

Milenia PMN-Elastase

Enzyme Immunoassay for the quantitative measurement of human PMN-Elastase
English: Page 1-14

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von humaner PMN-Elastase
Deutsch: Seite 15-28

REF:

MKEL 1



IVD




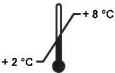







Milenia Biotec GmbH
Versailler Str. 1
D-35394 Gießen
Germany

Tel.: +49-641-94 88 83-0
Fax: +49-641-94 88 83-80
E-Mail: info@milenia-biotec.de
<http://www.milenia-biotec.de>



Explanation of Symbols

Symbol/ Symbole	Explanation/ Erklärung
	Expiry Date Haltbarkeitsdatum
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum
	Batch Code Los-Bezeichnung
REF	Catalogue Number Artikel-Nummer
	Storage Conditions Lagerungsbedingungen
	Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten
	Consult Attended Documents Begleitdokumente beachten
	Package Size Packungsgröße
	Manufacturer Hersteller
	Only for Evaluation Purposes Nur zur Leistungsbewertung

CONTENTS

Assay Information

	Page
Technical Data.....	4
Materials Supplied, Storage and Stability.....	4
Materials Required	5
Specimen Collection and Preparation	5
Warnings and Precautions	5
Immunoassay Procedure.....	6
Calculation of Results.....	7
Calculation Example.....	7
Normal Values	8
Specificity	8

Additional Information

Clinical Relevance	9
References	9
Principle of the Procedure	10
Assay Characteristics	11
Short Instruction	14

ASSAY INFORMATION

Technical Data

Sample material:	EDTA or citrated plasma, exudate, bronchoalveolar lavage fluid, cerebrospinal fluid, seminal plasma
Required sample size:	10 µL of sample to be diluted 1:100 with calibrator/sample diluent 100 µL prediluted sample per single determination
Total incubation time:	2h 20 minutes at room temperature
Calibration range:	15.6 – 1,000 ng/mL
Sensitivity:	3.0 ng/mL
Storage:	refrigerated at 2 - 8 °C
Delivery:	daily from stock in Gießen, Germany
Order code:	MKEL 1
Package size:	96 tests
Controls:	a set of controls is provided with the kits

Materials Supplied, Storage and Stability

Components	Cat.-No.	Conten	Preparation	Storage at	Shelf life
Divisible microplate removable wells, coated with polyclonal antibodies (egg yolk) against PMN elastase	MELPL	1	ready to use	2-8 °C Protect from moisture! Store together with desiccant and carefully sealed in the plastic bag	until the expiration date
PMN Elastase Master Calibrator in serum/buffer matrix containing PMN elastase/ α 1-PI complex	MEL9	1 vial 2 µg	lyophilized; reconstitute with 2 mL Calibrator / Sample Diluent 30 min before use (end concentration of 1,000 ng/mL; make a dilution serie with Calibrator / Sample Diluent to get calibrators with 1,000; 500; 250; 125; 62.5; 31.3 and 15.6 ng/mL	- 20 °C (in aliquots)	30 days after opening or until the expiration date
PMN Elastase Controls in serum/buffer matrix, (for the respective concentrations see the enclosed package insert)	MELC1/2	1 set 2 vials	lyophilized; reconstitute with 1 mL Calibrator / Sample Diluent 30 min before use	- 20 °C (in aliquots)	30 days after opening or until the expiration date
PMN Elastase Calibrator/Sample Diluent	MSEL	1 vial 50 mL	ready to use	2-8 °C	30 days after opening or until the expiration date
Enzyme labeled anti- α 1PI antibody, containing polyclonal rabbit antibodies labeled with horseradish peroxidase	MEEL	1 vial 16 mL	ready to use	2-8 °C	30 days after opening or until the expiration date
TMB-Substrate Solution (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine) in buffered peroxide solution	MTPS1	2 vials 11 mL	ready to use	2-8 °C Protect from light!	30 days after opening or until the expiration date
Stop Solution, contains 2 M hydrochloric acid	MSTUN	1 vial 11 mL	ready to use	2-8 °C	2 months after opening or until the expiration date
Wash Buffer Concentrate (10 x)	MCTWSN	1 vial 75 mL	dilute with 675 mL dist. water to a final volume of 750 mL	2-8 °C	6 months after dilution or until the expiration date
Adhesive Microplate Cover	MVCF 1	2 pieces			

Material Safety Data Sheets are available on request (look as well www.milenia-biotec.de).

Materials Required

- Microplate reader capable for endpoint measurements at 450 nm (optional reference filter in the range of 600 - 690 nm)
- Vortex mixer
- Microplate mixer operating at 350 – 400 rpm
- Distilled water
- Graduated cylinders for 100 and 1000 mL
- Plastic containers for storage of the wash solution
- Pipets for 10 and 100 µL
- Adjustable pipette for up to 1000 µL
- Dispenser or repeatable pipet for 10 µL, 50 µL, 100 µL and 1000 µL

Specimen Collection and Preparation

For determination of PMN elastase EDTA or citrated plasma are the preferred sample matrixes. Exsudate, bronchoalveolar lavage fluid and cerebrospinal fluid can be used. Serum is not suitable, because during clotting PMN elastase can be released *in vitro*. Culture supernatants are as well not suitable; the reason is, that the assay detects only the PMN elastase/ α_1 -PI complex and α_1 PI is normally not present in culture medium.

All samples are prediluted 1:100 with calibrator/sample diluent. Therefore 10 µL of sample may be diluted with 990 µL of calibrator/sample diluent.

The patients need not to be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture into vacutainers and separate plasma from the cells by centrifugation. For longer storage samples should be stored frozen at -20 °C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted. Patient samples expected to contain higher PMN elastase concentrations than the highest calibrator (1000 ng/mL) should be diluted in the Sample Diluent before further assaying. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results.

Warnings and Precautions

All reagents of this test kit are strictly intended for **in vitro** diagnostic use only. Use by staff, who is specially informed and trained in methods which are carried out by use of in vitro diagnostics (EN 375).

Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. Observe the guidelines for performing quality control (Pharm. Betr. V. 9/94; PIC-Document PH 5/89) in medical laboratories (controls and/or pooled sera).

All reagents should be stored refrigerated at 2 - 8 °C in their original container. Do not interchange kit components from different lots and assays. The expiration dates stated on the labels of the shipping container and all vials have to be observed. Do not use kit components beyond their expiration dates.

Allow all kit components and specimen to reach room temperature (18 – 28 °C) prior to use and mix well.

During handling of all kit reagents, control and serum samples observe the existing legal regulations handling potentially infectious materials. Especially the following precautions should be taken:

- do not eat, drink or smoke
- do not pipette by mouth, use safety pipets
- wear disposable gloves and avoid contact with kit reagents, control and sample material.

The test kit contains components of human origin which were found negative for Hepatitis B surface antigen and HIV (Human Immunodeficiency Virus). Nevertheless, for products derived from human or animal source it cannot be completely guaranteed, that they don't contain the above mentioned, others and not yet known or not diagnosticable pathogens. Sample material of patients (for example serum or plasma) normally used in laboratory determinations are always classified as potentially infectious. According to the same safety guides, kit reagents and control material are to be used. Samples of risk patients should be specially labeled and if necessary be handled in safety work benches (lamina flow bench).

The assay reagents contain against microbial growth preservation substances, avoid contact with skin and/or mucous membranes.

Avoid contact with the TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine) substrate solution containing peroxide. If it comes into contact with skin, wash thoroughly with water. Avoid contact with any easily oxidized materials. Extreme temperature changes may cause spontaneous decay of the peroxide. Avoid the contact with the stop solution containing acid. By skin contact, wash thoroughly with water. All instrumentation employed to dispense the stop solution should be thoroughly cleaned after use.

Immunoassay Procedure

- Attention:**
- Do not interchange components of different lots.
 - All components should be at room temperature (18 – 28 °C) before use.
 - 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 of foam formation.
 - Use a disposable-tip micropipette to dispense plasma samples. Pipet directly to the bottom of the wells. Change the tip between samples, to avoid carryover contamination.

1. Preparation of calibrators:

Label six tubes: G (500 ng/mL), F (250 ng/mL), E (125 ng/mL), D (62.5 ng/mL), C (31.3 ng/mL), and B (15.6 ng/mL). Pipet **0.5 mL** of the Calibrator / Sample Diluent into all tubes. Pipet 0.5 mL of the reconstituted PMN-Elastase Master Calibrator into tube G (500 ng/mL) and mix thoroughly. Transfer 0.5 mL from tube G (500 ng/mL) to tube F (250 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 (1,000 ng/mL). Use the PMN-Elastase Calibrator / Sample Diluent as the zero calibrator A (0 ng/mL).

2. Dilute all patient samples 1:100 with Calibrator / Sample buffer before assay. Therefore combine 10 µL of sample with 990 µL of sample diluent in a polystyrene tube. Mix well. Calibrators and controls are ready to use and need not to 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 into the wells according to the template.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18 - 28 °C) on a plate mixer (350 – 400 rpm).
6. Discard the content of the wells and wash **4 times** with **300 µL** buffered wash solution.
7. Pipet **150 µL** of enzyme-labeled anti-α1PI antibody into each well.
8. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18 - 28 °C) on a plate mixer (350 – 400 rpm).
9. Again discard the content of all wells and wash **4 times** with **300 µL** buffered wash solution. Remove as much wash solution as possible by beating the microplate carefully.
10. Dispense **200 µL** of TMB substrate solution into each well.
11. Incubate for **20 minutes** at room temperature (18 - 28 °C) in the dark.
12. Add **50 µL** of acid stop solution to each well and mix carefully.
13. Read the optical density at **450 nm**. Bi-chromatic measurement with a reference at 600 - 690 nm is recommended.

The developed color is stable for at least 15 minutes. Read optical densities during this time.

Calculation of Results

For evaluation of PMN-Elastase a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density (linear scale) and concentration (logarithmic scale) is recommended.

Spline approximation with lin-log coordinates and log-log coordinates are also suitable.

Calculation Example

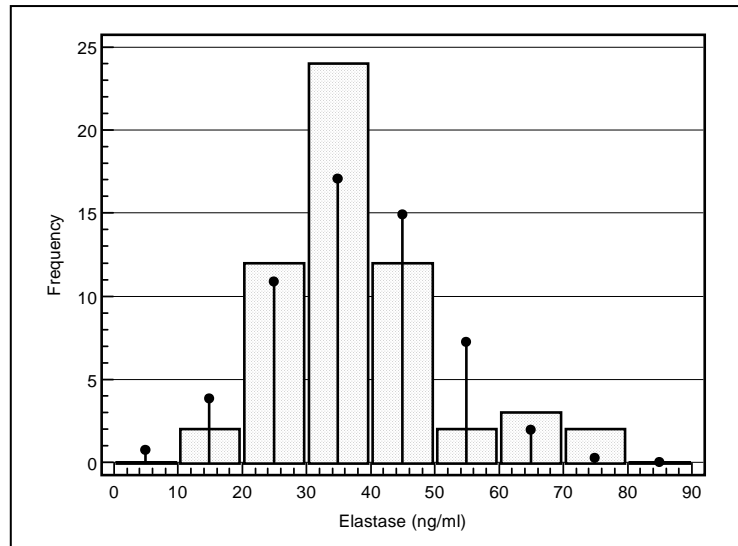
The figure below shows typical results for Milenia PMN-Elastase test kits. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

Milenia PMN-Elastase

	Replicate (OD)	Mean (OD)	Binding (%)	PMN elastase (ng/mL)
Calibrators				
A	0.080 ----- 0.073	0.077	-	0
B	0.163 ----- 0.153	0.158	5	15.6
C	0.259 ----- 0.268	0.264	8	31.3
D	0.479 ----- 0.469	0.474	15	62.5
E	0.867 ----- 0.910	0.889	28	125
F	1.490 ----- 1.530	1.510	47	250
G	2.429 ----- 2.441	2.435	76	500
H (Bmax)	3.144 ----- 3.251	3.198	100.0	1000
Unknown Samples				
X 001	0.406 ----- 0.473	0.440	14	57
X 002	1.862 ----- 1.968	1.915	60	342

Normal Values

In a normal range study with plasma samples from healthy blood donors (n = 57) the following ranges have been established with the Milenia PMN-Elastase test:



Frequency distribution of PMN elastase in citrated plasma of healthy blood donors (median = 35 ng/mL, 95 % percentile = 64.9 ng/mL)

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 plasma PMN elastase. The reference ranges should be regarded as guidelines only.

Specificity

The Milenia PMN-Elastase test kit is specific human PMN elastase only, respectively the PMN elastase/ α_1 -PI complex.

ADDITIONAL INFORMATION

Clinical Relevance

The human organism reacts with an inflammatory response to attacks of invading pathogens (micro-organisms and viruses) or damaged tissue (after accidents or surgery). Polymorphonuclear (PMN) granulocytes play an important role as primary defence cells in this inflammatory reaction. Different bloodstream mediators (cytokines, leukotrienes, complement factors, bacterial endotoxins, clotting and fibrinolysis factors) attract and stimulate these cells to phagocytize 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 localised in the azurophilic granules of the polymorphonuclear 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 α_1 -proteinase inhibitor, α_1 -PI). An overwhelming release of PMN elastase, however, can exceed the inhibitory potential of the α_1 -proteinase inhibitor. Thus, enzymatically active PMN elastase, together with simultaneously produced oxidants (O_2 -radicals, H_2O_2 , OH-radicals), can cause local tissue injury.

Due to the bloodstream and lymphatic system, however, α_1 -PI is delivered subsequently and eventually able to form a complex with all excreted elastase. Therefore, the concentration of the PMN elastase/ α_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 in observation of the course of trauma, shock and sepsis. Further indications are the areas of hemodialysis, infections by obstetrics, joint diseases, effusions of sport injuries, intestinal affection, pancreatitis, cystic fibrosis and male adnex affections.

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. Elastase
In: Thomas, L. (Hrsg.) Labor und Diagnose
Die Medizinische Verlagsgesellschaft, 4. Auflage, 1992: 795 - 801
4. Elastase, Elastase- α_1 -Proteinase Inhibitor Complex
In: Friedman, R.B., Young, D.S (Eds.) Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests
AACC Press, Washington, 3rd 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

Principle of the Procedure

The test kit is a solid phase enzyme immunoassay (ELISA) in the microplate format, designed for the quantitative measurement of the complex of human PMN elastase and α_1 proteinase inhibitor (α_1 -PI) in plasma. The microplate is coated with a first polyclonal antibody (egg yolk) against human PMN elastase (antigen).

Calibrators, controls and patient samples are pipetted into the antibody coated microplate. During a 60 minutes incubation present antigens 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 against α_1 -PI, which is labeled with horseradish peroxidase, is added. During a 60 minutes incubation, the PMN elastase/ α_1 -PI complex bound to the first antibody is specifically recognized by the enzyme labeled antibodies, and a sandwich complex is formed. An excess of enzyme conjugate is washed out.

A chromogenic substrate, TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine), is added. During a 20 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 direct proportional to the concentration of PMN elastase present in the sample.

The optical density of the color solution is measured with a microplate reader at 450 nm. Bi-chromatic measurement with a 600 - 690 nm reference filter is recommended.

Assay Characteristics

Sensitivity

The lower detection limit for PMN- Elastase was 3 ng/mL.

Linearity

In dilution experiments sera with high PMN elastase concentrations were diluted with calibrator/sample diluent and assayed in the Milenia PMN-Elastase kit. The assay showed linearity over the full measuring range.

Milenia PMN-Elastase

Sample No.	Dilution Factor	measured Concentration	expected Concentration	Recovery [%]
		[ng/mL]	[ng/mL]	
1	8:8	114	-	-
	4:8	57.9	55.7	103
	2:8	31.8	27.8	114
	1:8	14.6	13.9	105
2	8:8	135.6	-	-
	4:8	66.5	67.8	98
	2:8	30.8	33.9	91
	1:8	18.8	16.9	111
3	8:8	255.0	-	-
	4:8	130.5	127.5	102
	2:8	61.0	63.8	96
	1:8	31.9	31.9	100
4	8:8	540.1	-	-
	4:8	246.2	270.0	92
	2:8	119.9	135.0	89
	1:8	61.7	67.5	91
5	8:8	641.8	-	-
	4:8	281.4	320.9	88
	2:8	149.7	160.4	93
	1:8	69.9	80.2	87
6	8:8	909.5	-	-
	4:8	444.5	454.7	98
	2:8	208.1	227.4	92
	1:8	100.4	113.7	88

Precision

Statistics for Coefficients of variation (CV) were calculated for each of three samples from the results of 10 determinations in a single run for Intra-Assay precision and the Inter-Assay precision was calculated from the results of 10 different runs of four samples:

Milenia PMN-Elastase

Intra-Assay		
Sample No.	Mean \bar{x} (ng/mL)	CV (%)
1	80	5.2
2	241	4.7
3	358	4.6

Inter-Assay		
Sample No.	Mean \bar{x} (ng/mL)	CV (%)
1	128	5.7
2	216	6.4
3	346	4.4
4	681	5.7

Spiking Recovery

Three spiking solutions were prepared using the Calibrator /Sample Diluent (922, 615 and 478 ng/mL). A 50 µL aliquot of each solution (A,B,C) was spiked into 950 µL aliquots of three different patient plasma samples, for a spiking ratio of 1 to 20, leaving the plasma matrix of the spiked samples relatively intact. All samples were then assayed by the Milenia PMN-Elastase procedure.

Milenia PMN-Elastase

Sample No.	Diluted Solution	measured Concentration [ng/mL]	expected Concentration [ng/mL]	Recovery [%]
1	-	23.2	-	-
	A	72.4	69.4	104
	B	59.3	54.1	109
	C	49.6	47.2	101
2	-	30.6	-	-
	A	73.4	76.7	96
	B	59.3	61.4	97
	C	56.8	54.4	104
3	-	61.7	-	-
	A	118.0	107.8	109
	B	100.8	92.5	109
	C	94.8	85.6	110

Effects of Bilirubin and Hemolysis

To simulate moderate and severe icterus, four samples were spiked with 100 and 200 milligrams of bilirubin per liter. All samples were assayed, both spiked and unspiked, by the Milenia PMN-Elastase procedure, with the following results (ng/mL):

Milenia PMN-Elastase

Sample No.	Unspiked	100 mg/L Bilirubin	200 mg/L Bilirubin
		[ng/mL]	[ng/mL]
1	100	106	104
2	249	245	261
3	572	575	534
4	903	964	910

The results show that severe icterus (bilirubin up to 200 mg/L) has no clinically significant effect on the Milenia PMN-Elastase procedure.

Samples with hemolysis normally show no effect on the Milenia PMN-Elastase procedure. In single cases hemolysis can lead to an increase due to the decay of granulocytes *in vitro*.

Short Instruction: Milenia PMN-Elastase

(all sample sizes given in μL)

MP Well		A	B	C	D	E	F	G	H	Control 1/2	Sample
	ng/mL	0	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000		
Steps	Solution										
Pipet	Calibrator	100	100	100	100	100	100	100	100	-	-
Pipet	Control	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
Pipet	Prediluted sample	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Incubate for 60 min at RT on a plate mixer											
Decant Wash 4x with 300 μL of buffered wash solution											
Pipet	Enzyme-labeled antibody	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
Incubate for 60 min at RT on a plate mixer											
Decant Wash 4x with 300 μL of buffered wash solution											
Pipet	Substrate Solution	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Incubate for 20 min at RT in the dark											
Pipet	Stop 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 page 6.



milenia biotec

Milenia Biotec GmbH, Versailler Straße 1, 35394 Gießen, Germany, www.milenia-biotec.de
Tel.: ++49(0) 641 / 948883-0, Fax: ++49(0) 641 / 948883-80, e-mail: info@milenia-biotec.de

Milenia PMN-Elastase

Enzyme Immunoassay for the quantitative measurement of human PMN-Elastase
English: Page 1-14

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von humaner PMN-Elastase
Deutsch: Seite 15-28

REF:

MKEL 1



96

IVD



Milenia Biotec GmbH
Versailler Str. 1
D-35394 Gießen
Germany

Tel.: +49-641-94 88 83-0
Fax: +49-641-94 88 83-80
E-Mail: info@milenia-biotec.de
<http://www.milenia-biotec.de>



INHALTSVERZEICHNIS

Testinformationen

	Seite
Technische Daten.....	18
Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität.....	18
Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel.....	19
Probenentnahme und -vorbereitung.....	19
Hinweise und Vorsichtsmassnahmen	19
Testdurchführung	20
Auswertung der Ergebnisse	21
Auswertungsbeispiel.....	21
Normalwerte	22
Spezifität.....	22

Zusätzliche Informationen

Klinische Relevanz	23
Literatur.....	23
Methodik	24
Testcharakteristik	25
Kurzanleitung.....	28

TESTINFORMATIONEN

Technische Daten

Untersuchungsmaterial:	EDTA- oder Citrat-Plasma, Exsudat, Bronchiallavage, Liquor, Seminalplasma
Erforderliche Probenmenge:	10 µl Probe für eine 1:100 Verdünnung mit Standard-/Probenverdünnungspuffer 100 µl verdünnte Probe pro Einzelbestimmung
Gesamt-Inkubationszeit:	2 h 20 min. bei Raumtemperatur
Messbereich:	15,6 - 1000 ng/ml
Empfindlichkeit:	3,0 ng/ml
Lagerung:	bei 2-8 °C im Kühlschrank
Lieferung:	täglich ab Lager Gießen
Bestell-Nummer:	MKEL 1
Packungsgröße:	96 Bestimmungen
Kontrollen:	Set mit Kontrollen sind im Kit enthalten

Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität

Komponente	Cat.-No.	Inhalt	Vorbereitung	Lagerung bei	Haltbarkeit
Mikrotiter®-Platte teilbar, beschichtet mit polyklonalem Hühnereigeb-Antikörper gegen humane PMN-Elastase	MELPL	1	gebrauchsfertig	2-8 °C Vor Feuchtigkeit schützen! Zusammen mit dem Trocknungsmittel in dem verschließbaren Beutel aufbewahren	Bis zum Verfallsdatum
PMN-Elastase Standard in Serumpuffermatrix, enthält aufgereinigten PMN-Elastase/α ₁ -PI Komplex	MEL9	1 Fl. 2 µg	lyophilisiert; mit 2 ml Standard-/Proben-Puffer 30 min vor Gebrauch auf-lösen (End-Konzentration 1000 ng/ml); eine Verdünnungsreihe ansetzen, um Standards mit 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,3 und 15,6 ng/ml zu erhalten	- 20 °C aliquotiert	30 Tage nach dem Öffnen bzw. bis zum Verfallsdatum
PMN-Elastase-Kontrollen in Serumpuffermatrix (genaue Werte dem separaten Beipackzettel entnehmen)	MELC1/2	1 Set 2 Fl.	lyophilisiert; mit 1 ml Standard / Proben-Puffer 30 min vor Gebrauch auf-lösen	- 20 °C aliquotiert	30 Tage nach dem Öffnen bzw. bis zum Verfallsdatum
Standard-/Proben-Verdünnungspuffer	MSEL	1 Fl. 50 ml	gebrauchsfertig	2-8 °C	30 Tage nach dem Öffnen bzw. bis zum Verfallsdatum
Enzym-markierter anti-α ₁ PI Antikörper, enthält polyklonalen Kaninchen-Antikörper, markiert mit Meerrettichperoxidase	MEEL	1 Fl. 16 ml	gebrauchsfertig	2-8 °C	30 Tage nach dem Öffnen bzw. bis zum Verfallsdatum
TMB-Substrat-Lösung (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin) in gepufferter Peroxid-Lösung	MTPS1	2 Fl. 11 ml	gebrauchsfertig	2-8 °C Vor Licht schützen!	30 Tage nach dem Öffnen bzw. bis zum Verfallsdatum
Stopp-Lösung (enthält 2 M Salzsäure)	MSTUN	1 Fl. 11 ml	gebrauchsfertig	2-8 °C	2 Monate nach dem Öffnen bzw. bis zum Verfallsdatum
Waschlösung, gepuffert Konzentrat (10x)	MCTWSN	1 Fl. 75 ml	mit 675 ml dest. Wasser auf 750 ml auffüllen	2-8 °C	6 Monate nach dem Verdünnen bzw. bis zum Verfallsdatum
Abdeckfolie	MVCF 1	2 Stück			

Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich (siehe auch unter www.milenia-biotec.de).

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Mikrotiter-Platten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm, optional mit Referenzwellenlänge von 600 - 690 nm
- Wirbelmischer (Vortex)
- Mikrotiterplatten-Schüttler (350 – 400 Upm)
- destilliertes Wasser
- Messzylinder für 100 - 1.000 ml
- Plastikgefäße zur Aufbewahrung des Waschpuffers
- Mikropipetten für 10 und 100 µl
- variable Mikropipette für bis zu 1.000 µl
- Dispenser bzw. Mehrkanalpipette für 10 µl, 50 µl, 100 µl und 1.000 µl

Probenentnahme und -vorbereitung

Die Bestimmung der PMN-Elastase wird vor allem mit EDTA- oder Citrat-Plasma durchgeführt. Serum ist nicht verwendbar, da Elastase während der Serumgewinnung aus PMN-Zellen *in-vitro* freigesetzt werden kann. Kulturüberstände sind auch nicht für die Verwendung geeignet; der Grund ist, dass der Test nur den PMN-Elastase/ α_1 -PI-Komplex erfasst und normalerweise kein α_1 -PI in Kulturmedien vorhanden ist.

Die Plasmaproben werden vor der Messung 1:100 mit Standard-/Probenverdünnungspuffer verdünnt. Dazu wird beispielsweise 10 µl Probe zu 990 µl Puffer gegeben.

Plasmaproben können gekühlt bei 2 - 8 °C bis zu 5 Tage aufbewahrt werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtigt, sollten die Proben aliquotiert und bei -20 °C tiefgefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Patientenproben, deren Konzentration an PMN-Elastase höher als der höchste Kalibratorwert (1000 ng/ml) liegen könnte, sollten vor der Abarbeitung im Probenpuffer vorverdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnungsstufe ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

Hinweise und Vorsichtsmassnahmen

Alle Reagenzien dieser Testpackung dürfen ausschließlich zur **in vitro**-Diagnostik verwendet werden. Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in Verfahren, die unter Verwendung von *in vitro*-Diagnostika durchgeführt werden (EN 375), unterrichtet und ausgebildet wurde.

Die Einhaltung des vorgeschriebenen Protokolls zur Durchführung des Tests ist unbedingt erforderlich. Die Richtlinien zur Durchführung der Qualitätskontrolle (Pharm. Betr. V. 9/94; PIC-Dokument PH 5/89) in medizinischen Laboratorien sind zu beachten (Mitführen von Kontrollen und/oder Poolseren).

Die Lagerung der Kitreagenzien sollten gekühlt bei 2 - 8°C in den Originalflaschen erfolgen. Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Verfallene Kitbestandteile nicht benutzen.

Alle Testkomponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18 - 28 °C) bringen und gut durchmischen.

Für den Umgang mit Kitreagenzien, Kontroll- und Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung für den Gesundheitsdienst beim Umgang mit potentiell infektiösem Material einzuhalten. Insbesondere sind folgende Vorsichtsmaßnahmen zu beachten:

- nicht essen, trinken oder rauchen
- nicht mit dem Mund pipettieren, Sicherheitspipetten verwenden
- Handschuhe tragen und Kontakt mit Reagenzien, Kontrollproben und Untersuchungsmaterial vermeiden

In diesem Testbesteck enthaltene Reagenzien humanen Ursprungs erwiesen sich bei der Prüfung auf Hepatitis B Oberflächen-Antigen und HIV (Human Immuno-deficiency Virus) als negativ. Dennoch ist bei Produkten menschlichen oder tierischen Ursprungs nie mit letzter Sicherheit auszuschließen, daß die genannten, andere oder ggf. noch nicht bekannte oder diagnostizierbare Krankheitserreger enthalten sind.

Untersuchungsmaterial von Patienten (z.B. Plasma- oder Serumproben), wie es für Laboratoriumsuntersuchungen eingesetzt wird, ist stets als potentiell infektiös einzustufen. Unter den gleichen Sicherheitsvorkehrungen sind ebenso Kitreagenzien und Kontrollproben zu handhaben. Proben von Risikopatienten sollten stets besonders gekennzeichnet werden und ggf. in Sicherheitswerkbänken (z. B. Laminar Flow-Arbeitsplatz) bearbeitet werden.

Die Reagenzien dieses Testbestecks enthalten zum Schutz gegen mikrobakterielles Wachstum Konservierungsmittel; daher ist die Berührung mit der Haut und /oder Schleimhäuten zu vermeiden.

Ein Kontakt mit der Peroxid enthaltenden TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin) Substratlösung ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und kräftig mit Wasser abwaschen. Vermeiden Sie den Kontakt mit leicht oxidierbaren Materialien. Extreme Temperaturschwankungen können zum spontanen Zerfall des Peroxids führen. Ein Kontakt mit der säurehaltigen Stopp-Lösung ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und kräftig mit Wasser abwaschen. Alle Geräte, die zur Verteilung der Stopp-Lösung verwendet wurden, sofort nach Gebrauch gründlich reinigen.

Testdurchführung

- Achtung:**
- Die Komponenten aus Testbestecken verschiedener Chargen nicht austauschen.
 - Alle Komponenten auf Raumtemperatur (18 – 28 °C) bringen.
 - Die als Konzentrat gelieferten Reagenzien müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf ihre Endkonzentration verdünnt werden. Gut mischen, aber Schaumbildung vermeiden.
 - Zum Vorlegen der Plasmaproben sollten Pipetten mit Einmalspitzen verwendet werden. Direkt auf den Boden der Vertiefungen pipettieren. Für jede Probe die Spitzen wechseln, um Verschleppungen zu vermeiden.

1. Vorbereitung der Standards:

- Sechs Röhrchen beschriften: G (500 ng/ml), F (250 ng/ml), E (125 ng/ml), D (62,5 ng/ml), C (31,3 ng/ml), and B (15,6 ng/ml). **0,5 mL** des Standard-/Probenverdünnungspuffers in alle Röhrchen pipettieren. 0,5 ml des rekonstituierten PMN-Elastase Standards in Röhrchen G (500 ng/ml) pipettieren und sorgfältig mischen. 0,5 ml aus dem Röhrchen G (500 ng/mL) in Röhrchen F (250 ng/ml) pipettieren und sorgfältig mischen. Diesen Vorgang schrittweise bis zur kompletten 1:2 Verdünnungsreihe wiederholen. Der rekonstituierte PMN-Elastase Standard dient als höchster Standard H (1000 ng/ml). Der Standard-/Probenverdünnungspuffer dient als Null-Standard A (0 ng/ml).
2. Alle Patientenproben vor Assaybeginn 1:100 mit Standard-/Probenverdünnungspuffer verdünnen. Dazu 10 µl Probe in einem Reagenzröhrchen vorlegen und 990 µl Puffer hinzupipettieren. Standards und Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.
 3. Eine ausreichende Anzahl an Vertiefungen der Mikrotiter-Platte 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 entsprechend der Plattenbelegung auf den Boden der Vertiefungen pipettieren.
5. **60 Minuten** bei Raumtemperatur (18 - 28 °C) auf einem Schüttler (350 – 400 UpM) inkubieren.
6. Dekantieren und **4 mal** jeweils mit **300 µl** Waschpuffer waschen.
7. **150 µl** enzym-markierten Antikörper zu jeder Vertiefung zugeben.
8. **60 Minuten** bei Raumtemperatur (18 - 28 °C) auf einem Schüttler (350 – 400 UpM) inkubieren.
9. Erneut dekantieren und **4 mal** jeweils mit **300 µl** Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
10. **200 µl** TMB-Substratlösung in jede Vertiefung pipettieren.
11. **20 Minuten** bei Raumtemperatur (18 - 28 °C) **im Dunkeln** inkubieren.
12. **50 µl** Stopp-Lösung in jede Vertiefung pipettieren und vorsichtig mischen.
13. Optische Dichte bei **450 nm** messen. Bi-chromatische Messung mit einer Referenzfilterwellenlänge im Bereich von 600 - 690 nm ist empfehlenswert.

Die Färbung der Lösung ist mindestens 15 Minuten stabil. In dieser Zeit sollte gemessen werden.

Auswertung der Ergebnisse

Zur Auswertung des Milenia PMN-Elastase Tests ist eine 4-Parameter Logistik mit lin-log-Koordinaten für die optischen Dichte (lineare Achse) und für die Konzentration (logarithmische Achse) die Kurvenanpassung der Wahl.

Eine geglättete Spline-Funktion mit lin-log- oder log-log-Koordinaten ist ebenso möglich.

Auswertungsbeispiel

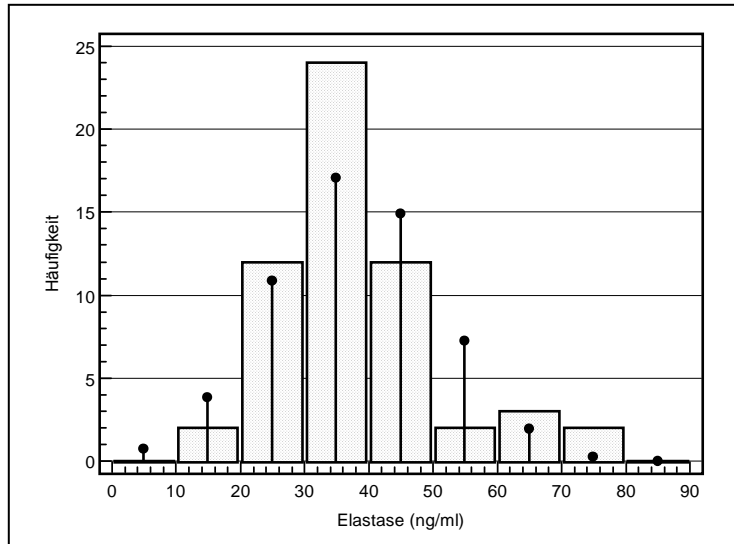
Die folgenden Tabellen zeigen typische Meßwerte am Beispiel des Milenia PMN-Elastase Tests. Die Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testansatzes danach zu berechnen.

Milenia PMN-Elastase

	Replikat (OD)	Mittelwert (OD)	Bindung (%)	PMN-Elastase (ng/ml)
Standards				
A	0,080 ----- 0,073	0,077	-	0
B	0,163 ----- 0,153	0,158	5	15,6
C	0,259 ----- 0,268	0,264	8	31,3
D	0,479 ----- 0,469	0,474	15	62,5
E	0,867 ----- 0,910	0,889	28	125
F	1,490 ----- 1,530	1,510	47	250
G	2,429 ----- 2,441	2,435	76	500
H (Bmax)	3,144 ----- 3,251	3,198	100.0	1000
Unbekannte Proben				
X 001	0,406 ----- 0,473	0,440	14	57
X 002	1,862 ----- 1,968	1,915	60	342

Normalwerte

Im Rahmen einer Normbereichsstudie anhand von Blutspender-Plasmen (n = 57) wurden mit dem Milenia PMN-Elastase-Test die folgenden Werte ermittelt:



**Häufigkeitsverteilung von PMN-Elastase
im Citrat-Plasma gesunder Blutspender (Median = 35 ng/ml, 95 % Percentile = 64,9 ng/ml)**

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 seinen eigenen Normalbereich bezüglich seines Patientenkollektivs festlegt. Die angegebenen Normalwerte dienen zur Orientierung.

Spezifität

Der Milenia PMN-Elastase Test erfaßt nur humane PMN-Elastase bzw. den PMN-Elastase/ α_1 -PI-Komplex.

ZUSÄTZLICHE INFORMATIONEN

Klinische Relevanz

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 die Enzyme auch partiell extrazellulär sezerniert.

Die extrazelluläre Aktivität der PMN-Elastase wird durch Inhibitoren (v.a. durch den α_1 -Proteinase-Inhibitor = α_1 -PI) reguliert. Bei starker Stimulation der Granulozyten und einer damit verbundenen übermäßigen Freisetzung der Elastase kann das Hemmpotential des α_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 α_1 -Proteinase-Inhibitor nachgeliefert wird, wird in der Zirkulation schließlich alle freigesetzte Elastase gebunden. Die Konzentration des PMN-Elastase/Inhibitor-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 somit hauptsächlich zur Verlaufsbeurteilung bei Trauma, Schock und Sepsis. Weitere Indikationsgebiete stellen die Bereiche Hämodialyse, Infektionen bei Geburtshilfe, Gelenkerkrankungen, Ergüsse bei Sportverletzungen, Darmerkrankungen, Pankreatitis, zystische Fibrose und Adnexaffektionen des Mannes dar.

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. Elastase
In: Thomas, L. (Hrsg.) Labor und Diagnose
Die Medizinische Verlagsgesellschaft, 4. Auflage, 1992: 795 - 801
4. Elastase, Elastase- α_1 -Proteinase Inhibitor Complex
In: Friedman, R.B., Young, D.S (Eds.) Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests
AACC Press, Washington, 3rd 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

Methodik

Das vorliegende Testbesteck ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay (ELISA) zur quantitativen Bestimmung des Komplexes aus humaner PMN-Elastase und dem α_1 -Proteinase-Inhibitor (α_1 -PI) im Plasma. Die Festphase ist mit einem ersten polyklonalen Antikörper (Hühnereigelb) gegen humane PMN-Elastase (Antigen) beschichtet.

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

Anschließend wird ein zweiter polyklonaler Antikörper zugegeben, der gegen α_1 -PI gerichtet und mit Meerrettichperoxidase markiert ist. Während einer 60-minütigen Inkubation wird der an den ersten Antikörper gebundene PMN-Elastase/ α_1 -PI Komplex von dem enzymmarkierten Antikörper spezifisch erkannt und es bildet sich ein Sandwich-Komplex aus. Überschüssiges Enzymkonjugat wird durch erneutes Waschen eliminiert.

Ein chromogenes Substrat, 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin (TMB) wird zugegeben. Während einer 20-minütigen Inkubation wird das Substrat vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt (blau) umgesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Salzsäure beendet (Farbumschlag blau → 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. Bi-chromatische Messung mit einer Referenzfilter-Wellenlänge im Bereich von 600 - 690 nm ist empfehlenswert.

Testcharakteristik

Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze wurde für PMN-Elastase mit 3 ng/ml ermittelt.

Linearität

Plasmaproben von sechs Patienten wurden unverdünnt und verdünnt mit Standard-/Probenverdünnungspuffer getestet. Der Assay ist über den gesamten Messbereich linear.

Milenia PMN-Elastase

Probe Nr.	Verdünnung	gemessene Konzentration	erwartete Konzentration	Wiederfindung [%]
		[ng/ml]	[ng/ml]	
1	8:8	114	-	-
	4:8	57,9	55,7	103
	2:8	31,8	27,8	114
	1:8	14,6	13,9	105
2	8:8	135,6	-	-
	4:8	66,5	67,8	98
	2:8	30,8	33,9	91
	1:8	18,8	16,9	111
3	8:8	255,0	-	-
	4:8	130,5	127,5	102
	2:8	61,0	63,8	96
	1:8	31,9	31,9	100
4	8:8	540,1	-	-
	4:8	246,2	270,0	92
	2:8	119,9	135,0	89
	1:8	61,7	67,5	91
5	8:8	641,8	-	-
	4:8	281,4	320,9	88
	2:8	149,7	160,4	93
	1:8	69,9	80,2	87
6	8:8	909,5	-	-
	4:8	444,5	454,7	98
	2:8	208,1	227,4	92
	1:8	100,4	113,7	88

Reproduzierbarkeit

Nachfolgende Variationskoeffizienten (VK) wurden für die Intra-Assay-Varianz auf der Basis einer 10-fachen Bestimmung dreier Proben ermittelt; für die Inter-Assay-Varianz wurden die Ergebnisse aus 10 Assays für vier Proben herangezogen:

Milenia PMN-Elastase

Intra-Assay		
Probe Nr.	Mittelwert \bar{x} (ng/ml)	Variationskoeffizient VK (%)
1	80	5,2
2	241	4,7
3	358	4,6

Inter-Assay		
Probe Nr.	Mittelwert \bar{x} (ng/ml)	Variationskoeffizient VK (%)
1	128	5,7
2	216	6,4
3	346	4,4
4	681	5,7

Wiederfindung

Dem Standard/Proben-Verdünnungspuffer wurden drei unterschiedliche Mengen PMN-Elastase zugegeben (922, 615 und 478 ng/ml). 50 µl jeder Lösung wurden zu je 950 µl drei verschiedener Plasmaproben von Patienten hinzugefügt (Verdünnungsverhältnis von 1:20), um die Plasma-Matrix der Proben möglichst intakt zu lassen. Alle Proben wurden dann mit dem Milenia PMN-Elastase Test gemessen.

Milenia PMN-Elastase

Probe	Lösung	Gemessene Werte	Erwartete Werte	Wiederfindung [%]
		[ng/ml]	[ng/ml]	
1	-	23,2	-	-
	A	72,4	69,4	104
	B	59,3	54,1	109
	C	49,6	47,2	101
2	-	30,6	-	-
	A	73,4	76,7	96
	B	59,3	61,4	97
	C	56,8	54,4	104
3	-	61,7	-	-
	A	118,0	107,8	109
	B	100,8	92,5	109
	C	94,8	85,6	110

Effekte von Bilirubin und Hämolyse

Um unterschiedlich schwere Gelbsucherkrankungen vorzutäuschen, wurden 100 bzw. 200 mg/l Bilirubin zu vier Proben hinzugegeben. Alle Proben wurden pur und gespikt mit dem PMN-Elastase Test untersucht; dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Milenia PMN-Elastase

Probe	Unverdünnt	100 mg/l Bilirubin	200 mg/l Bilirubin
		[ng/ml]	[ng/ml]
1	100	106	104
2	249	245	261
3	572	575	534
4	903	964	910

Die Ergebnisse zeigen, daß schwere Gelbsucht (bis zu 200 mg/l Bilirubin) den Test nicht beeinflusst.

Im Normalfall können hämolytische Proben eingesetzt werden. In Einzelfällen kann die Hämolyse zu einer Erhöhung der Werte führen (gleichzeitiger Zerfall von Granulozyten *in vitro*).

Kurzanleitung: Milenia PMN-Elastase

(alle Volumenangaben in μl)

MT-Platten-Well	ng/ml	A	B	C	D	E	F	G	H	Kontrolle 1/2	Probe
		0	15,6	31,3	62,5	125	250	500	1000		
Schritte	Lösung										
Pipettieren	Standard	100	100	100	100	100	100	100	100		-
Pipettieren	Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
Pipettieren	verdünnte Probe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
60 min bei RT auf einem Schüttler inkubieren											
Dekantieren 4x mit 300 μl Waschlösung waschen											
Pipettieren	Enzym-Konjugat	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
60 min bei RT auf einem Schüttler inkubieren											
Dekantieren 4x mit 300 μl Waschlösung waschen											
Pipettieren	Substrat-Lösung	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
20 min bei RT im Dunkeln inkubieren											
Pipettieren	Stopp-Lösung	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Messen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$											

Vgl. auch Seite 20 für eine detaillierte Beschreibung der Testdurchführung.