Arbeitsanleitung/Manual

Chymotrypsin Aktivität Kit

Zur in vitro Bestimmung der Chymotrypsin Aktivität in Stuhl

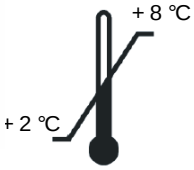
Chymotrypsin Activity Kit

For the in vitro determination of Chymotrypsin activity in stool

Gültig ab/valid from 07.09.2005

K 6990

20



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

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene fotometrische Test ist für die Aktivitätsbestimmung von Chymotrypsin in Stuhl geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Chymotrypsin ist ein pankreasspezifisches eiweißspaltendes Enzym. Es wird in der Bauchspeicheldrüse produziert und in den Dünndarm abgegeben. Chymotrypsin gilt als Leitenzym bei der **exokrinen Pankreasinsuffizienz im Rahmen einer chronischen Pankreatitis**. Der Nachweis von Chymotrypsin im Stuhl ist ein aussagekräftiger Parameter für Pankreasfunktionsstörungen und hat den Vorteil einer nicht-invasiven Probenentnahme. Der Aufwand einer Chymotrypsin-Bestimmung ist gering im Vergleich mit einem Pankreolauryltest oder einem Sekret-Pankreozymtest.

Mit unserem spektralfotometrischen Chymotrypsin-Test bestimmen Sie die **Chymotrypsin-Aktivität**. Patienten mit Verdauungsstörungen, die auf einer Störung der Bauchspeicheldrüsenfunktion beruhen könnten, werden häufig mit Pankreasenzymen substituiert. Solche Medikamente müssen mindestens 5 Tage vor Gewinnung der Stuhlprobe abgesetzt werden. Auch Abführmittel sollten vorher nicht eingenommen worden sein. Falsch niedrige Chymotrypsin-Aktivitätswerte sind bei Diarrhö, eiweißarmer Ernährung oder Verschlussikterus zu erwarten, falsch normale Werte bei nicht abgesetzter Enzymsubstitution. Sehr hohe Werte geben Hinweis auf Gärungszustände bzw. eine erhöhte Darmsaftsekretion (z.B. bei Enterocolitis).

Indikation

- Exokrine Pankreasinsuffizienz im Rahmen einer chronischen Pankreatitis

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6990SUB	SUB	Substrat, lyophilisiert	20 x 2 ml
K 6990KA	CTRLA	Kontrolle A, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 500 µl
K 6990KB	CTRLB	Kontrolle B, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 500 µl

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- 10 mm Einweg - Küvetten
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Spektralphotometer zur Messung von Kinetiken bei 405 nm (Hg)
- Solvens (1000 ml) Best.-Nr. K 6990SOL
- Probenvorbereitungssystem (z.B. Roche Best.-Nr. 745 804)

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Lyophilisiertes **Substrat** (SUB) ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Substrat wird mit **2000 µl** aqua bidest. rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Danach Flasche sorgfältig verschließen und Inhalt durch Schwenken, Kippen oder Drehen vollständig lösen. Das rekonstituierte Substrat ist bei 2-8 °C fünf Tage und bei 15-25 °C zwei Tage haltbar.

- Lyophilisierte **Kontrollen** (CTRL) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Kontrollen** (CTRL) werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Danach Flasche sorgfältig verschließen und Inhalt durch Schwenken, Kippen oder Drehen vollständig lösen. Die rekonstituierten Kontrollen können nicht gelagert werden.

6. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlprobenextraktion

- Wir empfehlen die Verwendung vom **Solvens** (Best.-Nr. K 6990SOL) als **Probenextraktionspuffer** und das Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 745 804)). In diesem Stuhlaufarbeitungssystem wird 100 mg Stuhlprobe dosiert und in 10 ml Solvens suspendiert.

  Solvensvolumen konstant: 10 ml

  Verdünnungsfaktor konstant: 1:100

- Sollte nicht mit dem Probenvorbereitungssystem gearbeitet werden, so wird zur Stuhlprobe die hundertfache Menge an Solvens zugefügt (z.B. eingewogene Menge **120 mg Stuhl + 12,0 ml Solvens**).

  Anschließend wird die Stuhlprobe mit dem Solvens gut gemischt (z. B. Vortexer für mindestens 30 sec. je nach Stuhlkonsistenz).

  Danach wird ca. 1 ml von der Suspension in ein verschließbares Einweggefäß (z. B. von Eppendorf) überführt und für 5 Minuten bei 13000 g zentrifugiert.

Probenverdünnung

Stuhlproben

100 µl des Überstandes wird ohne weitere Verdünnung im Test pro Küvette eingesetzt.

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

Chymotrypsinaktivität im Stuhl ist innerhalb von 10 Tagen bei Raumtemperatur praktisch konstant.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Succ-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA + H_2O $\xrightarrow{\text{Chymotrypsin}}$ Succ-Ala-Ala-Pro-Phe + p-Nitroanilin

Pipettierschema

Der Test sollte entweder bei 25 °C oder bei 37 °C durchgeführt werden (Siehe Kontrollblatt)
100 µl CTRL (Kontrolle A, Kontrolle B) oder Probe in eine Küvette pipettieren
2000 µl Substrat in die gleiche Küvette pipettieren, gut mischen
Nach ca. 1 Minute bei 405 nm Extinktion ablesen und gleichzeitig Stoppuhr starten. Nach genau weiteren 1, 2 und 3 Minuten Ablesung wiederholen

8. ERGEBNISSE

Aus den Extinktionsdifferenzen pro min (ΔE/min) Mittelwert bilden und diesen in die Berechnung einsetzen.

Berechnung:

Die Aktivität des Chymotrypsins in der Probe aus der Tabelle entnehmen oder berechnen nach:

U/g Stuhl = 212 x ΔE_{405}/min

Chymotrypsin Aktivitätswerte für Messung bei Hg 405 nm

ΔE/min	U/g	ΔE/min	U/g	ΔE/min	U/g
0,001	0,2	0,013	2,8	0,045	9,5
0,002	0,4	0,014	3,0	0,050	10,6
0,003	0,6	0,015	3,2	0,055	11,7
0,004	0,8	0,016	3,4	0,060	12,7
0,005	1,1	0,017	3,6	0,065	13,8
0,006	1,3	0,018	3,8	0,070	14,8
0,007	1,5	0,019	4,0	0,075	15,9
0,008	1,7	0,020	4,2	0,080	17,0
0,009	1,9	0,025	5,3	0,085	18,0
0,010	2,1	0,030	6,4	0,090	19,0
0,011	2,3	0,035	7,4	0,095	20,1
0,012	2,5	0,040	8,5	0,100	21,2

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Die Verdünnungsgrenze liegt bei der Extinktionsdifferenz ΔE/min = 0,100 für die Messzeit von 3 Minuten. Bei höheren Aktivitäten 0,1 ml Überstand mit 0,4 ml Solvens mischen und Bestimmung wiederholen. Aktivität des Chymotrypsins in der Probe = **Ergebnis x 5**.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

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

Erwartete Ergebnisse

Referenzwerte

(1g Stuhl entspricht 1ml)

	25°C	37°C
Normalbereich	> 6 U/g	> 13,2 U/g
Kontrollbedürftiger Bereich	3 – 6 U/g	6,6 – 13,2 U/g
Pathologischer Bereich	< 3 U/g	< 6,6 U/g

H. Goebbel et al. *Labormedizin*, Supplement 1 (1985) 8-10

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- 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 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.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Reagenzien nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien vermeiden.
- Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- 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, zurück zu senden.

15. LITERATUR

H. Goebbel et al. *Labormedizin*, Supplement 1 (1985) 8-10

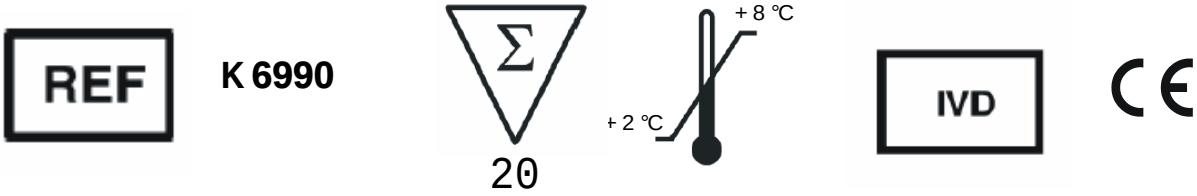
14.11.2005 26012005Chymo.doc

Manual

Chymotrypsin Activity Kit

For the in vitro determination of Chymotrypsin activity in stool

Valid from September 7th, 2005



1. INTENDED USE

The described photometric kit is intended for the activity determination of Chymotrypsin in stool. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Chymotrypsin is a pancreas specific proteolytic enzyme. It is produced in the pancreas and excreted in the small intestine. Chymotrypsin is involved in **exocrine pancreas insufficiency in the case of a chronic pancreatitis**. The detection of chymotrypsin in stool is a strong, indicative parameter for pancreas function disorder and has the advantage of only requiring a non-invasive sampling. The time, effort and expense in a chymotrypsin determination is significantly low when compared to the pancreolauryl or pancreozymin-secretin test.

The **chymotrypsin activity** can be determined with our spectral-photometric chymotrypsin test. Patients with digestive disturbances as a result of pancreas function disorder are often supplemented with pancreatic enzymes. Such medication must be discontinued at least 5 days before the stool sample is collected. Laxatives should also not be taken before the sample collection. False low chymotrypsin activity levels can be expected in the case of diarrhoea, low-protein diet or obstructive jaundice, whereas false normal level by non-discontinued enzyme substitution. Very high levels are indicative of a fermentation or an increased intestinal fluid secretion (e.g. by enterocolitis).

Indication

- Exocrine pancreas insufficiency in the case of a chronic pancreatitis

3 MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 6990SUB	SUB	Substrate, lyophilized	20 x 2 ml
K 6990KA	CTRLA	Control A, lyophilized (range see specification)	4 x 500 µl
K 6990KB	CTRLB	Control B, lyophilized (range see specification)	4 x 500 µl

4 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- 10 mm one way cuvette
- Spectral photometer for measurement kinetics at 405 nm (Hg)
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Sample preparation system (e.g. Roche Catalog No. 745 804)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- The lyophilized **substrate** SUB) is stable at **2-8 °C** until expiry date stated on the label. Substrate must be reconstituted with **2000 µl** aqua bidest. Allow to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. The reconstituted substrate is stable at 2-8 °C for 5 days and at 15- 25 °C for 2 days.

- The lyophilized **controls** (CTRL) are stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Controls must be reconstituted with **500 µl** aqua bidest. Allow to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted controls are **not stable**.

6. SAMPLE PREPARATION

Extraction of the stool sample

- We recommend to use the solvens buffer (Catalogue No. K 6990SOL) as a **sample extraction buffer** and a stool sample preparation kit for dosing 100 mg of stool sample (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; cat # 745804). The stool sample must be suspended in 10 ml solvens buffer.

  Constant buffer volume: 10 ml

  Constant dilution factor: 1:100

- If the sample preparation kit is not used, the weighed stool sample must be diluted 100-fold with solvens buffer (e.g. **120 mg stool sample + 120 ml of solvens buffer**).

  Mix the stool suspension with the solvens on a vortexer for 30 sec.

  Transfer the suspension into an Eppendorf tube and centrifuge for 5 min. at 13000 g.

Dilution of samples

Stool samples

Pipette **100 µl** of the supernatant per cuvette for analysis,.

The stool suspension is not stable and can not be stored. We recommend to weigh fresh sample if the analysis should be repeated.

The Chymotrypsin activity in stool is constant for 10 days at room temperature.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

Succ-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA + H_2O $\xrightarrow{\text{Chymotrypsin}}$ Succ-Ala-Ala-Pro-Phe + p-Nitroanilin

Test procedure

Run the assay either at 25 °C or at 37 °C (see data sheet)
Add 100 µl of CTRL (control A, control B) or sample into the respective cuvette.
Add 2000 µl SUB (substrate) into each cuvette.
Determine the extinction after approximate 1 min at 405 nm and start the stop watch simultaneously. Determine the extinction again after exactly 1, 2 and 3 min.

8. RESULTS

The mean is calculated from the extinction difference pro min (ΔE/min)

Calculation:

The chymotrypsin activity of the sample is given in the table below. It can be calculated as described in the following example:

U/g Stool = 212 x ΔE_{405}/min

Chymotrypsin activity values for measurement at Hg 405 nm

ΔE/min	U/g	ΔE/min	U/g	ΔE/min	U/g
0,001	0,2	0,013	2,8	0,045	9,5
0,002	0,4	0,014	3,0	0,050	10,6
0,003	0,6	0,015	3,2	0,055	11,7
0,004	0,8	0,016	3,4	0,060	12,7
0,005	1,1	0,017	3,6	0,065	13,8
0,006	1,3	0,018	3,8	0,070	14,8
0,007	1,5	0,019	4,0	0,075	15,9
0,008	1,7	0,020	4,2	0,080	17,0
0,009	1,9	0,025	5,3	0,085	18,0
0,010	2,1	0,030	6,4	0,090	19,0
0,011	2,3	0,035	7,4	0,095	20,1
0,012	2,5	0,040	8,5	0,100	21,2

9. LIMITATIONS

The dilution limit is defined by extinction difference of ΔE/min = 0,100 for detection time of 3 min. If the sample activity is higher, mix 0.1 ml suspension with 0.4 ml of solvens buffer and re-assay the sample. To calculate the chymotrypsin activity of the sample **multiply the obtained value by 5**.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

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

Normal ranges

(1g stool corresponds to 1 ml)

	25°C	37°C
normal range	> 6 U/g	> 13,2 U/g
grey area	3 – 6 U/g	6,6 – 13,2 U/g
pathological range	< 3 U/g	< 6,6 U/g

H. Goebbel et al. *Labormedizin*, Supplement 1 (1985) 8-10

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

12. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Quality control guidelines should be observed.
- 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.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- Avoid foaming when mixing 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 put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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 shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

H. Goebbel et al. *Labormedizin*, Supplement 1 (1985) 8-10