

Arbeitsanleitung / Manual

# Pankreatische Amylase ELISA Kit

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

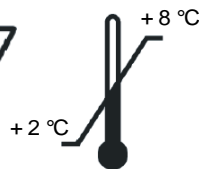
# Pancreatic amylase ELISA Kit

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

Gültig ab / valid from 06.03.2008



K 6410



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

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

|   |            |
|---|------------|
| Table of content  | Seite/Page |
|   | 2          |
| <b>1. INTENDED USE</b>                                  | <b>13</b>  |
| <b>2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST</b>           | <b>13</b>  |
| <b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>                         | <b>13</b>  |
| <b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>                             | <b>14</b>  |
| <b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>            | <b>14</b>  |
| <b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>           | <b>15</b>  |
| <b>7. PRECAUTIONS</b>                                   | <b>15</b>  |
| <b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>           | <b>16</b>  |
| FAECES  | 16         |
| <b>9. ASSAY PROCEDURE</b>                               | <b>16</b>  |
| PROCEDURAL NOTES  | 16         |
| TEST PROCEDURE  | 16         |
| <b>10. RESULTS</b>                                      | <b>18</b>  |
| TYPICAL CALIBRATION CURVE                               | 18         |
| <b>11. LIMITATIONS</b>                                  | <b>19</b>  |
| <b>12. QUALITY CONTROL</b>                              | <b>19</b>  |
| EXPECTED VALUES   | 19         |
| <b>13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>                  | <b>20</b>  |
| SENSITIVITY   | 20         |
| <b>14. REFERENCES</b>                                   | <b>20</b>  |
| <b>15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b> | <b>20</b>  |

## 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 Stuhlidiagnostik.

### 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 Peroxidasemenge 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<br>(0; 440; 1750; 7000; 28000 mU/l) | 5 vials    |
| K 6410 KO   | CTRL      | Kontrolle, lyophilisiert                                     | 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

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- 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 (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

## 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 bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), 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.
- 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** aqua bidest. 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 ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  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.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. VORBEREITUNG DES PROBENMATERIALS

### Stuhlproben

Ca. **100 mg** Stuhl einwiegen (die genau eingewogene Stuhlmenge notieren) und in **5 ml** des Waschpuffers lösen (sehr gut mischen). Danach wird die Suspension für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wird vor jedem Testansatz für **2 Minuten** bei 13000 rpm in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert und anschließend 1:40 mit dem Waschpuffer weiter verdünnt (z.B. 25  $\mu$ l Überstand + 975  $\mu$ l Waschpuffer). Von dieser Endverdünnung werden dann **100  $\mu$ l** in den Test eingesetzt.

Wir empfehlen den Stuhl für jede Messung frisch einzuwiegen. Stuhlsuspensionen können nicht gelagert werden.

Stuhlproben können bei  $-20^\circ\text{C}$  4 Wochen gelagert werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

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

## 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*

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

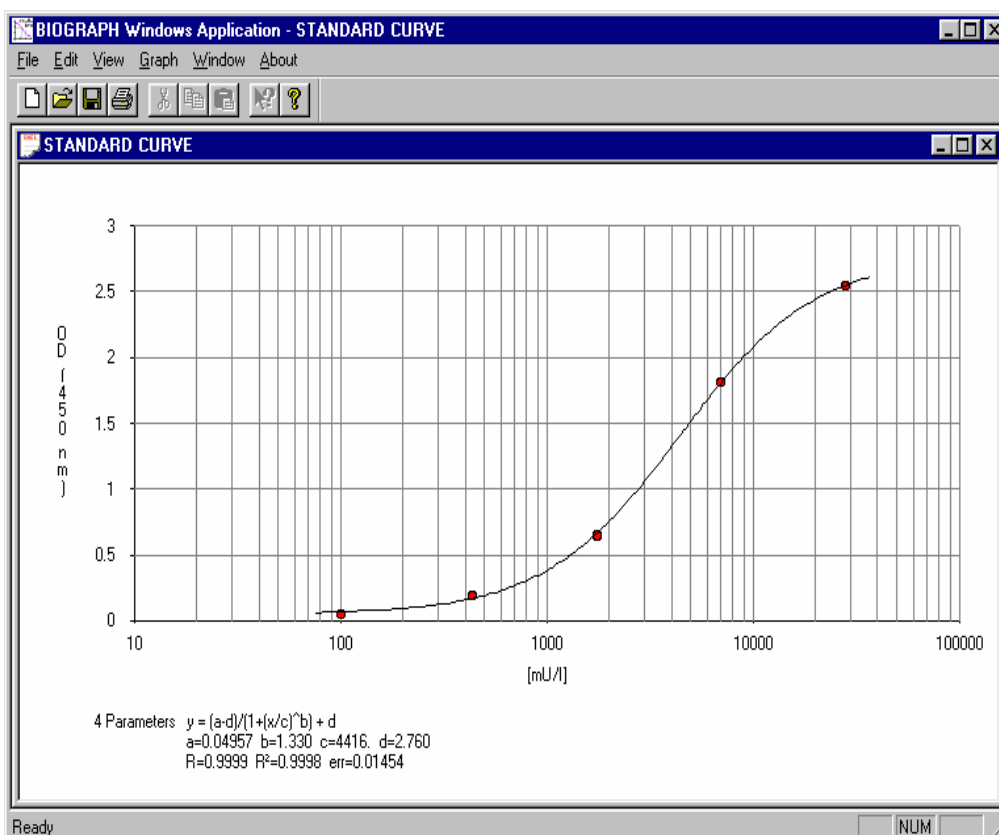
Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

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. **5-15 Minuten** (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubieren.
9. **50 µl STOP** (Stopplösung) pro Vertiefung zugeben und kurz 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.

## 10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

### Mustereichkurve



|                      |       |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Konzentration [mU/l] | 0     | 440   | 1750  | 7000  | 28000 |
| OD Mittelwert        | 0.005 | 0.195 | 0.651 | 1.812 | 2.544 |

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

## Stuhlproben

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

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

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

Verdünnungsstufe 2: 40

Verdünnungsfaktor: 62,5 x 40 = 2500

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **2500** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln. **Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.**

## 11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Pankreatische Amylase Konzentration 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<br>Mittelwert<br>[OD] | Standardab-<br>weichung | Nachweis-<br>grenze<br>[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 Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller- der Immundiagnostik zurück zu senden.

06.03.2008 Amylase\_15112004.doc

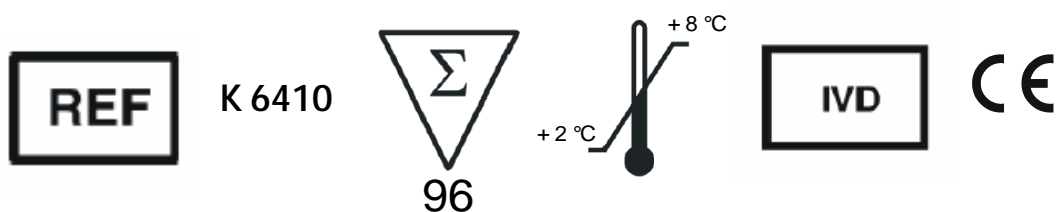
#### Verwendete Symbole:

|   |                       |  |                                      |
|---|-----------------------|--|--------------------------------------|
|  | 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 06.03.2008



## 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 $\mu$ l |
| K 6410ST  | STD     | Calibrators, lyophilized<br>(0; 440; 1750; 7000; 28000 mU/l)  | 5 vials        |
| K 6410 KO | CTRL    | Control, lyophilized  | 1 vial         |
| K 6410TMB | SUB     | TMB substrate<br>(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

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000  $\mu$ l
- 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  
(reference wave length 620 or 690 nm)

## 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 aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml a. bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved 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 **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** aqua bidest. 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. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### *Faeces*

Give about **100 mg** of the sample (please note the real weight for the calculation) to **5 ml** of the wash buffer and mix. Centrifuge the diluted sample for 10 min at 3000 rpm.

Afterwards the supernatant is diluted **1:40** in wash buffer (25 µl supernatant is added to 975 µl wash buffer). **100 µl** of this solution is used for the assay.

We recommend to weight out the stool samples for each run new. Supernatant is not stable and can't be stored.

Stool samples can be stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 4 weeks. Avoid thawing and freezing cycles.

Immundiagnostik recommends the use of the sample tubes from Roche Diagnostics for sample preparation.

## 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*

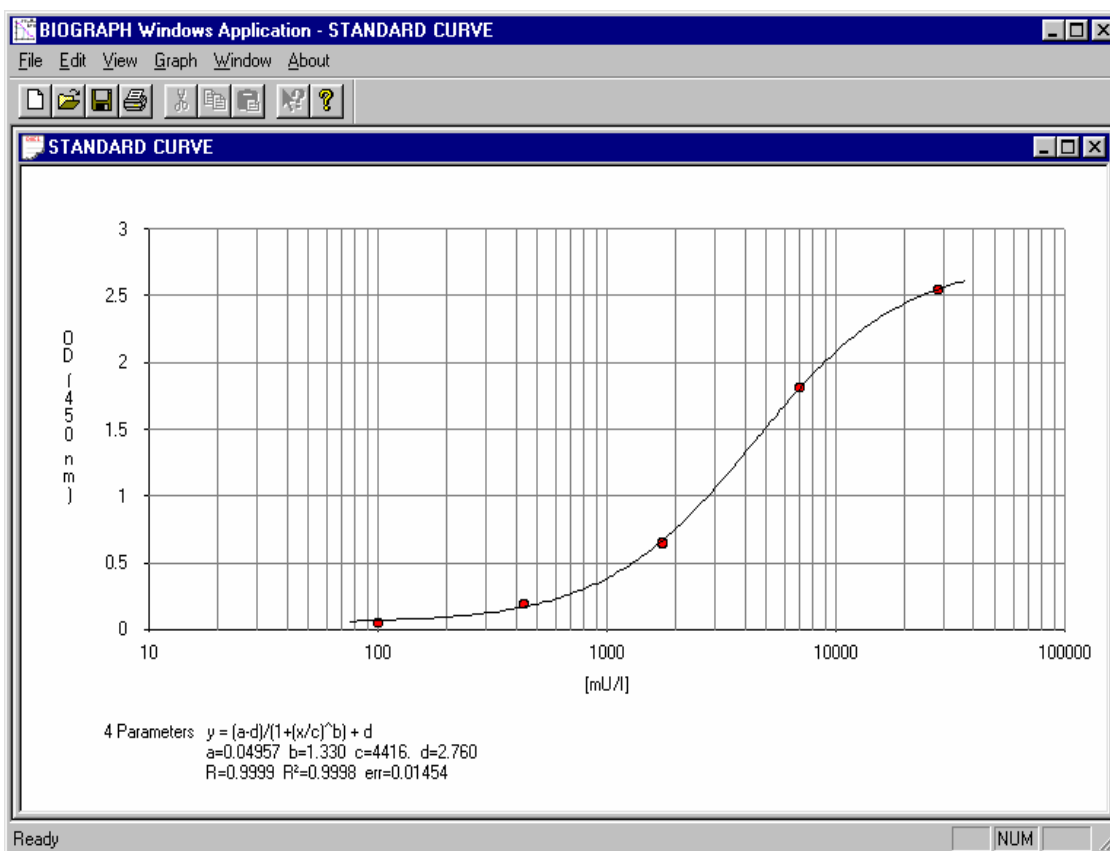
Wash the PLATE (precoated microtiter plate) 5 x with 250 µl ELISA diluted wash buffer. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper. Carry out the tests in duplicate.

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 **5-15 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** against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

## 10. RESULTS

We recommend the 4-parameter-algorithm for evaluation of the test results. Alternatively, a point-to-point-calculation or a spline-algorithm can be used. Before the automatic evaluation of the results, the plausibility of the pairs of values should be examined. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

### *Typical calibration curve*



|                      |      |       |       |       |       |
|----------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration [mU/l] | 0    | 440   | 1750  | 7000  | 28000 |
| OD Mean value        | 0.05 | 0.195 | 0.651 | 1.812 | 2.544 |

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

## Faeces

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

weight: 80 mg (1ml Stool = 1g) = 0,08 ml

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

dilution step 2: 40

dilution factor: 62,5 x 40 = 2500

Multiply the result with **2500** to get the real concentration. The dilution factor depends on the weight of the faeces.

## 11. LIMITATIONS

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

## 12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercial control samples for internal quality control.

Control samples 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<br>Mean value<br>[OD] | Standard<br>variation | Detection limit<br>[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.

3/6/2008 Amylase\_\_15112004.DOC

**Used symbols:**



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number