Arbeitsanleitung/Manual

Chymotrypsin ELISA Kit

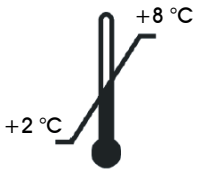
Zur in vitro Bestimmung von Chymotrypsin in Stuhlproben

Chymotrypsin ELISA Kit

For the in vitro determination of Chymotrypsin in stool

Valid from 31.03.2010

REF **K 6910**



CE

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

Table of contents

1. VERWENDUNGSZWECK 4

2. EINLEITUNG 4

3. TESTPRINZIP 4

4. INHALT DER TESTPACKUNG 5

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL 5

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN 6

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN 6

8. PROBENVORBEREITUNG 7

9. TESTDURCHFÜHRUNG 7

HINWEISE 7
PIPETTIERSCHEMA 8

10. ERGEBNISSE 9

11. EINSCHRÄNKUNGEN 9

12. QUALITÄTSKONTROLLE 10

ERWARTETE ERGEBNISSE 10

13. TESTCHARAKTERISTIKA 10

PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT 10
WIEDERFINDUNG 11
SENSITIVITÄT 11
KREUZREAKTIVITÄT 11

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST 12

Table of contents Page

1. INTENDED USE 15

2. CLINICAL RELEVANCE 15

3. PRINCIPLE OF THE TEST 15

4. MATERIAL SUPPLIED 16

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED 16

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS 17

7. PRECAUTIONS 17

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION 18

9. ASSAY PROCEDURE 18

PROCEDURAL NOTES 18
TEST PROCEDURE 19

10. RESULTS 20

11. LIMITATIONS 20

12. QUALITY CONTROL 21

EXPECTED VALUES 21

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS 21

PRECISION AND REPRODUCIBILITY 21
RECOVERY 22
SENSITIVITY 22
CROSS-REACTIVITY 22

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE 23

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **Chymotrypsin** aus Stuhl. Der Assay ist nur für in vitro Diagnostik produziert.

2. EINLEITUNG

Chymotrypsin wird als exkretorisches Pankreasenzym nach Nahrungsaufnahme in das Duodenum sezerniert und wirkt hydrolytisch auf Nahrungseiweiße. Ein geringer Anteil der aktiven Enzymform wird mit dem Stuhl, gebunden an Stuhlpartikel, ausgeschieden. Bei ausgeprägter Pankreasinsuffizienz im Verlaufe einer chronischen Pankreatitis ist die Enzymsekretion deutlich eingeschränkt, so dass erniedrigte Chymotrypsin-Konzentrationen im Stuhl gemessen werden können.

Indikation

- Verdacht auf exokrine Pankreasinsuffizienz
- Chronische Pankreatitis

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung von Chymotrypsin aus Stuhlproben. In diesem ELISA wird das Chymotrypsin aus den Proben an die auf der Mikrotiterplatte fixierten Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen Chymotrypsin erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines Detektionsantikörpers. Nach einem weiteren Waschschritt wird Peroxidase-markierter anti-Maus-Antikörper zugegeben. Die Enzymmenge ist dem Chymotrypsingehalt direkt proportional. Als Substrat wird eine TMB-Lösung eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen und anhand einer mitgeführten Eichkurve direkt quantifiziert werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Etikett	Kit Komponenten	Menge
K 6910MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 6910WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6910A2	AB	Detektionsantikörper, (Maus anti-Chymotrypsin, biotinyliert)	1 x 150 µl
K 6910K	CONJ	Konjugat (Streptavidin, Peroxidase markiert)	1 x 150 µl
K 6910VP	ABBUF	Detektionsantikörper-Verdünnungspuffer	1 x 15 ml
K 6910ST	STD	Standards, gebrauchsfertig (1000; 250; 125; 62.5; 15.6; 0 ng/ml)	6 x 250 µl
K 6910KO1	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 250 µl
K 6910KO2	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 250 µl
K 6910TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6910DI	DIL	Verdünnungspuffer	1 x 15 ml
K 6910AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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**, (z.B. der Detektionsantikörper ist in der größten Verdünnungsstufe nicht haltbar). Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- 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 auf. Das WASHBUF (Pufferkonzentrat) 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 **AB** (Detektionsantikörper, biotinyliert) wird **1:100** in **ABBUF** Detektionsantikörper-Verdünnungspuffer verdünnt (z.B. 100 µl AB + 10 ml ABBUF). Unverdünnter AB ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). Verdünnter Antikörper kann **nicht** aufbewahrt werden.
- Das **CONJ** (Konjugat, POD-markiert) wird **1:100** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat 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.

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 befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.

- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. 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 verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlproben

Ca. **100 mg** Stuhl einwiegen und 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. **1 ml des Überstandes** wird abgenommen, in ein Eppendorfröhrchen überführt und ein weiteres Mal in einer Eppendorfzentrifuge bei 13000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der erhaltene Überstand ist bei -20°C für ca. einen Monat haltbar.

Der Überstand wird vor jedem Testansatz für **2 Minuten** bei 13000 rpm in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert, hiervon werden dann **20 µl** in den Test eingesetzt.

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

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl DIL** (Verdünnungspuffer) pro Vertiefung pipettieren.
2. **20 µl STD** (Standards), **CTRL** (Kontrollen) und **Proben** in Doppelbestimmungen in die Vertiefungen pipettieren.
3. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
4. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
5. **100 µl** verdünnten **AB** (Detektionsantikörper, biotinyliert) pro Vertiefung pipettieren.
6. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
7. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8. **100 µl** verdünntes **CONJ** (Konjugat, Streptavidin-POD) pro Vertiefung pipettieren.
9. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
10. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
11. **100 µl SUB** (TMB-Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
12. **5-15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis eine ausreichend große Farbdifferenz auftritt.
13. **50 µl STOP** (Stopplösung) zusetzen und kurz mischen.
14. **Extinktion sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sofort bei 405 nm gegen 620 nm (oder 690 nm) messen.

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. 0.001).

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 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).

   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 Chymotrypsin Konzentration der Stuhlprobe wird wie im folgenden Beispiel berechnet:

Einwaage:	80 mg (1ml Stuhl = 1g) = 0,08 ml
Verdünnungsstufe 1:	5ml / 0,08ml = 62,5
Verdünnungsfaktor:	62,5

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **62,5** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

Hinweis: Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Chymotrypsin Konzentration größer dem größten Standard sollten mit Waschpuffer weiter verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz 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

Referenzwerte

Stuhl: > 6,4 µg/ml Mittelwert ermittelt bei Immundiagnostik AG (n= 80)

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Eine zwei Proben wurden 20-mal in einem Chymotrypsin ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 20

Probe	Chymotrypsin, Mittelwert [ng/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	24,20	3,7
2	16,35	6,9

Inter-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von einer Probe wurde an unterschiedlichen Tagen innerhalb von drei Monaten geprüft. Die Probe wurde 31-mal von drei verschiedenen Personen in zwei Chymotrypsin-ELISA-Chargen gemessen.

Inter-Assay VK n= 31

Probe	Chymotrypsin, Mittelwert [ng/ml]	Inter-Assay Vk [%]
1	101,8	5,3

Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit bekannten Konzentrationen von Chymotrypsin-Standard gespiked und gemessen.

Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Chymotrypsin erwatet [ng/ml]	Chymotrypsin gemessen [ng/ml]
139,5	23,7	163,2	159,2
139,5	26,2	165,7	166,2
139,5	81,3	220,8	206,0
83,9	20,0	103,9	116,1
83,9	50,0	133,9	128,0
83,9	92,5	176,4	157,9

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als B_0 + 2 SD. Gemessen wurde 28-mal der Standard null.

n = 28

Probe	Chymotrypsin Mittelwert [OD]	Standardab-weichung	Nachweis-grenze [ng/ml]
1	0,006	0,006	14,2

Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu folgenden Proteinen gefunden:

Humane Pankreasamylase
Humane Pankreaselastase
Humane Lipase
Humane PMN-Elastase

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EC hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren 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.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung	REF	Bestellnummer
IVD	In-Vitro-Diagnostikum		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Hersteller		Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung		

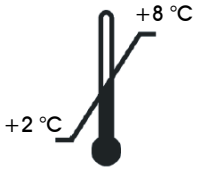
Manual

Chymotrypsin ELISA Kit

For the in vitro determination of Chymotrypsin in stool

Valid from 31.03.2010

K 6910



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

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik Assay is a sandwich Enzyme Immuno Assay intended for the quantitative determination of **Chymotrypsin** in stool. For in vitro diagnostic use only.

2. CLINICAL RELEVANCE

Chymotrypsin is a serine protease secreted from the pancreas into the duodenum after food intake. **Chymotrypsin** cleaves food proteins preferentially next to aromatic residues. A small part of the active enzyme form is excreted within the stool. In the case of pancreas insufficiency secondary to a chronic pancreatitis, the secretion of the enzyme is reduced markedly, so that a reduced chymotrypsin activity can be measured in stool specimen.

The advantage of this assay is that the concentration of the enzyme is accurately determined and not the enzyme's activity.

Many studies have shown a longer stability of **chymotrypsin** (12 days at room temperature) compared to pancreatic elastase. Therefore, the **chymotrypsin ELISA** is a reliable and low-priced alternative to the pancreatic elastase assay.

Indications

- Chronic pancreatitis
- Exocrine pancreatic insufficiency

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme Immuno Assay is a sandwich assay for the determination of Chymotrypsin in stool samples. The wells of the microtitre plate are coated with polyclonal anti-Chymotrypsin antibodies. In a first incubation step, the Chymotrypsin in the samples is bound to the coated antibodies (in excess). To remove all unbound substances, a washing step is carried out.

In a second incubation step, a second anti-Chymotrypsin antibody is bound to the antigen. After another washing step, the solid phase is incubated with a peroxidase labelled antibody and then with the peroxidase substrate, Tetramethylbenzidine (TMB). The colour converts to yellow by the addition of an acidic stop solution. The intensity of the yellow color is directly proportional to the Chymotrypsin concentration of the sample. A dose response curve of the absorbance (at 450 nm) unit vs. concentration is generated. Chymotrypsin, present in the patient samples, is determined directly from this calibration curve.

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

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 6910MTP	PLATE	one holder with precoated strips	96
K 6910WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6910A2	AB	Detection antibody, (Mouse anti-Chymotrypsin)	1 x 150 µl
K 6910K	CONJ	Conjugate (Streptavidin, peroxidase labeled)	1 x 150 µl
K 6910VP	ABBUF	Detection antibody dilution buffer	1 x 15 ml
K 6910ST	STD	Calibrators, ready-to-use (1000; 250; 125; 62.5; 15.6; 0 ng/ml)	6 x 250 µl
K 6910KO1	CTRL	Control, ready-to-use	1 x 250 µl
K 6910KO2	CTRL	Control, ready-to-use	1 x 250 µl
K 6910TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 6910DI	DIL	Dilution buffer	1 x 15 ml
K 6910AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- 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 or 405 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay**. 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.

- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua 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. The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.

- The **AB** (detection antibody, biotinylated) must be diluted **1:100** in **ABBUF** (detection antibody dilution buffer; e.g. 100 µl AB + 10 ml ABBUF). The undiluted AB is stable at -20°C until the expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**

- The **CONJ** (conjugate, POD-antibody) must be diluted **1:100** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The undiluted CONJ is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not 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**.

7. PRECAUTIONS

- 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 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.

- 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 spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Faeces

Weigh ca. **100 mg** of the sample, note the exact sample amount, add **5 ml** of the wash buffer and mix well.

Centrifuge the sample suspension for **10 min** at 3000 rpm. Transfer **1 ml of the supernatant** into an Eppendorf tube and centrifuge again at 13000 rpm for 5 min. The resulting supernatant can be stored at -20°C for about one month.

Centrifuge the supernatant at 13000 rpm for **2 min** before use. Use **20 µl** of the final centrifuged supernatant in the assay.

Immundiagnostik recommends the use of the sample tubes from Boehringer / Mannheim for sample preparation.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Quality control guidelines should be followed.
- 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.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

The precoated microtiter strips have to be washed **5 x with 250 µl** wash buffer before use. Bring all reagents to room temperature. Mix reagents well before use. Avoid direct sun light during all incubation steps. Covering the microtitre plate during the different incubation steps is recommended. Carrying out the tests in duplicate is also recommended.

1. Add **100 µl** of **DIL** (dilution buffer) into each well.
2. Pipette **20 µl** of **STD** (standards), **CTRL** (controls) or **samples** into each well.
3. Incubate for **1 hour** at room temperature shaking on a horizontal mixer.
4. Decant the contents of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** of wash buffer.
5. Add **100 µl** of diluted **AB** (detection antibody) solution.
6. Incubate for **1 hour** at room temperature shaking on a horizontal mixer.
7. Decant the contents of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** of wash buffer.
8. Add **100 µl** of diluted **CONJ** (conjugate) solution.
9. Incubate for **1 hour** at room temperature shaking on a horizontal mixer.
10. Decant the contents of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** of wash buffer.
11. Add **100 µl** of **SUB** (TMB-substrate) solution.
12. Incubate for **5 - 15 minutes** at room temperature in the dark until sufficient coloring is achieved.
13. Add **50 µl** of **STOP** (stop solution) and mix shortly.
14. 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 measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (or 690 nm) as reference.

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 optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.001).

2. Point-to-point-calculation

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

3. Spline-algorithm

   We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.001).

   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.

Faecal samples

The Chymotrypsin concentration of faecal specimen can be calculated as shown in the following example:

Weight:	80 mg (1ml stool = 1g) = 0.08 ml
Dilution step 1:	5 ml / 0.08 ml = 62.5
Dilution factor:	62.5

Multiply the results with the calculated dilution factor (in this case 62.5) to get the Chymotrypsin concentration of the stool samples.

Note: The dilution factor depends on the weight of the used faecal specimen.

11. LIMITATIONS

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

12. QUALITY CONTROL

Control samples or serum pools should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of the 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

Reference range

Stool: > 6.4 µg/ml mean made by Immundiagnostik (n=80)

The reference value should be used as a guideline only. It is recommended that each laboratory establishes an own expected range for its patient population.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay-Variation

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik Chymotrypsin ELISA test was calculated from 20 replicate determinations on each one of two samples.

Intra-Assay CV n= 20

Sample	Chymotrypsin, mean value [ng/mll]	Intra-Assay CV [%]
1	24,20	3,7
2	16,35	6,9

Inter-Assay-Variation

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik Chymotrypsin ELISA test was calculated from data on one sample obtained in 31 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of three months.

Inter-Assay CV n= 31

Sample	Chymotrypsin, mean value [ng/ml]	Inter-Assay CV [%]
1	101,8	5,3

Recovery

Two samples were spiked with different Chymotrypsin calibrator amounts and measured with the assay.

Recovery n=2

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Chymotrypsin expected [ng/ml]	Chymotrypsin measured [ng/ml]
139,5	23,7	163,2	159,2
139,5	26,2	165,7	166,2
139,5	81,3	220,8	206,0
83,9	20,0	103,9	116,1
83,9	50,0	133,9	128,0
83,9	92,5	176,4	157,9

Sensitivity

The sensitivity limit was set as B_0 + 2 SD. The Zero-standard was measured 28 times.

n=28

Sample	Chymotrypsin mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [ng/ml]
1	0,006	0,006	14,2

Cross-reactivity

No cross-reactivity was observed to the following proteins:
Human pancreatic amylase
Human pancreatic elastase
Human lipase
Human PMN-elastase

14. 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 test package are to be used for in-vitro diagnostics only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- 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 should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:

Temperature limitation

Catalogue Number

In Vitro Diagnostic Medical Device

Contains sufficient for <n> tests

Manufacturer

Use by

Lot number