.
- All components of these test kits supplied as concentrate should be diluted to their final concentration at least 30 minutes prior to use. Mix well, but prevent foam formation.
- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18-25°C) before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross-contamination.
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all samples are diluted, reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Respect the incubation times as stated in this instructions for use.
- Calibrators, controls and samples should at least be assayed in duplicates.
- Microtiter plate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or a multistepper, respectively, or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow the wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing, check that all wells are filled precisely with Wash Solution, and that there are no residues in the wells.
- A calibrator curve must be established for every test run.

**6.2 Assay procedure**

**1. Preparation of Calibrators (see chapter 4.4):**

Label six tubes: G (5 ng/ml), F (2.5 ng/ml), E (1.25 ng/ml), D (0.63 ng/ml), C (0.31 ng/ml), and B (0.16 ng/ml). Pipet **0.5 ml** of the **Calibrator/Sample Diluent** into all tubes (G-B). Pipet **0.5 ml** of the **reconstituted PMN Elastase Master Calibrator** into tube G (5 ng/ml) and mix thoroughly. Transfer 0.5 ml from tube G (5 ng/ml) to tube F (2.5 ng/ml) and mix thoroughly. Repeat this process successively to complete the 2-fold dilution series. The reconstituted PMN Elastase Master Calibrator will serve as the highest calibrator H (10 ng/ml). Use the PMN Elastase Calibrator/Sample Diluent as the zero calibrator A (0 ng/ml).

2. Dilute **EDTA or citrate plasma samples 1:100** and **seminal plasma samples 1:200, respectively**, with **Calibrator/Sample Diluent** in a polypropylene tube prior to assaying as described in chapter 5. Reconstituted PMN Elastase Controls 1-2 must **not** be diluted.
3. Prepare a sufficient number of microplate wells to accommodate Calibrators, Controls and prediluted patient samples in duplicates.

|   | 1 | 2 | 3  | 4   | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|----|-----|---|---|---|---|---|----|----|----|
| a | A | E | C1 | P.. |   |   |   |   |   |    |    |    |
| b | A | E | C1 | P.. |   |   |   |   |   |    |    |    |
| c | B | F | C2 |     |   |   |   |   |   |    |    |    |
| d | B | F | C2 |     |   |   |   |   |   |    |    |    |
| e | C | G | P1 |     |   |   |   |   |   |    |    |    |
| f | C | G | P1 |     |   |   |   |   |   |    |    |    |
| g | D | H | P2 |     |   |   |   |   |   |    |    |    |
| h | D | H | P2 |     |   |   |   |   |   |    |    |    |

4. For determination of PMN Elastase pipet **100 µl** of **Calibrators, Controls and prediluted patient samples** with **new disposable tips** into the wells according to the template.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18-25°C) on a plate mixer (900 rpm).
6. Decant the content of the wells and wash **4 times** with **300 µl Wash Solution**. Remove as much Wash Solution as possible by beating the microplate carefully on absorbent paper.
7. Pipet **150 µl of Enzyme Conjugate** into each well.
8. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18-25°C) on a plate mixer (900 rpm).
9. Again, decant the content of all wells and wash **4 times** with **300 µl Wash Solution**. Remove as much wash solution as possible by beating the microplate carefully on absorbent paper.
10. Dispense **200 µl** of **TMB Substrate Solution** into each well.
11. Incubate for **30 minutes** at room temperature (18-25°C) in the dark without shaking.
12. Add **50 µl** of **Stop Solution** to each well and mix carefully.
13. Determine the optical density of each well at 450 nm and read the wells within 15 minutes.

**6.3 Calculation of results**

1. Calculate the average optical density values for each set of Calibrators, Controls and samples.
2. The obtained optical density of the Calibrators (y-axis, linear) are plotted against their corresponding concentrations (x-axis, logarithmic) either on semilogarithmic paper or using an automated method.
3. Using the mean optical density value for each sample, determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the package insert have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The PMN Elastase concentration of the sample can be calculated by multiplication with the respective dilution factor (see chapter 5).
6. Samples with concentrations higher than the highest calibrator (10 ng/ml) have to be further diluted. For the calculation of the concentration, this dilution factor also has to be taken into account.

**6.4 Example of typical calibrator curve**

The figure below shows typical results for Demeditec PMN Elastase ELISA. These data are intended for illustration only and must not be used to calculate results from an other run.

| Calibrator   |            | Optical Density (450 nm) |
|--------------|------------|--------------------------|
| Calibrator A | 0 ng/ml    | 0.102                    |
| Calibrator B | 0.16 ng/ml | 0.229                    |
| Calibrator C | 0.31 ng/ml | 0.369                    |
| Calibrator D | 0.63 ng/ml | 0.655                    |
| Calibrator E | 1.25 ng/ml | 1.143                    |
| Calibrator F | 2.5 ng/ml  | 1.784                    |
| Calibrator G | 5.0 ng/ml  | 2.513                    |
| Calibrator H | 10.0 ng/ml | 2.986                    |

**7 EXPECTED NORMAL VALUES**

The following values are observed with plasma and seminal plasma of apparently healthy adults with the Demeditec PMN Elastase ELISA:

|                       | n  | ng/ml       |        |                |                 |
|-----------------------|----|-------------|--------|----------------|-----------------|
|                       |    | Range       | Median | 2.5 percentile | 97.5 percentile |
| <b>citrate plasma</b> | 45 | 23.2 - 81.6 | 37.4   | 25.2           | 69.5            |
| <b>EDTA plasma</b>    | 45 | 19.5 - 55.3 | 32.4   | 22.4           | 48.7            |
| <b>seminal plasma</b> | 40 | 1.9 - 624.5 | 34.0   | 5.4            | 362.3           |

The results alone should not be the only reason for any diagnostic or therapeutical consequences. They have to be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually. It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of PMN Elastase. The reference ranges should be regarded as guidelines only.



## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day-to-day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results are stated in the QC certificate included in the kit. The values and ranges stated on the QC certificate always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results. It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analyzing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials, patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices, microtiter plate reader, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or Demeditec Diagnostics GmbH directly.

## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Analytical sensitivity

The lowest analytical detectable level of PMN Elastase that can be distinguished from the Zero Calibrator is 0.03 ng/ml at the 2SD confidence limit without taking any dilution factor into account.

### 9.2 Specificity

The Demeditec PMN Elastase ELISA specifically detects human PMN elastase/ $\alpha_1$ -PI complex.

### 9.3 Measurement range

Measurement range (from analytical sensitivity to highest calibrator): 0.03 to 10 ng/ml.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of EDTA / citrate plasma and seminal plasma within one run with Demeditec PMN Elastase ELISA. The intra-assay variability is shown below:

| EDTA plasma | n  | Mean (ng/ml) | CV (%) |
|-------------|----|--------------|--------|
| 1           | 20 | 287.5        | 9.9    |
| 2           | 20 | 26.3         | 6.2    |

| citrate plasma | n  | Mean (ng/ml) | CV (%) |
|----------------|----|--------------|--------|
| 1              | 20 | 51.6         | 9.1    |
| 2              | 20 | 107.2        | 3.4    |

| seminal plasma | n  | Mean (ng/ml) | CV (%) |
|----------------|----|--------------|--------|
| 1              | 20 | 231.7        | 3.0    |
| 2              | 20 | 546.1        | 2.8    |
| 3              | 20 | 169.0        | 2.0    |
| 4              | 20 | 61.7         | 2.7    |

**9.4.2 Inter-Assay**

The inter-assay (between-run) variation was determined by duplicate measurements of samples in at least ten different runs with Demeditec PMN Elastase ELISA.

| EDTA plasma | n  | Mean (ng/ml) | CV (%) |
|-------------|----|--------------|--------|
| 1           | 10 | 273.8        | 10.6   |
| 2           | 10 | 27.4         | 7.2    |

| citrate plasma | n  | Mean (ng/ml) | CV (%) |
|----------------|----|--------------|--------|
| 1              | 10 | 46.6         | 8.1    |
| 2              | 10 | 104.2        | 4.1    |

| seminal plasma | n  | Mean (ng/ml) | CV (%) |
|----------------|----|--------------|--------|
| 1              | 10 | 242.3        | 11.2   |
| 2              | 10 | 511.6        | 9.8    |
| 3              | 10 | 153.9        | 6.4    |
| 4              | 10 | 58.1         | 8.6    |

**9.5 Recovery**

Recovery was determined by adding increasing amounts of the analyte to different samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) was assayed with Demeditec PMN Elastase ELISA and analyte concentrations of the samples were calculated from the standard curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and observed values of the samples.

| EDTA plasma | Spiking (ng/ml) | Observed (ng/ml) | Expected (ng/ml) | Recovery (%) |
|-------------|-----------------|------------------|------------------|--------------|
| 1           | -               | 190.5            | -                | -            |
|             | + 50            | 242.4            | 240.5            | 101          |
|             | + 150           | 365.6            | 340.5            | 107          |
|             | + 300           | 576.3            | 490.5            | 117          |
| 2           | -               | 113.1            | -                | -            |
|             | + 50            | 174.3            | 163.1            | 107          |
|             | + 150           | 283.4            | 263.1            | 108          |
|             | + 300           | 475.7            | 413.1            | 115          |

| citrate plasma | Spiking (ng/ml) | Observed (ng/ml) | Expected (ng/ml) | Recovery (%) |
|----------------|-----------------|------------------|------------------|--------------|
| 1              | -               | 28.1             | -                | -            |
|                | + 50            | 77.7             | 78.1             | 99           |
|                | + 150           | 168.4            | 178.1            | 95           |
|                | + 300           | 338.8            | 328.1            | 103          |
| 2              | -               | 52.4             | -                | -            |
|                | + 50            | 109.4            | 102.4            | 107          |
|                | + 150           | 210.3            | 202.4            | 104          |
|                | + 300           | 375.4            | 352.4            | 107          |

| seminal plasma | Spiking (ng/ml) | Observed (ng/ml) | Expected (ng/ml) | Recovery (%) |
|----------------|-----------------|------------------|------------------|--------------|
| 1              | -               | 41.9             | -                | -            |
|                | + 50            | 94.6             | 91.9             | 103          |
|                | + 150           | 182.8            | 191.9            | 95           |
|                | + 300           | 322.3            | 341.9            | 94           |
| 2              | -               | 438.3            | -                | -            |
|                | + 50            | 612.4            | 488.3            | 125          |
|                | + 150           | 672.0            | 588.3            | 114          |
|                | + 300           | 760.4            | 738.3            | 103          |
| 3              | -               | 246.9            | -                | -            |
|                | + 50            | 305.7            | 296.9            | 103          |
|                | + 150           | 390.2            | 396.9            | 98           |
|                | + 300           | 528.8            | 546.9            | 97           |

### 9.6 Linearity

Plasma (EDTA, citrate) and seminal plasma containing different amounts of analyte were serially diluted with **Calibrator/Sample Diluent** and assayed with Demeditec PMN Elastase. The percentage linearity was calculated by comparing the expected and measured values.

| EDTA plasma | Dilution | Observed (ng/ml) | Expected (ng/ml) | Linearity (%) |
|-------------|----------|------------------|------------------|---------------|
| 1           | -        | 308.6            | -                | -             |
|             | 1 : 2    | 145.2            | 154.3            | 94            |
|             | 1 : 4    | 69.1             | 77.1             | 90            |
|             | 1 : 8    | 37.36            | 38.6             | 97            |
| 2           | -        | 172.9            | -                | -             |
|             | 1 : 2    | 88.5             | 86.5             | 102           |
|             | 1 : 4    | 45.2             | 43.2             | 105           |
|             | 1 : 8    | 23.8             | 21.6             | 110           |

| citrate plasma | Dilution | Observed (ng/ml) | Expected (ng/ml) | Linearity (%) |
|----------------|----------|------------------|------------------|---------------|
| 1              | -        | 107.9            | -                | -             |
|                | 1 : 2    | 57.5             | 54.0             | 107           |
|                | 1 : 4    | 31.8             | 27.0             | 118           |
|                | 1 : 8    | 17.2             | 13.5             | 128           |
| 2              | -        | 58.8             | -                | -             |
|                | 1 : 2    | 32.0             | 29.4             | 109           |
|                | 1 : 4    | 14.4             | 14.7             | 98            |
|                | 1 : 8    | 8.6              | 7.4              | 117           |

| seminal plasma | Dilution | Observed (ng/ml) | Expected (ng/ml) | Linearity (%) |
|----------------|----------|------------------|------------------|---------------|
| 1              | -        | 478.4            | -                | -             |
|                | 1 : 2    | 261.4            | 239.2            | 109           |
|                | 1 : 4    | 129.9            | 119.6            | 109           |
|                | 1 : 8    | 68.6             | 59.8             | 115           |
| 2              | -        | 412.5            | -                | -             |
|                | 1 : 2    | 229.3            | 206.3            | 111           |
|                | 1 : 4    | 116.5            | 103.1            | 113           |
|                | 1 : 8    | 63.2             | 51.6             | 123           |
| 3              | -        | 624.5            | -                | -             |
|                | 1 : 2    | 335.4            | 312.3            | 107           |
|                | 1 : 4    | 165.6            | 156.1            | 106           |
|                | 1 : 8    | 90.5             | 78.1             | 116           |

## 10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 10.1 Interfering substances

- Hemoglobin (up to 30 mg/dl), bilirubin (up to 40 mg/dl), and lipids (up to 30 mg/ml) show no significant influence on the assay results. However, we recommend not to use any hemolytic, icteric or lipemic specimens to avoid any interferences.
- Samples containing sodium azide should not be used in the assay.
- The result of any immunological test system may be affected by heterophilic antibodies, anti-species antibodies or rheumatoid factors present in human samples (15-17). For example, the presence of heterophilic antibodies in patients who are regularly exposed to animals or animal products may interfere with immunological tests. Therefore, interference with this *in-vitro* immunoassay cannot be excluded. If implausible results are suspected, they should be considered invalid and verified by further testing. For diagnostic purposes, results should always be considered only in conjunction with the patient's clinical picture and further diagnostic tests.

### 10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of PMN Elastase in samples. Any medication should be taken into account when assessing the results.

### 10.3 High Dose Hook Effect

High Dose Hook Effect is not detected in the range between 0-900 ng/ml, based on Calibrator range (0-10 ng/ml).

## 11 LEGAL ASPECTS

### 11.1 Reliability of results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover, the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include a sufficient number of controls within the test procedure for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls meet the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern, please contact Demeditec Diagnostics GmbH.

### 11.2 Therapeutic consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient therapeutic consequences should be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### 11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## 12 REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE

Changes from the previous version 6-01/22 to actual version 7-05/22

|             |   |
|-------------|---|
| Chapter 3   | updated headline                                    |
| Chapter 4.2 | polypropylen tubes added                            |
| Chapter 9   | revision of performance characteristics             |
| Chapter 10  | updated information of High Dose Hook Effect (10.3) |
| General     | editorial changes                                   |

**13 REFERENCES**

1. Jochum M., Machleidt, W., Neuhof, H., and Fritz, H.  
Proteinases. In: Schlag G, Redl H (eds), Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993: 46-60.
2. Jochum M., Machleidt, W., and Fritz, H.  
Proteolytic Enzyme Systems. In: Schlag G, Redl H (eds), Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993: 531-548.
3. Dittmer H., Jochum M. and Fritz H.  
Freisetzung von granulozytärer Elastase und Plasmaproteinveränderungen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock. Unfallchirurg (1986) 89: 160-169
4. Elastase, Elastase- $\alpha$ 1-Proteinase Inhibitor Complex  
In: Friedman, R.B., Young, D.S (Eds.), Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests  
AACC Press, Washington, 3<sup>rd</sup> Edition, 1997: 3-161
5. Reinhardt, A., Haidl, G., and Schill, W-B.  
Granulocyte elastase indicates silent male genital tract inflammation and appropriate anti-inflammatory treatment. Andrologia 29, 1996: 187 – 192
6. Wolff M.D. and Anderson D.J.  
Evaluation of granulocyte elastase as a seminal plasma marker for leukocytospermia. Fertility and Sterility, Vol. 50, No. 1, July 1988
7. Zorn B., Virant-Klun I., and Meden-Vrtovec H.  
Semen granulocyte elastase: its relevance for the diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation. Human Reproduction, Vol. 12 No. 9, pp. 1978-1984, 2000
8. Andus T., Gross V., Caesar I., Krumm D., Hosp J., Gerok W., and Schölmerich J.  
PMN-elastase in assessment of patients with inflammatory bowel disease  
Dig Dis Sci. 1993 Sep;38(9): 1638-44
9. Uhl W., Büchler M., Malfertheiner P., Martini Markus, Beger H.G.  
PMN-Elastase in comparison with CRP, Antiproteases, and LDH as indicators of necrosis in human acute pancreatitis. Pancreas: May 1991 – Volume 6 – Issue 3 – p 253-259
10. Domínguez-Munoz J.E., Villanueva A., Larino J. Mora T., Barreiro M., Iglesias-Canle J., Iglesias-García J.  
Accuracy of plasma levels of polymorphonuclear elastase as early prognostic marker of acute pancreatitis in routine clinical conditions; Eur J Gastroenterol Hepatol. 2006 Jan; 18(1):79:83
11. Peters K.M., Koeborg K., Rosendahl T., Haubeck H.D.  
PMN elastase in bone and joint infections. Comparative Study, Int. Orthop. 1994;18(6):352-5
12. Bánkowska E.M., Leibschang J., and Pawlowska A.  
Usefulness of determination of granulocyte elastase plasma level, c-reactive protein and white blood cell count in prediction in intrauterine infection in pregnant women after PROM  
Comparative Study, Ginekol. Pol, 2003, Oct., 74(10):1037-43
13. Hörl W.H., Steinhauer H.B., and Schollmeyer H.B.  
Plasma levels of granulocyte elastase during hemodialysis: Effects on different dialyzer membranes; Kidney International, Vol. 28 (1985), pp. 791-796
14. Lothar Thomas: Labor und Diagnose 2020
15. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries, Clinical Chemistry 2002, 48:11: 2008-2016
16. Tate J. & Ward G. (2004) Interferences in Immunoassays, Clin. Biochem Rev Vol 25, May 2004
17. Selby C. (1999): Interference in immunoassays; Ann. Clin. Biochem 1999, 36: 704-721

**14 SHORT INSTRUCTION**(all sample sizes given in  $\mu\text{l}$ )

| Well<br>Steps   | ng/ml                 | A   | B    | C    | D    | E    | F   | G   | H   | Control<br>1/2 | Sample |
|---|-----------------------|-----|------|------|------|------|-----|-----|-----|----------------|--------|
|   |                       | 0   | 0.16 | 0.31 | 0.63 | 1.25 | 2.5 | 5   | 10  |                |        |
|   | <b>Solution</b>       |     |      |      |      |      |     |     |     |                |        |
| Pipet   | Calibrator            | 100 | 100  | 100  | 100  | 100  | 100 | 100 | 100 | -              | -      |
| Pipet   | Control               | -   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   | 100            | -      |
| Pipet   | Prediluted<br>sample  | -   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   | -              | 100    |
| Incubate for <b>60 min</b><br>at RT (18-25°C) on a<br>plate mixer (900 rpm)         |                       |     |      |      |      |      |     |     |     |                |        |
| Decant<br>Wash <b>4x with 300 <math>\mu\text{l}</math></b><br>of Wash Solution      |                       |     |      |      |      |      |     |     |     |                |        |
| Pipet   | Enzyme<br>Conjugate   | 150 | 150  | 150  | 150  | 150  | 150 | 150 | 150 | 150            | 150    |
| Incubate for <b>60 min</b><br>at RT (18-25°C) on a<br>plate mixer (900 rpm)         |                       |     |      |      |      |      |     |     |     |                |        |
| Decant<br>Wash <b>4x with 300 <math>\mu\text{l}</math></b><br>of Wash Solution      |                       |     |      |      |      |      |     |     |     |                |        |
| Pipet   | Substrate<br>Solution | 200 | 200  | 200  | 200  | 200  | 200 | 200 | 200 | 200            | 200    |
| Incubate for <b>30 min</b> at<br>RT (18-25°C) without<br>shaking <b>in the dark</b> |                       |     |      |      |      |      |     |     |     |                |        |
| Pipet   | Stop<br>Solution      | 50  | 50   | 50   | 50   | 50   | 50  | 50  | 50  | 50             | 50     |
| Read at $\lambda = 450 \text{ nm}$  |                       |     |      |      |      |      |     |     |     |                |        |

For a detailed description of the procedure see also chapter 6.2.

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Zweckbestimmung

Der Demeditec PMN Elastase ELISA ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung des Komplexes von PMN Elastase und  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor in humanem EDTA- oder Citrat-Plasma und in Seminalplasma. Dieser Test ist nur für *in-vitro*-diagnostische Anwendungen durch geschultes Laborpersonal bestimmt. Das Testergebnis muss immer alle klinischen und labordiagnostischen Ergebnisse berücksichtigen. Die Laborwerte selbst dürfen niemals der alleinige Grund für daraus abgeleitete therapeutische Konsequenzen sein.

Die manuelle Abarbeitung ist validiert worden. Der Einsatz von Laborautomaten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Das Kit ist zum einmaligen Gebrauch bestimmt.

### 1.2 Beschreibung des Analyten

Der menschliche Organismus reagiert auf Attacken durch eingedrungene Krankheitserreger (Mikroorganismen, Viren) oder auf absterbendes Gewebe (nach Unfällen oder Operationen) mit einer Entzündungsreaktion. Im Rahmen dieser Entzündungsreaktion spielen neutrophile Granulozyten als primäre Abwehrzellen eine besondere Rolle. Sie werden durch verschiedene Mediatoren (Zytokine, Leukotriene, Komplementfaktoren, Bakterien-Endotoxine, Faktoren des Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems) aus der Blutbahn angelockt und zur Beseitigung körperfremder Stoffe stimuliert.

Die neutrophilen Granulozyten benutzen Proteinasen, um diese körperfremden Stoffe oder Gewebetrümmer zu verdauen. Eine dieser Proteinasen ist die PMN Elastase, die in den azurophilen Granula der polymorphkernigen (PMN-) Granulozyten lokalisiert ist. Während dieses Verdauungsvorganges werden einige dieser Proteinasen auch partiell extrazellulär sezerniert.

Die extrazelluläre Aktivität der PMN Elastase wird durch Inhibitoren (v.a. durch den  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor,  $\alpha_1$ -PI) reguliert. Bei starker Stimulation der Granulozyten und einer damit verbundenen übermäßigen Freisetzung der PMN Elastase kann das Hemmpotential des  $\alpha_1$ -PI überschritten werden. Die nicht-inhibierte PMN Elastase löst dann zusammen mit den gleichzeitig gebildeten Oxidantien ( $O_2$ -Radikale,  $H_2O_2$ , OH-Radikale etc.) Gewebeschäden aus. Da über das Blut und die Lymphgefäße jedoch  $\alpha_1$ -PI nachgeliefert wird, wird in der Zirkulation schließlich alle freigesetzte PMN-Elastase gebunden. Die Konzentration des PMN Elastase/ $\alpha_1$ -PI-Komplexes korreliert mit der Menge an freigesetzter PMN Elastase und ist somit ein Maß für die Aktivität der Granulozyten im Entzündungsgeschehen.

Der Nachweis der PMN Elastase findet seinen Einsatz hauptsächlich zur unterstützenden Diagnostik und Verlaufsbeurteilung bei Trauma, Schock und Sepsis (1-3). Weitere Indikationsgebiete stellen die Bereiche Hämodialyse, Infektionen bei Geburtshilfe, Gelenkerkrankungen, Darmerkrankungen und Pankreatitis dar (8-13). Die Bestimmung von PMN-Elastase in Seminalplasma kann zur unterstützenden Diagnostik von Adnexaffektionen des Mannes eingesetzt werden (5-7).

## 2 TESTPRINZIP

Der vorliegende Test ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", ELISA) zur quantitativen Bestimmung des Komplexes aus humaner PMN Elastase und dem  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) im Plasma und Seminalplasma. Die Festphase ist mit einem polyklonalen Antikörper gegen humane PMN Elastase (Antigen) beschichtet.

Standards, Kontrollen und Patientenproben werden in die mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. In der Probe vorhandene PMN Elastase bindet während der ersten 60-minütigen Inkubation an die Antikörper, die an der inneren Oberfläche der Vertiefung gebunden vorliegen. Nicht gebundene Probenkomponenten werden durch einen Waschschrift entfernt.

Anschließend wird ein zweiter polyklonaler Antikörper zugegeben, der gegen  $\alpha_1$ -PI gerichtet und mit Meerrettichperoxidase markiert ist (Enzymkonjugat). Während einer 60-minütigen Inkubation wird der an den ersten Antikörper gebundene PMN Elastase/ $\alpha_1$ -PI-Komplex von dem enzymmarkierten Antikörper spezifisch erkannt und es bildet sich ein Sandwich-Komplex. Überschüssiges Enzymkonjugat wird durch erneutes Waschen entfernt.

Ein chromogenes Substrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), wird anschließend zugegeben. Während einer 30-minütigen Inkubation wird das Substrat vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt (blau) umgesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Salzsäure beendet (Farbumschlag blau zu gelb). Die Farbintensität ist zu der Konzentration an PMN Elastase in den Proben direkt proportional.

Die optische Dichte der Farblösung wird mit einem Mikrotiterplatten-Messgerät bei 450 nm gemessen.



### 3 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieses Kit ist nur zum *in-vitro*-diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Vor der Testdurchführung muss die Arbeitsanleitung vollständig und sorgfältig gelesen werden und verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
3. Humanes Material, das bei der Herstellung verwendet wird, wurde negativ auf Antikörper gegen HIV 1&2, HbsAg und HCV getestet. Keine Testmethode kann jedoch die vollständige Sicherheit bieten, dass HIV, HBV, HCV oder andere infektiöse Erreger nicht vorhanden sind. Daher müssen die Reagenzien genauso behandelt werden wie potenziell infektiöses Material.
4. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen müssen im verschlossenen Folienbeutel bei 2-8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
5. Proben und Reagenzien müssen so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
6. Für jedes Reagenz einen separaten Behälter verwenden. Das gilt besonders für die Substratlösung. Wenn der Behälter der Substratlösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substratlösung. Reagenzien nie zurück ins Fläschchen überführen, dadurch können Reagenz-Kontaminationen verursacht werden.
7. Den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig mischen, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
8. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
9. Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Die Temperatur hat einen Einfluss auf die Bestimmung der optischen Dichte.
10. Nicht mit dem Mund pipettieren und Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
11. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika verwenden.
12. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Handschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
14. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
15. Alle in der Packungsbeilage angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
16. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander austauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um die selbe Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder transportiert worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen können.
17. Der Kontakt mit der Stopplösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verätzungen verursachen kann.
18. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, CMIT und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
19. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
20. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt. Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich. Sie finden diese auch unter [www.demeditec.de](http://www.demeditec.de) zum Herunterladen.
21. Alle im Zusammenhang mit den Produkten, die auf dem EU-Markt bereitgestellt werden, auftretenden schwerwiegenden Ereignisse gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 2, Absatz 61 sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender oder Patient niedergelassen ist, gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 82 zu melden.
22. Sollten Produktinformationen, einschließlich Etikettierung falsch oder inkorrekt sein, bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits kontaktieren.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Mitgelieferte Komponenten

1. **SORB MT Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Wells; beschichtet mit polyklonalem Antikörper gegen humane PMN Elastase.
2. **CAL LYO PMN Elastase Master Standard**, 1 Fläschchen (20 ng), lyophilisiert; PMN Elastase/ $\alpha_1$ -PI Komplex in Plasma-Puffermatrix; Rekonstitution und Konzentrationen siehe "Vorbereitung der Reagenzien" (4.4).
3. **CONTROL 1-2 LYO PMN Elastase Kontrollen** in Plasma-Puffermatrix, 2 Fläschchen, lyophilisiert; Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt. Rekonstitution siehe "Vorbereitung der Reagenzien" (4.4).
4. **ENZ CONJ Enzymkonjugat**, 1 Fläschchen, 16 ml, gebrauchsfertig; Enzym-markierter anti- $\alpha_1$ -PI Antikörper, enthält einen polyklonalen Antikörper, markiert mit Meerrettichperoxidase.
5. **SAM DIL Standard-/Probenverdünnungspuffer**, 1 Fläschchen, 50 ml, gebrauchsfertig
6. **SUB TMB Substratlösung**, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig; Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP SOLN Stopplösung**, 1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 N Salzsäure
8. **WASH SOLN 10x Waschlösung**, 1 Fläschchen, 50 ml (10x konzentriert); siehe "Vorbereitung der Reagenzien" (4.4).

### 4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Photometer für Mikrotiterplatten mit optischem Filter für 450 nm
- Polypropylenröhrchen
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplatten-Schüttler (900 rpm)
- deionisiertes Wasser
- Manuelle oder automatische Geräte zum Waschen von Mikrotiterplatten
- Saugfähiges Papier
- Zeitnahmegerät
- Kalibrierte variable Mikropipetten und Mehrkanalpipetten mit Einwegpipettenspitzen
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden! Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden. Nach dem ersten Öffnen sind die Reagenzien bei sachgemäßer Abarbeitung und Lagerung 30 Tage stabil. Reagenzien vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18-25°C) für mindestens 12 Wochen stabil.

Nach Rekonstitution die Standards und Kontrollen für 7 Tage bei 2-8°C oder aliquotiert bei  $\leq -20^\circ\text{C}$  für 30 Tage lagern.

Die Mikrotiterplatte vor Feuchtigkeit schützen und diese zusammen mit dem Trocknungsmittel in dem verschließbaren Beutel aufbewahren. Die TMB-Substratlösung vor Licht schützen.

### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

#### PMN Elastase Master Standard:

Den lyophilisierten **PMN Elastase Master Standard** mit 2 ml **Standard-/Probenverdünnungspuffer** 30 Minuten vor Gebrauch (Endkonzentration 10 ng/ml) rekonstituieren. Eine Verdünnungsreihe mit **Standard-/Probenverdünnungspuffer** herstellen, um Standards mit 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31 und 0,16 ng/ml zu erhalten.

Sechs Polypropylenröhrchen beschriften: G (5 ng/ml), F (2,5 ng/ml), E (1,25 ng/ml), D (0,63 ng/ml), C (0,31 ng/ml) und B (0,16 ng/ml). Der rekonstituierte **PMN Elastase Master Standard** dient als der höchste Standard H (10 ng/ml). Den PMN Elastase-**Standard-/Probenverdünnungspuffer** als Null-Standard (A) verwenden.

0,5 ml des **Standard-/Probenverdünnungspuffers** in alle Röhrchen (B-G) pipettieren. Anschließend 0,5 ml des rekonstituierten **PMN Elastase Master Standards** in Röhrchen G (5 ng/ml) hinzufügen und gründlich mischen. Dann 0,5 ml aus Röhrchen G (5 ng/ml) in Röhrchen F (2,5 ng/ml) geben und gründlich mischen. Diesen Vorgang nacheinander wiederholen, um die 2-fache Verdünnungsreihe zu vervollständigen.

#### PMN Elastase Kontrollen:

Die lyophilisierten Kontrollen mit **1 ml Standard-/Probenverdünnungspuffer** 30 Minuten vor Gebrauch auflösen. Die PMN Elastase Kontrollen dürfen nicht verdünnt werden.

**Waschlösung:**

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18-25°C) für mindestens 12 Wochen stabil. Bei einer Lagerung bei 2-8°C können sich Präzipitate bilden, die sich durch Schwenken bei Raumtemperatur wieder auflösen sollten (18-25°C). Die Waschlösung darf erst verwendet werden, wenn sich die Präzipitate komplett aufgelöst haben.

**4.5 Entsorgung des Kits**

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

**4.6 Beschädigte Testkits**

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma Demeditec Diagnostics GmbH in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

**5 PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG**

Für die Bestimmung der PMN-Elastase sind EDTA- oder Citrat-Plasma sowie Seminalplasma die bevorzugten Probenmatrices. Auf eine konstante Präanalytik ist zu achten.

EDTA- oder Citrat-Plasma: Es sind die üblichen Vorsichtsmaßnahmen für die Venenpunktion zu beachten (14). Es ist wichtig, die chemische Integrität einer Blutprobe vom Zeitpunkt der Entnahme bis zur Untersuchung zu bewahren. Das Blut durch Venenpunktion entnehmen und das Plasma unverzüglich durch Zentrifugation von den Zellen trennen. Plasmaproben sollten noch am selben Tag verwendet werden. Für eine längere Lagerung (bis zu 12 Monate) können die Proben bei  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden. Um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden, müssen die Proben aliquotiert werden. Proben vor dem Einsatz gut mischen.

Hämolytische, ikterische oder lipämische Proben dürfen nicht verwendet werden. Besondere Vorsicht ist auch bei der Verwendung von Gelsammelsystemen geboten, da bei unsachgemäßer Handhabung eine Beeinflussung der Messergebnisse nicht ausgeschlossen werden kann. Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht im Assay verwendet werden.

Seminalplasma: Die Spermien durch Zentrifugation abtrennen. Den Überstand abnehmen und im Test einsetzen. Das Seminalplasma bei  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  für eine längere Lagerung (bis zu 12 Monate) einfrieren. Um wiederholte Gefrierzyklen zu vermeiden, müssen die Proben aliquotiert gelagert werden. Proben vor dem Einsatz gut mischen.

Serum ist nicht geeignet, da bei der Gerinnung PMN-Elastase *in vitro* freigesetzt werden kann.

**Verdünnung der Proben:**

**EDTA- oder Citrat-Plasma** unmittelbar vor Durchführung des Tests 1:100 mit **Standard-/Probenverdünnungspuffer** verdünnen. Dazu werden 10  $\mu\text{l}$  der Probe mit 990  $\mu\text{l}$  **Standard-/Probenverdünnungspuffer** in einem Polypropylenröhrchen verdünnt. Nach dem Mischen werden 100  $\mu\text{l}$ /Well dieser 1:100 verdünnten Probe verwendet. Die verdünnten Proben dürfen nicht länger gelagert werden, sondern müssen vor jedem Ansatz immer frisch angesetzt werden.

**Bitte beachten:** Der Verdünnungsfaktor 100 muss bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

**Seminalplasma** unmittelbar vor Durchführung des Tests 1:200 mit dem **Standard-/Probenverdünnungspuffer** verdünnen. Dazu werden 5  $\mu\text{l}$  der Probe mit 995  $\mu\text{l}$  **Standard-/Probenverdünnungspuffer** in einem Polypropylenröhrchen verdünnt. Nach dem Mischen werden 100  $\mu\text{l}$ /Well dieser 1:200 verdünnten Probe im Test verwendet. Die verdünnten Proben dürfen nicht länger gelagert werden, sondern müssen vor jedem Ansatz frisch angesetzt werden.

**Bitte beachten:** Der Verdünnungsfaktor 200 muss bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Patientenproben mit einer erwarteten PMN-Elastase-Konzentration höher als der höchste Standard (10 ng/ml) sollten vor der weiteren Untersuchung mit dem **Standard-/Probenverdünnungspuffer** verdünnt werden. Dieser zusätzliche Verdünnungsschritt muss bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

- Die Komponenten aus Testbestecken verschiedener Chargen nicht austauschen.
- Die als Konzentrat gelieferten Reagenzien müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf ihre Endkonzentration verdünnt werden. Gut mischen, aber Schaumbildung vermeiden.
- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe sollte eine neue Pipettenspitze verwendet werden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Proben zu verdünnen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.
- Standards, Kontrollen und Proben sollten mindestens in Doppelansätzen bestimmt werden.
- Die korrekte Durchführung der Waschstritte ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette bzw. eines Multisteppers oder eines automatischen Waschgerätes für Mikrotiterplatten wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausklopfen dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Wells vollständig und gleichmäßig mit Waschlösung gefüllt werden und nach dem Ausklopfen kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt.
- Jeder Testlauf muss eine eigene Standardkurve beinhalten.

## 6.2 Testdurchführung

### 1. Vorbereitung der Standards (siehe Kapitel 4.4):

- Sechs Polypropylenröhrchen beschriften: G (5 ng/ml), F (2,5 ng/ml), E (1,25 ng/ml), D (0,63 ng/ml), C (0,31 ng/ml), und B (0,16 ng/ml). **0,5 ml des Standard-/Probenverdünnungspuffers** in alle Röhrchen (G-B) pipettieren. 0,5 ml des rekonstituierten **PMN Elastase Master Standards** in Röhrchen G (5 ng/ml) pipettieren und sorgfältig mischen. 0,5 ml aus dem Röhrchen G (5 ng/mL) in Röhrchen F (2,5 ng/ml) pipettieren und sorgfältig mischen. Diesen Vorgang schrittweise bis zur kompletten 1:2-Verdünnungsreihe wiederholen. Der rekonstituierte **PMN Elastase Master Standard** dient als höchster Standard H (10 ng/ml). Der **Standard-/Probenverdünnungspuffer** dient als Null-Standard A (0 ng/ml).
2. Alle Patientenproben vor Testbeginn, wie in Kapitel 5 beschrieben, 1:100 (EDTA- oder Citrat-Plasmaproben) bzw. 1:200 (Seminalplasmaproben) mit **Standard-/Probenverdünnungspuffer** in einem Polypropylenröhrchen verdünnen. Rekonstituierte PMN-Elastase Kontrollen 1-2 dürfen **nicht** verdünnt werden.
3. Eine ausreichende Anzahl an Wells der Mikrotiterplatte zum Ansatz von Standards, Kontrollen und vorverdünnten Patientenproben in Doppelbestimmung vorbereiten.

|   | 1 | 2 | 3  | 4   | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|----|-----|---|---|---|---|---|----|----|----|
| a | A | E | K1 | P.. |   |   |   |   |   |    |    |    |
| b | A | E | K1 | P.. |   |   |   |   |   |    |    |    |
| c | B | F | K2 |     |   |   |   |   |   |    |    |    |
| d | B | F | K2 |     |   |   |   |   |   |    |    |    |
| e | C | G | P1 |     |   |   |   |   |   |    |    |    |
| f | C | G | P1 |     |   |   |   |   |   |    |    |    |
| g | D | H | P2 |     |   |   |   |   |   |    |    |    |
| h | D | H | P2 |     |   |   |   |   |   |    |    |    |

4. Zur Bestimmung von PMN Elastase jeweils **100 µl Standards, Kontrollen und vorverdünnte Patientenproben** mit neuen Einwegspitzen entsprechend der Plattenbelegung auf den Boden der Wells pipettieren.
5. **60 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Schüttler (900 rpm) inkubieren.
6. Dekantieren und **4 mal** jeweils mit **300 µl Waschpuffer** waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte auf saugfähigem Papier entfernen.
7. **150 µl Enzymkonjugat** in jedes Well pipettieren.
8. **60 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Schüttler (900 rpm) inkubieren.
9. Erneut dekantieren und **4 mal** jeweils mit **300 µl Waschpuffer** waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte auf saugfähigem Papier entfernen.
10. **200 µl TMB-Substratlösung** in jedes Well pipettieren.
11. **30 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) im Dunkeln ohne Schütteln inkubieren.
12. **50 µl Stopplösung** in jedes Well pipettieren und vorsichtig mischen.
13. Die optische Dichte bei **450 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmen.

## 6.3 Auswertung der Ergebnisse

- Die durchschnittlichen Werte der optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards und Proben bestimmen.
- Die erhaltenen OD-Werte der Standards (y-Achse, linear) werden gegen ihre Konzentration (x-Achse, logarithmisch) entweder auf semi-logarithmischem Papier aufgetragen oder mit einer automatisierten Methode ausgewertet.
- Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
- Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
- Die PMN Elastase-Konzentration der Proben wird durch Multiplikation mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor berechnet (siehe Kapitel 5).
- Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards (10 ng/ml) enthalten, müssen weiter verdünnt werden. Dieser zusätzliche Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

#### 6.4 Beispiel für eine Standardkurve

Die folgende Tabelle zeigt typische Meßwerte am Beispiel des Demeditec PMN Elastase ELISAs. Die Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testansatzes zu berechnen.

| Standard              | Optische Dichte (450 nm) |
|-----------------------|--------------------------|
| Standard A 0 ng/ml    | 0,102                    |
| Standard B 0,16 ng/ml | 0,229                    |
| Standard C 0,31 ng/ml | 0,369                    |
| Standard D 0,63 ng/ml | 0,655                    |
| Standard E 1,25 ng/ml | 1,143                    |
| Standard F 2,5 ng/ml  | 1,784                    |
| Standard G 5,0 ng/ml  | 2,513                    |
| Standard H 10,0 ng/ml | 2,986                    |

#### 7 ERWARTETE WERTE

Die folgenden Werte werden mit dem Demeditec PMN Elastase ELISA bei Plasma und Seminalplasma von augenscheinlich gesunden Erwachsenen beobachtet:

|                      | n  | ng/ml       |        |                |                 |
|----------------------|----|-------------|--------|----------------|-----------------|
|                      |    | Bereich     | Median | 2,5 Perzentile | 97,5 Perzentile |
| <b>Citrat-Plasma</b> | 45 | 23,2 - 81,6 | 37,4   | 25,2           | 69,5            |
| <b>EDTA-Plasma</b>   | 45 | 19,5 - 55,3 | 32,4   | 22,4           | 48,7            |
| <b>Seminalplasma</b> | 40 | 1,9 - 624,5 | 34,0   | 5,4            | 362,3           |

Diagnostische und therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests. Positive Ergebnisse sollten hinsichtlich der klinischen Situationen kontrolliert werden, wobei im individuellen Einzelfall entschieden werden sollte, wann und wie eine Therapie notwendig erscheint. Es wird empfohlen, dass jeder Anwender einen eigenen Normalbereich bezüglich seines Patientenkollektivs festlegt. Die angegebenen Normalwerte dienen lediglich zur Orientierung.

#### 8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag-Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalen als auch pathologischen Werten eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Bereichen sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Es wird empfohlen, an einschlägigen Ringversuchen teilzunehmen.

Geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends sollten angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall sollten die folgenden Bereiche überprüft werden: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten nach der Überprüfung der vorgenannten Bereiche keine Fehler erkannt worden sein, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma Demeditec Diagnostics GmbH in Verbindung.

## 9 TESTCHARAKTERISTIKA

### 9.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert zuzüglich der zweifachen Standardabweichung des Standards A, beträgt 0,03 ng/ml, ohne Berücksichtigung eines Verdünnungsfaktors.

### 9.2 Spezifität

Der Demeditec PMN Elastase ELISA erfasst spezifisch den PMN Elastase/ $\alpha_1$ -PI-Komplex.

### 9.3 Messbereich

Messbereich des Testes (von der analytischen Sensitivität bis zum höchsten Standard): 0,03 bis 10 ng/ml.

### 9.4 Präzision

#### 9.4.1 Intra-Assay

Die Intra-Assay-Variation wurde ermittelt durch die Bestimmung von 20 Wiederholungsmessungen von Plasma (EDTA und Citrat) sowie Seminalplasma in einem Testansatz mit dem Demeditec PMN Elastase ELISA. Die Variation innerhalb des Assays ist nachfolgend dargestellt:

| EDTA-Plasma | n  | Mittelwert (ng/ml) | CV (%) |
|-------------|----|--------------------|--------|
| 1           | 20 | 287,5              | 9,9    |
| 2           | 20 | 26,3               | 6,2    |

| Citrate-Plasma | n  | Mittelwert (ng/ml) | CV (%) |
|----------------|----|--------------------|--------|
| 1              | 20 | 51,6               | 9,1    |
| 2              | 20 | 107,2              | 3,4    |

| Seminalplasma | n  | Mittelwert (ng/ml) | CV (%) |
|---------------|----|--------------------|--------|
| 1             | 20 | 231,7              | 3,0    |
| 2             | 20 | 546,1              | 2,8    |
| 3             | 20 | 169,0              | 2,0    |
| 4             | 20 | 61,7               | 2,7    |

#### 9.4.2 Inter-Assay

Die Inter-Assay-Variation wurde durch Doppelmessungen von Proben in mindestens zehn verschiedenen Testen mit dem Demeditec PMN Elastase ELISA bestimmt.

| EDTA plasma | n  | Mittelwert (ng/ml) | CV (%) |
|-------------|----|--------------------|--------|
| 1           | 10 | 273,8              | 10,6   |
| 2           | 10 | 27,4               | 7,2    |

| Citrat-Plasma | n  | Mittelwert (ng/ml) | CV (%) |
|---------------|----|--------------------|--------|
| 1             | 10 | 46,6               | 8,1    |
| 2             | 10 | 104,2              | 4,1    |

| Seminalplasma | n  | Mittelwert (ng/ml) | CV (%) |
|---------------|----|--------------------|--------|
| 1             | 10 | 242,3              | 11,2   |
| 2             | 10 | 511,6              | 9,8    |
| 3             | 10 | 153,9              | 6,4    |
| 4             | 10 | 58,1               | 8,6    |

**9.5 Wiederfindung**

Die Wiederfindungsrate wurde durch Zugabe zunehmender Mengen des Analyten zu verschiedenen Proben (Spiking), die unterschiedliche Mengen an endogenem Analyten enthielten, bestimmt. Jede Probe (nativ und nach Zugabe von definierten Mengen) wurde mit dem Demeditec PMN Elastase ELISA gemessen. Die prozentualen Wiederfindungen wurden durch Vergleich der erwarteten und gemessenen Ergebnisse der Proben ermittelt.

| EDTA-Plasma | Spiking (ng/ml) | Gemessener Wert (ng/ml) | Erwarteter Wert (ng/ml) | Wiederfindung (%) |
|-------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| 1           | -               | 190,5                   | -                       | -                 |
|             | + 50            | 242,4                   | 240,5                   | 101               |
|             | + 150           | 365,6                   | 340,5                   | 107               |
|             | + 300           | 576,3                   | 490,5                   | 117               |
| 2           | -               | 113,1                   | -                       | -                 |
|             | + 50            | 174,3                   | 163,1                   | 107               |
|             | + 150           | 283,4                   | 263,1                   | 108               |
|             | + 300           | 475,7                   | 413,1                   | 115               |

| Citrat-Plasma | Spiking (ng/ml) | Gemessener Wert (ng/ml) | Erwarteter Wert (ng/ml) | Wiederfindung (%) |
|---------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| 1             | -               | 28,1                    | -                       | -                 |
|               | + 50            | 77,7                    | 78,1                    | 99                |
|               | + 150           | 168,4                   | 178,1                   | 95                |
|               | + 300           | 338,8                   | 328,1                   | 103               |
| 2             | -               | 52,4                    | -                       | -                 |
|               | + 50            | 109,4                   | 102,4                   | 107               |
|               | + 150           | 210,3                   | 202,4                   | 104               |
|               | + 300           | 375,4                   | 352,4                   | 107               |

| Seminalplasma | Spiking (ng/ml) | Gemessener Wert (ng/ml) | Erwarteter Wert (ng/ml) | Wiederfindung (%) |
|---------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| 1             | -               | 41,9                    | -                       | -                 |
|               | + 50            | 94,6                    | 91,9                    | 103               |
|               | + 150           | 182,8                   | 191,9                   | 95                |
|               | + 300           | 322,3                   | 341,9                   | 94                |
| 2             | -               | 438,3                   | -                       | -                 |
|               | + 50            | 612,4                   | 488,3                   | 125               |
|               | + 150           | 672,0                   | 588,3                   | 114               |
|               | + 300           | 760,4                   | 738,3                   | 103               |
| 3             | -               | 246,9                   | -                       | -                 |
|               | + 50            | 305,7                   | 296,9                   | 103               |
|               | + 150           | 390,2                   | 396,9                   | 98                |
|               | + 300           | 528,8                   | 546,9                   | 97                |



**9.6 Linearität**

Plasma (EDTA und Citrat) sowie Seminalplasma wurden unverdünnt und mit dem **Standard-/Probenverdünnungspuffer** verdünnt mit dem Demeditec PMN Elastase ELISA untersucht. Die prozentuale Linearität wurde durch Vergleich der erwarteten und gemessenen Werte berechnet.

| EDTA-Plasma | Verdünnung | Gemessener Wert (ng/ml) | Erwarteter Wert (ng/ml) | Linearität (%) |
|-------------|------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| 1           | -          | 308,6                   | -                       | -              |
|             | 1 : 2      | 145,2                   | 154,3                   | 94             |
|             | 1 : 4      | 69,1                    | 77,1                    | 90             |
|             | 1 : 8      | 37,4                    | 38,6                    | 97             |
| 2           | -          | 172,9                   | -                       | -              |
|             | 1 : 2      | 88,5                    | 86,5                    | 102            |
|             | 1 : 4      | 45,2                    | 43,2                    | 105            |
|             | 1 : 8      | 23,8                    | 21,6                    | 110            |

| Citrat-Plasma | Verdünnung | Gemessener Wert (ng/ml) | Erwarteter Wert (ng/ml) | Linearität (%) |
|---------------|------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| 1             | -          | 107,9                   | -                       | -              |
|               | 1 : 2      | 57,5                    | 54,0                    | 107            |
|               | 1 : 4      | 31,8                    | 27,0                    | 118            |
|               | 1 : 8      | 17,2                    | 13,5                    | 128            |
| 2             | -          | 58,8                    | -                       | -              |
|               | 1 : 2      | 32,0                    | 29,4                    | 109            |
|               | 1 : 4      | 14,4                    | 14,7                    | 98             |
|               | 1 : 8      | 8,6                     | 7,4                     | 117            |

| Seminalplasma | Verdünnung | Gemessener Wert (ng/ml) | Erwarteter Wert (ng/ml) | Linearität (%) |
|---------------|------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| 1             | -          | 478,4                   | -                       | -              |
|               | 1 : 2      | 261,4                   | 239,2                   | 109            |
|               | 1 : 4      | 129,9                   | 119,6                   | 109            |
|               | 1 : 8      | 68,6                    | 59,8                    | 115            |
| 2             | -          | 412,5                   | -                       | -              |
|               | 1 : 2      | 229,3                   | 206,3                   | 111            |
|               | 1 : 4      | 116,5                   | 103,1                   | 113            |
|               | 1 : 8      | 63,2                    | 51,6                    | 123            |
| 3             | -          | 624,5                   | -                       | -              |
|               | 1 : 2      | 335,4                   | 312,3                   | 107            |
|               | 1 : 4      | 165,6                   | 156,1                   | 106            |
|               | 1 : 8      | 90,5                    | 78,1                    | 116            |

## 10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren unter vollständiger Beachtung der Anweisungen auf der Packungsbeilage und unter Einhaltung der guten Laborpraxis durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### 10.1 Interferenzen

- Hämoglobin (bis zu 30 mg/dl), Bilirubin (bis zu 40 mg/dl), und Lipide (bis zu 30 mg/ml) zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse des Tests. Wir empfehlen dennoch, keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben zu verwenden, um Interferenzen auszuschließen.
- Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht für den Assay verwendet werden.
- Das Ergebnis eines jeden immunologischen Testsystems kann durch heterophile Antikörper, Anti-Spezies-Antikörper oder Rheumafaktoren, die in menschlichen Proben vorhanden sind, beeinflusst werden (15-17). Das Auftreten von heterophilen Antikörpern bei Patienten, die regelmäßig mit Tieren oder tierischen Produkten in Berührung kommen, kann beispielsweise zu Störungen bei immunologischen Testen führen. Daher können Interferenzen mit diesem *in-vitro*-Immunoassay nicht ausgeschlossen werden. Bei Verdacht auf unplausible Ergebnisse sollten diese als nicht gültig betrachtet und durch weitere Untersuchungen überprüft werden.  
Zu diagnostischen Zwecken sollten die Ergebnisse immer nur in Verbindung mit dem klinischen Bild des Patienten und weiteren diagnostischen Testen betrachtet werden.

### 10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Messung des PMN Elastase-Gehaltes der Probe beeinflussen würde. Alle Medikamente müssen bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

### 10.3 High-Dose-Hook-Effekt

Ein High-Dose-Hook-Effekt ist im Bereich von 0-900 ng/ml, basierend auf dem Standardbereich (0-10 ng/ml), nicht nachweisbar.

## 11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

### 11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma Demeditec Diagnostics GmbH in Verbindung.

### 11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### 11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des

Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## **12 ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG**

Änderungen gegenüber der Vorgängerversion 6-01/22 zur aktuellen Version 7-05/22:

|             |   |
|-------------|---|
| Kapitel 3   | Überschrift angepasst                       |
| Kapitel 4.2 | Polypropylenröhrchen hinzugefügt            |
| Kapitel 9   | Überarbeitung der Testcharakteristika       |
| Kapitel 10  | Aktualisierung High-Dose-Hook-Effekt (10.3) |
| Allgemein   | redaktionelle Änderungen                    |

**13 LITERATUR**

1. Jochum M., Machleidt, W., Neuhof, H., and Fritz, H.  
Proteinases. In: Schlag G, Redl H (eds), Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993: 46-60.
2. Jochum M., Machleidt, W., and Fritz, H.  
Proteolytic Enzyme Systems. In: Schlag G, Redl H (eds), Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993: 531-548.
3. Dittmer H., Jochum M. and Fritz H.  
Freisetzung von granulozytärer Elastase und Plasmaproteinveränderungen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock. Unfallchirurg (1986) 89: 160-169
4. Elastase, Elastase- $\alpha$ 1-Proteinase Inhibitor Complex  
In: Friedman, R.B., Young, D.S (Eds.), Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests  
AACC Press, Washington, 3<sup>rd</sup> Edition, 1997: 3-161
5. Reinhardt, A., Haidl, G., and Schill, W-B.  
Granulocyte elastase indicates silent male genital tract inflammation and appropriate anti-inflammatory treatment. Andrologia 29, 1996: 187 – 192
6. Wolff M.D. and Anderson D.J.  
Evaluation of granulocyte elastase as a seminal plasma marker for leukocytospermia. Fertility and Sterility, Vol. 50, No. 1, July 1988
7. Zorn B., Virant-Klun I., and Meden-Vrtovec H.  
Semen granulocyte elastase: its relevance for the diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation. Human Reproduction, Vol. 12 No. 9, pp. 1978-1984, 2000
8. Andus T., Gross V., Caesar I., Krumm D., Hosp J., Gerok W., and Schölmerich J.  
PMN-elastase in assessment of patients with inflammatory bowel disease  
Dig Dis Sci. 1993 Sep;38(9): 1638-44
9. Uhl W., Büchler M., Malfertheiner P., Martini Markus, Beger H.G.  
PMN-Elastase in comparison with CRP, Antiproteases, and LDH as indicators of necrosis in human acute pancreatitis. Pancreas: May 1991 – Volume 6 – Issue 3 – p 253-259
10. Domínguez-Munoz J.E., Villanueva A., Larino J. Mora T., Barreiro M., Iglesias-Canle J., Iglesias-García J.  
Accuracy of plasma levels of polymorphonuclear elastase as early prognostic marker of acute pancreatitis in routine clinical conditions; Eur J Gastroenterol Hepatol. 2006 Jan; 18(1):79:83
11. Peters K.M., Koeborg K., Rosendahl T., Haubeck H.D.  
PMN elastase in bone and joint infections. Comparative Study, Int. Orthop. 1994;18(6):352-5
12. Bánkowska E.M., Leibschang J., and Pawlowska A.  
Usefulness of determination of granulocyte elastase plasma level, c-reactive protein and white blood cell count in prediction in intrauterine infection in pregnant women after PROM  
Comparative Study, Ginekol. Pol, 2003, Oct., 74(10):1037-43
13. Hörl W.H., Steinhauer H.B., and Schollmeyer H.B.  
Plasma levels of granulocyte elastase during hemodialysis: Effects on different dialyzer membranes; Kidney International, Vol. 28 (1985), pp. 791-796
14. Lothar Thomas: Labor und Diagnose 2020
15. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries, Clinical Chemistry 2002, 48:11: 2008-2016
16. Tate J. & Ward G. (2004) Interferences in Immunoassays, Clin. Biochem Rev Vol 25, May 2004
17. Selby C. (1999): Interference in immunoassays; Ann. Clin. Biochem 1999, 36: 704-721

**14 KURZANLEITUNG**

(alle Volumenangaben in µl)














| Well   | ng/ml               | A   | B    | C    | D    | E    | F   | G   | H   | Kontrolle<br>1/2 | Probe |
|--|---------------------|-----|------|------|------|------|-----|-----|-----|------------------|-------|
|  |                     | 0   | 0,16 | 0,31 | 0,63 | 1,25 | 2,5 | 5   | 10  |                  |       |
| <b>Schritte</b>  | <b>Lösung</b>       |     |      |      |      |      |     |     |     |                  |       |
| Pipettieren  | Standard            | 100 | 100  | 100  | 100  | 100  | 100 | 100 | 100 |                  | -     |
| Pipettieren  | Kontrolle           | -   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   | 100              | -     |
| Pipettieren  | verdünnte<br>Probe  | -   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   | -                | 100   |
| <b>60 min</b> bei RT (18-25°C)<br>auf einem Schüttler (900<br>rpm) inkubieren      |                     |     |      |      |      |      |     |     |     |                  |       |
| Dekantieren<br><b>4x mit 300 µl</b> Wasch-<br>lösung waschen                       |                     |     |      |      |      |      |     |     |     |                  |       |
| Pipettieren  | Enzym-<br>Konjugat  | 150 | 150  | 150  | 150  | 150  | 150 | 150 | 150 | 150              | 150   |
| <b>60 min</b> bei RT (18-25°C)<br>auf einem Schüttler (900<br>rpm) inkubieren      |                     |     |      |      |      |      |     |     |     |                  |       |
| Dekantieren<br><b>4x mit 300 µl</b> Wasch-<br>lösung waschen                       |                     |     |      |      |      |      |     |     |     |                  |       |
| Pipettieren  | Substrat-<br>lösung | 200 | 200  | 200  | 200  | 200  | 200 | 200 | 200 | 200              | 200   |
| <b>30 min</b> bei RT (18-25°C)<br><b>im Dunkeln</b> ohne Schüt-<br>teln inkubieren |                     |     |      |      |      |      |     |     |     |                  |       |
| Pipettieren  | Stopp-<br>lösung    | 50  | 50   | 50   | 50   | 50   | 50  | 50  | 50  | 50               | 50    |
| Messen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$  |                     |     |      |      |      |      |     |     |     |                  |       |

Vgl. auch Kap. 6.2 für eine detaillierte Beschreibung der Testdurchführung.





## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

| Symbol  | English                            | Deutsch                                      | Française  | Espanol                                     | Italiano                            |
|---|------------------------------------|--|--|---|-------------------------------------|
|  | European Conformity                | CE-Konformitäts-kennzeichnung                | Conforme aux normes européennes                        | Conformidad europea                         | Conformità europea                  |
|  | Consult instructions for use       | Gebrauchsanweisung beachten                  | Consulter les instructions d'utilisation               | Consulte las Instrucciones                  | Consultare le istruzioni per l'uso  |
|  | In vitro diagnostic device         | In-vitro-Diagnostikum                        | utilisation Diagnostic in vitro                        | Diagnóstico in vitro                        | Per uso Diagnostica in vitro        |
|  | For research use only              | Nur für Forschungszwecke                     | Seulement dans le cadre de recherches                  | Sólo para uso en investigación              | Solo a scopo di ricerca             |
|  | Catalogue number                   | Katalog-Nr.                                  | Référence  | Número de catálogo                          | No. di catalogo                     |
|  | Lot. No. / Batch code              | Chargen-Nr.                                  | No. de lot   | Número de lote                              | Lotto no                            |
|  | Contains sufficient for <n> tests/ | Ausreichend für "n" Ansätze                  | Contenu suffisant pour "n" tests                       | Contenido suficiente para <n> ensayos       | Contenuto sufficiente per "n" saggi |
|  | Note warnings and precautions      | Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten | Avertissements et mesures de précaution font attention | Tiene en cuenta advertencias y precauciones | Annoti avvisi e le precauzioni      |
|  | Storage Temperature                | Lagerungstemperatur                          | Température de conservation                            | Temperatura de conservación                 | Temperatura di conservazione        |
|  | Expiration Date                    | Mindesthaltbarkeitsdatum                     | Date limite d'utilisation                              | Fecha de caducidad                          | Data di scadenza                    |
|  | Legal Manufacturer                 | Hersteller                                   | Fabricant  | Fabricante                                  | Fabbricante                         |
| <i>Distributed by</i>   | Distributed by                     | Vertrieb durch                               | Distribution par                                       | Distribución por                            | Distribuzione da parte di           |
|  | Version                            | Version                                      | Version  | Versión                                     | Versione                            |
|  | Single-use                         | Einmalverwendung                             | À usage unique   | Uso único                                   | Uso una volta                       |