

IDK[®] Pankreatische Elastase ELISA Kit

*Zur in-vitro-Bestimmung der humanen pankreatischen
Elastase in Stuhl*

IDK[®] Pancreatic Elastase ELISA Kit

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

Gültig ab / Valid from 2015-07-22

REF K 6915



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Probenstabilität und -lagerung</i>	4
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	4
<i>Probenverdünnung</i>	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Spezifität</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
<i>Spike-Wiederfindung</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung der humanen pankreatischen Elastase in Stuhl geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Pankreas-Elastase ist eine anionische Endoprotease aus der Familie der Serinproteasen mit einem Molekulargewicht von 26 kDa. Sie wird zusammen mit anderen Verdauungsenzymen als inaktives Proenzym in den Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse gebildet und in den Zwölffingerdarm abgegeben. Nach ihrer Aktivierung spaltet die Pankreas-Elastase Peptide nach neutralen Aminosäuren.

Während der Darmpassage liegt die Pankreas-Elastase an Gallensalze gebunden vor und wird nicht abgebaut. Sie ist in menschlichem Stuhl fünf- bis sechsfach höher konzentriert als im Pankreassaft. Die Stuhlkonzentration spiegelt die sekretorische Leistungsfähigkeit der Bauchspeicheldrüse wieder.

Indikationen

- Diagnose/Ausschluss von exokriner Pankreasinsuffizienz bei unklaren Durchfällen, Verstopfung, Fettstühlen, Blähungen, Gewichtsverlust, Oberbauchschmerzen sowie Nahrungsmittelunverträglichkeiten
- Überwachung der exokrinen Pankreasfunktion bei Mukoviszidose, Diabetes mellitus oder chronischer Bauchspeicheldrüsenentzündung

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6915	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6915	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6915	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5x	1 x 100 ml
K 6915	CONJ	Konjugatkonzentrat (Maus-anti-Pankreaselastase)	1 x 200 µl
K 6915	STD	Standards, lyophilisiert	4 x 5 vials
K 6915	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 6915	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6915	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6915	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* 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 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits 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.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** 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 bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Der **WASH-BUF** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml *IDK Extract®* + 150 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 auf. Das **IDK Extract®** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract®*) ist bei **2–8°C drei Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **Standards (STD)** und **Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben** für die Standards und Kontrollen sind dem **Datenblatt** zu entnehmen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können nicht aufbewahrt werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat (1:101 verdünntes CONJ) ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenstabilität und -lagerung

Laut Literatur beträgt die Stabilität von pankreatischer Elastase im **Rohstuhl** 3 Tage bei Raumtemperatur [5], 3 Tage bei 4–8°C [1] und bis zu einem Jahr bei -20°C [1].

Stuhlextrakt ist bei Raumtemperatur (15–30°C) drei Tage, bei 2–8°C sowie bei -20°C sieben Tage haltbar. Die Extrakte sollten maximal einem Einfrier-/Auftauzyklus unterzogen werden.

Stuhlprobenextraktion

Der **verdünnte Extraktionspuffer IDK Extract®** wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

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 1,5 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	1,5 ml
Verdünnungsfaktor:	1:100

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 **1,5 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer *IDK Extract®* **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (orangefarbenes 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 (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnung I **1:100***Probenverdünnung*

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:100 mit Waschpuffer** weiterverdünnt. Hierfür kann eine der folgenden beiden Verdünnungsmöglichkeiten gewählt werden:

Version A (von Immundiagnostik empfohlen):

- **100 µl** Überstand (Verdünnung I) + **900 µl** Waschpuffer, mischen = **1:10 (Verdünnung IIa)**
- **100 µl** Verdünnung IIa + **900 µl** Waschpuffer = **1:10 (Verdünnung IIIa)**. Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von 1:10 000.

100 µl der **Verdünnung IIIa** im Test pro Vertiefung einsetzen.

Version B:

Alternativ kann die 1:100-Weiterverdünnung in einem Schritt durchgeführt werden. Zum Beispiel:

- **10 µl** Überstand (Verdünnung I) + **990 µl** Waschpuffer, mischen = **1:100 (Verdünnung IIb)**. Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von 1:10 000.

100 µl der **Verdünnung IIb** im Test pro Vertiefung einsetzen.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung der pankreatischen Elastase im Stuhl. In diesem ELISA wird die pankreatische Elastase aus den Proben an auf Mikrotiterplatten fixierte monoklonale Antikörper gebunden. Während eines Waschschrtes werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundene pankreatische Elastase wird mit Hilfe eines peroxidasemarkierten Antikörpers (Maus-anti-humane-Pankreaselastase) spezifisch detektiert. Nach einem weiteren Waschschrte wird das Substrat TMB auf die Mikrotiterplatte gegeben und durch die Peroxidase umgesetzt. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Positionen für **STD / SAMPLE / CTRL** (Standard / Probe / Kontrollen) im Protokollblatt markieren.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen, nicht verwendete können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	100 µl STD / SAMPLE / CTRL in die Mikrotiterstreifen pipettieren
2.	Streifen abdecken und 30 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren
3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
4.	100 µl Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren
5.	Streifen abdecken und 30 min. bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren
6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
8.	10–20 min* bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren
9.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
10.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbum-

schlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

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

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

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 und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

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 Stuhlprobenkonzentration wird mit dem **Verdünnungsfaktor 10000** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungs-

faktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{LoB} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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 Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

Referenzwerte im Stuhl^[4]

1 g Stuhl entspricht 1 ml.

> 200 µg/ml	Normalwert
100 - 200 µg/ml	leichte bis mittlere exokrine Pankreasinsuffizienz
< 100 µg/ml	exokrine Pankreasinsuffizienz

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu folgenden Serumproteinen gefunden:

- Pankreaslipase
- Chymotrypsin
- Pankreasamylase
- Pankreatin
- Calprotectin

Analytische Sensitivität

Die Leerwert-Obergrenze (*limit of blank*, LoB) wurde gemäß der Richtlinie CLSI EP17-A2 bestimmt und ist 0,66 ng/ml.

*Präzision und Reproduzierbarkeit***Intra-Assay (n = 20)**

Probe	Pankreatische Elastase [ng/ml]	VK [%]
1	568,4	4,6
2	424,9	5,6

Inter-Assay (n = 12)

Probe	Pankreatische Elastase [ng/ml]	VK [%]
1	449,1	7,7
2	379,7	9,2

Wiederfindung in der Verdünnung

Drei Proben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 3)

Probe	Verdünnung	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]
A	–	235,0	235,0
	1:2	117,5	115,0
	1:4	58,8	64,9
	1:8	29,4	36,3
B	–	171,0	171,0
	1:2	85,5	92,3
	1:4	42,8	49,4
	1:8	21,4	28,3
C	–	177,0	177,0
	1:2	88,5	90,1
	1:4	44,3	52,2
	1:8	22,1	27,4

Spike-Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen Pankreas-Elastasemengen versetzt und gemessen (n = 2).

Probe	Ungespikete Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]
A	21,3	35,7	57,0	55,5
	21,3	26,6	47,9	42,4
	21,3	18,4	39,7	34,0
B	33,2	35,7	68,9	61,6
	33,2	26,6	59,8	51,0
	33,2	18,4	51,6	47,4

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- 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 ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK®* und *IDK Extract®* sind Marken der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Nandhakumar, N. & Green, M.R., 2010. Interpretations: How to use faecal elastase testing. Archives of disease in childhood. *Education and practice edition*, **95**(4), pp.119–23.
2. Whitcomb, D.C. & Lowe, M.E., 2007. Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive diseases and sciences*, **52**(1), pp.1–17.
3. Dominici, R. & Franzini, C., 2002. Fecal elastase-1 as a test for pancreatic function: a review. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, **40**(4), pp.325–32.
4. Löser, C., Möllgaard, A. & Fölsch, U.R., 1996. Faecal elastase 1: a novel, highly sensitive, and specific tubeless pancreatic function test. *Gut*, **39**(4), pp.580–6.
5. Stein, J. et al., 1996. Immunoreactive elastase I: clinical evaluation of a new noninvasive test of pancreatic function. *Clinical chemistry*, **42**(2), pp.222–6.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Verwendbar bis

Manual

IDK[®] Pancreatic Elastase ELISA Kit

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

Valid from 2015-07-22

REF K 6915



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
<i>Sample stability and storage</i>	19
<i>Extraction of the stool samples</i>	19
<i>Dilution of samples</i>	20
7. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Specificity</i>	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Analytical Sensitivity</i>	24
<i>Spiking Recovery</i>	25
<i>Dilution recovery</i>	25
12. PRECAUTIONS	26
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	27

1. INTENDED USE

The described assay is intended for the quantitative determination of human pancreatic elastase in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Pancreatic elastase is an anionic endoprotease of the serine protease family with a molecular weight of 26 kDa. Together with other digestive enzymes it is synthesized as an inactive pro-enzyme in the acinar cells of the pancreas and is secreted into the duodenum. After its activation, pancreas elastase cleaves peptides after neutral amino acids.

Pancreas elastase is mainly bound to bile salts during intestinal passage and is not degraded. In human feces it is 5–6 fold more concentrated than in pancreatic juice. The stool concentration reflects the secretory capacity of the pancreas.

Indications:

- Diagnosis/exclusion of exocrine pancreas insufficiency in case of unexplained diarrhea, constipation, steatorrhea, flatulence, weight loss, upper abdominal pain, and food intolerances
- Monitoring of exocrine pancreas function in cystic fibrosis, diabetes mellitus, or chronic pancreatitis

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6915	PLATE	Holder with pre-coated strips	12 x 8 wells
K 6915	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 6915	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract®</i> , 2.5 x	1 x 100 ml
K 6915	CONJ	Conjugate concentrate (mouse anti pancreatic elastase)	1 x 200 µl
K 6915	STD	Standard, lyophilized	4 x 5 vials
K 6915	CTRL1	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K 6915	CTRL2	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K 6915	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 6915	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* 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 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to 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 redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate IDK Extract®** has to be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals must be redissolved at 37 °C in a water bath. The **IDK Extract®** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract®*) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for three months**.

- The **lyophilized standards** (STD) and **controls** (CTRL) are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution details** are given in the **data sheet**. **Reconstituted standards and controls are not stable and cannot be stored.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until expiry date stated on the label. **Conjugate (1:101 diluted CONJ) is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample stability and storage

According to literature, the stability of pancreatic elastase in **raw stool** is 3 days at room temperature [5], 3 days at 4–8 °C [1], and up to a year at -20 °C [1].

Stool extract is stable at room temperature (15–30 °C) for three days, at 2–8 °C as well as at -20 °C for seven days. Avoid more than one freeze-thaw cycle.

Extraction of the stool samples

Diluted extraction buffer IDK Extract® is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

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

Stool sample tube – Instructions for use

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

SAS with 1.5 ml extraction buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	1.5 ml
Dilution Factor:	1:100

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 particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, ino-

cultation loop or similar device.

- b) Fill the **empty sample tube** with **1.5 ml** of ready to use *IDK Extract*® extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (orange part of cap) to open. Insert the orange dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has 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, leaving 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 ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution I: 1:100

Dilution of samples

After centrifugation, the supernatant of the sample preparation procedure (dilution I) is diluted **1:100 in wash buffer**. For this purpose, one of the two following dilution procedure variants can be used:

Variant A (recommended by Immundiagnostik):

- **100 µl** supernatant (dilution I) + **900 µl** wash buffer, mix well = **1:10 (dilution IIa)**
- **100 µl** dilution IIa + **900 µl** wash buffer, mix well = **1:10 (dilution IIIa)**. This results in a final dilution of 1:10 000.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution IIIa** per well.

Variant B:

Alternatively, the 1:100 dilution can be done in one step. For example:

- **10 µl** supernatant (dilution I) + **990 µl** wash buffer, mix well = **1:100 (dilution IIb)**. This results in a final dilution of 1:10 000.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution IIb** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is intended for the quantitative determination of pancreatic elastase in stool. In a first incubation step, the pancreatic elastase in the samples is bound to monoclonal antibodies, immobilized to the surface of the microtiter wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a peroxidase-labeled conjugate (mouse anti pancreatic elastase) is added which recognizes specifically the bound pancreatic elastase. After another washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, tetramethyl-benzidine (TMB), which reacts with the peroxidase. An acidic stop solution is added to stop the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of pancreatic elastase. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. Pancreatic elastase present in the patient samples is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30°C) and mix well.

Mark positions for **STD/SAMPLE/CTRL** (standard / sample / controls) in the protocol sheet.

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips covered at 2–8°C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (standard / sample / controls) into respective well.
2.	Cover the strips and incubate for 30 min at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker.
3.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.

4.	Add 100 µl conjugate to each well.
5.	Cover the strips and incubate for 30 min at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker.
6.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
7.	Add 100 µl SUB (TMB substrate) in each well.
8.	Incubate for 10-20 minutes* at room temperature (15-30 °C) in the dark.
9.	Add 100 µl STOP (ELISA stop solution) and mix well.
10.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using 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 standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the

duplicate values should be evaluated manually.

Stool samples

Multiply the result by the **dilution factor of 10000** to obtain the concentration of pancreatic elastase in the sample.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed 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.

Reference range

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

Reference range in stool samples^[4]

1 g stool is equivalent to 1 ml.

> 200 µg/ml	normal value
100 - 200 µg/ml	slight to moderate exocrine pancreatic insufficiency
< 100 µg/ml	exocrine pancreatic insufficiency

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Specificity

No cross reactivity to the following proteins was observed:

- Pancreatic lipase
- Chymotrypsin
- Pankreatic amylase
- Pancreatin
- Calprotectin

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

Sample	Pancreatic elastase [ng/ml]	CV [%]
1	568.4	4.6
2	424.9	5.6

Inter-Assay (n = 12)

Sample	Pancreatic elastase [ng/ml]	CV [%]
1	449.1	7.7
2	379.7	9.2

Analytical Sensitivity

The LoB (limit of blank) was evaluated according to the guideline CLSI EP17-A2 and resulted in 0.66 ng/ml.

Spiking Recovery

Two samples were spiked with different pancreatic elastase concentrations and measured using this assay (n = 2).

Sample	Unspiked Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	expected [ng/ml]	measured [ng/ml]
A	21.3	35.7	57.0	55.5
	21.3	26.6	47.9	42.4
	21.3	18.4	39.7	34.0
B	33.2	35.7	68.9	61.6
	33.2	26.6	59.8	51.0
	33.2	18.4	51.6	47.4

Dilution recovery

Three samples were diluted and analysed. The results are shown in the table below (n = 3):

Sample	Dilution	expected [ng/ml]	measured [ng/ml]
A	–	235.0	235.0
	1:2	117.5	115.0
	1:4	58.8	64.9
	1:8	29.4	36.3
B	–	171.0	171.0
	1:2	85.5	92.3
	1:4	42.8	49.4
	1:8	21.4	28.3
C	–	177.0	177.0
	1:2	88.5	90.1
	1:4	44.3	52.2
	1:8	22.1	27.4

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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 ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- IDK® and IDK Extract® are trademarks of Immundiagnostik AG.

- 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Nandhakumar, N. & Green, M.R., 2010. Interpretations: How to use faecal elastase testing. Archives of disease in childhood. *Education and practice edition*, **95**(4), pp.119–23.
2. Whitcomb, D.C. & Lowe, M.E., 2007. Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive diseases and sciences*, **52**(1), pp.1–17.
3. Dominici, R. & Franzini, C., 2002. Fecal elastase-1 as a test for pancreatic function: a review. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, **40**(4), pp.325–32.
4. Löser, C., Möllgaard, A. & Fölsch, U.R., 1996. Faecal elastase 1: a novel, highly sensitive, and specific tubeless pancreatic function test. *Gut*, **39**(4), pp.580–6.
5. Stein, J. et al., 1996. Immunoreactive elastase I: clinical evaluation of a new noninvasive test of pancreatic function. *Clinical chemistry*, **42**(2), pp.222–6.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> test
	Lot number		Use by