

Arbeitsanleitung / Manual

Pankreatische Amylase ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung der humanen pankreatischen Amylase
in Stuhl*

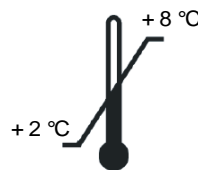
Pancreatic amylase ELISA Kit

*For the in vitro determination of human pancreatic amylase in
stool*

Gültig ab / valid from 21.10.2010



K 6410



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

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of contents	2
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	5
8. VORBEREITUNG DES PROBENMATERIALS	5
9. TESTDURCHFÜHRUNG	8
HINWEISE	8
PIPETTIERSHEMA	8
10. ERGEBNISSE	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	10
12. QUALITÄTSKONTROLLE	10
ERWARTETE ERGEBNISSE	10
13. TESTCHARAKTERISTIKA	10
SENSITIVITÄT	10
14. LITERATUR	10
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11

Table of content	Seite/Page
	2
1. INTENDED USE	14
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	14
4. MATERIAL SUPPLIED	15
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
7. PRECAUTIONS	16
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
9. ASSAY PROCEDURE	18
PROCEDURAL NOTES	18
TEST PROCEDURE	18
10. RESULTS	20
11. LIMITATIONS	20
12. QUALITY CONTROL	20
EXPECTED VALUES	20
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
SENSITIVITY	21
14. REFERENCES	21
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	21

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **pankreatischer Amylase** aus Stuhl. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die **pankreas Amylase** wird wie die Lipase und Elastase von der Pankreas synthetisiert.

Einige Krankheitsbilder sind mit einer Pankreasinsuffizienz assoziiert (Alkoholismus, Unfalltrauma, Fibrose).

In der Laborroutine bestätigt sich die **pankreatische Amylase** als echte Alternative zur Elastase-I in der Stuhldiagnostik.

Indikation:

- Chronische Pankreatitis
- Exokrine pankreatische Insuffizienz

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung der **pankreatischen Amylase** im Stuhl. In diesem ELISA wird die **pankreatische Amylase** aus den Proben an die auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper (Fangantikörper) gebunden. Gebundene pankreatische Amylase wird mit einem POD-markiertem monoklonalen Antikörper umgesetzt. Die gebundene Peroxidase menge ist dem Amylase-Gehalt direkt proportional. Als Substrat wird TMB eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K 6410MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 6410WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6410K	CONJ	Konjugat (Maus anti Amylase, peroxidase-markiert)	1 x 30 µl
K 6410ST	STD	Standards, lyophilisiert (0; 440; 1750; 7000; 28000 mU/l)	1 x 5 vials
K 6410 KO	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	1 x 1 vial
K 6410TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6410AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Auf Wunsch erhalten Sie bei Bedarf 3 weitere Standardsets kostenlos. Jedes weitere Standardset wird berechnet.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm

*Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055µS/cm bei 25°C (≤18,2MΩ cm).

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C. Der **WASHBUF** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

Der verdünnte Waschpuffer dient als Extraktionspuffer (siehe Probenvorbereitung).

- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrolle) werden mit **250 µl** Reinstwasser rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen.
- Das **CONJ** (POD-Antikörper) wird **1:1000** in Waschpuffer verdünnt (10 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Der **unverdünnte POD-Antikörper** ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Antikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H₂SO₄ verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlprobenextraktion

1a. Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 0,75 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	0,75 ml
Verdünnungsfaktor:	1:50

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **0,75 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstecken in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) Das Röhrchen solange mischen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist

darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres „einweichen“ (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.

- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens (türkiser Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Bei dem Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

1b. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim (Best. Nr. 10 745 804 322)

Alternativ kann ein anderes Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet werden. Bei dem Roche Probenvorbereitungssystem werden 100 mg Stuhlprobe in 5 ml Extraktionspuffer mit Hilfe eines Vibrationsmischers (z. B. Vortex) homogenisiert. Anschließendes Zentrifugieren wird empfohlen.

Verdünnung I (1a. oder 1b.):

1:50

Probenverdünnung

Stuhlproben

Der Überstand nach der Zentrifugation (Verdünnung I) wird **1:40 mit Waschpuffer** (WASHBUF) verdünnt. Zum Beispiel:

25 µl Überstand (Verdünnung I) + 975 µl WASHBUF = 1:40 (**Verdünnung II**)

100 µl des Überstandes der **Verdünnung II** wird im Test pro Vertiefung eingesetzt.

Die Stuhlsuspension ist nicht haltbar. Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen.

Rohstuhlproben können bei –20°C 4 Wochen gelagert werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.

Pipettierschema

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.

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

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **Je 100 µl STD** (Standards), **CTRL** (Kontrolle) und **SAMPLE** (vorbereitete Proben) pro Vertiefung in Doppelwerten pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100 µl verdünntes CONJ** (POD-Antikörper) in jede Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **100 µl SUB** (Substrat) pro Vertiefung pipettieren.

8. **10-20 Minuten** (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubieren.
9. **50 µl STOP** (Stopplösung) pro Vertiefung zugeben und kurz mischen.
10. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von **450 nm** messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (**STD**) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von **405 nm** wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

10. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion
Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).
2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung
Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.
3. Gewichtete Spline-Funktion
Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

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

Stuhlproben

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **2000** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

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

12. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Erwartete Ergebnisse

Normwerte:

Pankreatische Amylase (Stuhl): >1000 U/l

Graubereich: 1000 – 1500 U/l

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Sensitivität

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

Probe	Pankreatische Amylase Mittelwert [OD]	Standardab- weichung	Nachweis- grenze [mU/l]
1	0.065	0.03	237

14. LITERATUR

1. Bishop, M. et al. (1996) *Pancreas*, 13(3):226-30
2. Katschinsky, M. et al. (1997) *Pancreas*, 15(2):1991-200

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humansenen verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller- der Immundiagnostik AG zurück zu senden.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis

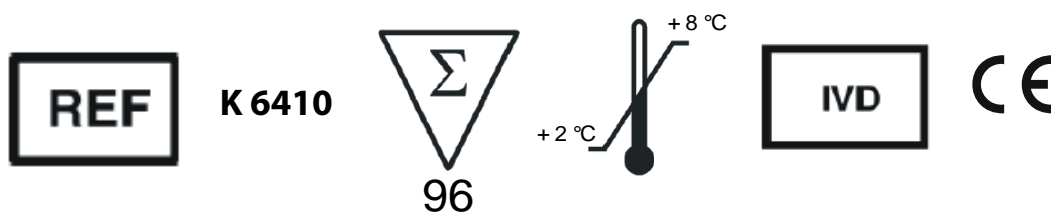


Chargenbezeichnung

Pancreatic amylase ELISA Kit

For the in vitro determination of human pancreatic amylase in stool

Valid from 21.10.2010



1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of **pancreatic Amylase** in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Like lipase and elastase the **pancreatic amylase** is synthesized in the pancreas. In case of a chronic pancreatitis, **pancreatic amylase** is decreased. Some forms of disease (alcoholism, accidental trauma) are associated with a pancreatic insufficiency. In the routine laboratory **pancreatic amylase** has proved itself to be a genuine alternative to Elastase-I in stool diagnosis.

Indication

- Chronic pancreatitis
- Exocrine pancreas insufficiency

3. PRINCIPLE OF THE TEST

In a first incubation step, the pancreatic amylase in the samples is bound to monoclonal mouse antibodies (in excess), which are immobilized to the surface of the microtiter wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, an anti-Pancreatic Amylase (POD-monoclonal antibody) antibody is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the substrate, tetramethylbenzidine (TMB) is added. An acidic stop solution is then added to stop the reaction. The colour converts from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of Pancreatic Amylase in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using results obtained from the calibrators. Pancreatic amylase, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

The combination of two specific antibodies in the pancreatic amylase ELISA drastically reduces the possibility of wrong-negatives results and offers a secure diagnostic system to the user.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Label	Kit Components	Quantity
K 6410MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8
K 6410WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6410K	CONJ	Conjugate (mouse anti-pancreatic amylase, peroxidase-labeled)	1 x 30 µl
K 6410ST	STD	Calibrators, lyophilized (0; 440; 1750; 7000; 28000 mU/l)	1 x 5 vials
K 6410 KO	CTRL	Control, lyophilized	1 x 1 vial
K 6410TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	1 x 15 ml
K 6410AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

On request we will send you 3 calibrator sets free of charge. Any further calibrator sets will be charged.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm

*Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0,2 µm) with an electrical conductivity of 0,055µS/cm at 25°C (≤18,2MΩ cm).

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, make sure that the reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- The **ELISA WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be dissolved at 37°C in a water bath before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** could be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**

The diluted wash buffer is used as an extraction buffer (see Sample preparation).

- The **lyophilized STD** (standards) and **CTRL** (control) are stable **at 2-8°C** until the expiry date stated on the label. The **STD** (standards) and **CTRL** (control) must be reconstituted with **250 µl** of ultra pure water. Allow the vial content to dissolve for **10 minutes** and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution.
- The **CONJ** (POD antibody) must be diluted **1:1000** in wash buffer (10 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The antibody is stable at 2 -4 °C until expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and could not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label.

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.

- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SAMPLE PREPARATION

Extraction of the stool sample

1a. Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instruction for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the used amount of stool sample and the volume of the buffer.

SAS with 0.75 ml Buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	0.75 ml
Dilution Factor:	1:50

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw Stool Sample has to be thawed. For remarkably inhomogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) **Fill the empty sample tube** with **0.75 ml** of ready-to-use extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert yellow dipstick into sample. The lower part of the dipstick exhibits notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off and leave 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for app. 10 minutes improves the result.

- e) Allow sample to stand for app. 10 minutes until sediment has settled down. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the turquoise ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure, the sediment will not be dispersed again.

1b. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany (Cat. No. 10 745 804 322)

Alternatively, other stool sample preparation kits (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) can be used. In the Roche sample preparation kit, 100 mg of stool sample are suspended in 5 ml of extraction buffer using a vibrator mixer (e.g. Vortex mixer). Centrifugation of the suspension is recommended.

Dilution I (1a. or 1b.)

1:50

Dilution of samples

Stool samples

The supernatant of the centrifugation (dilution step I) is diluted **1:40 in wash buffer** (WASHBUF). For example:

25 µl supernatant of dilution I + 975 µl WASHBUF = 1:40 (**dilution step II**)

For analysis, pipette **100 µl** of the supernatant of **dilution step II** per well.

The supernatant is not stable and can not be stored. We recommend to weight fresh sample amount for a new assay, if the analysis should be repeated.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components have been defined by the producer. Any variations of the test procedure, without consulting the producer with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well.

Wash the PLATE (precoated microtiter plate) 5 x with 250 µl ELISA diluted wash buffer. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.

Carry out the tests in duplicate.

1. Add **100 µl STD** (standards), **CTRL** (control) and **SAMPLE** (prediluted patient samples) in duplicate into the respective well.
2. Incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature.
3. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250µl** diluted ELISA wash buffer. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
4. Add **100 µl of diluted CONJ** (peroxidase-labeled anti-pancreatic amylase antibody).
5. Incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature.
6. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250µl** diluted ELISA wash buffer. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
7. Add **100 µl of SUB** (TMB substrate).
8. Incubate for **10-20 minutes** at room temperature.
9. Add **50 µl of STOP** (stop solution) and mix shortly.
10. Determine **absorption** immediately with an ELISA reader at **450 nm**. If the highest extinction of the standards (**STD**) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

10. RESULTS

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

1. 4-parameter-algorithm

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

2. Point-to-point-calculation

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

3. Spline-algorithm

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

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

Faeces

Multiply the result with **2000** to get the real concentration of Pancreatic Amylase in the corresponding sample.

11. LIMITATIONS

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

12. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Expected values

Pancreatic Amylase (stool):	> 1000 U/l
Grey area	1000 – 1500 U/l

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

The detection limit was defined as $B_0 + 2SD$.

n=20

Sample	Pancreatic Amylase Mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [mU/l]
1	0.065	0.030	237

14. REFERENCES

1. Bishop et al.: 1996; *Pancreas*, 13 (3), 226
2. Katschinsky et al.: 1997; *Pancreas*, 15 (2), 1991

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.

- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

10/28/2010 Amylase__15112004.DOC

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number