













Pancreatic Elastase ELISA

Enzymimmunoassay zum quantitativen Nachweis von Pankreas-Elastase
in Stuhlproben humanen Ursprungs

REF G09038 $\nabla \Sigma$ 96
IVD In-vitro Diagnostikum **CE**

 **Seramun Diagnostica GmbH** • Spreehagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

UDI Eindeutige Produktidentifizierung	IVD In-vitro Diagnostikum	 Hersteller
 Land der Herstellung und Datum der Herstellung	 Nicht wiederverwenden	SN Seriennummer
 Begrenzung der Luftfeuchtigkeit	 Vor Sonnenlicht schützen	REF Artikelnummer
 Gebrauchsanweisung beachten	 Verwendbar bis	LOT Chargennummer
 Ausreichend für n Prüfungen	 Biologisches Risiko	 Temperaturbereich
		 Achtung

Zweckbestimmung

Pancreatic Elastase ELISA ist ein IVD-Test zur quantitativen Bestimmung von Pankreas-Elastase in Stuhlproben humanen Ursprungs durch einen Fachanwender in Laborumgebung.

Der Test wird angewendet in Kombination mit den Zubehören Stuhlaufbereitungskit von Bioserv Diagnostics GmbH (GZ3008) bzw. Stool Preparation Kit von Seramun Diagnostica GmbH (ACS-001) oder Extraktionspuffer (10x) von Bioserv Diagnostics GmbH (G09038P01) bzw. Extraction buffer (10x) von Seramun Diagnostica GmbH (ACS-002).

Er dient der Diagnosehilfe von exokriner Pankreasinsuffizienz in Proben von Patienten mit Symptomen einer exokrinen Pankreasinsuffizienz.

Der Test darf nicht verwendet werden mit anderen Materialien als Stuhlproben humanen Ursprungs, zu Screening, Überwachung, Vorhersage, Diagnose, Prognose, als therapiebegleitendes Diagnostikum, in patientennaher Umgebung und durch Laienanwender.

Testprinzip

Pancreatic Elastase ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf Basis der Doppelsandwichtechnik der quantitativen Bestimmung von pankreatischer Elastase in humanen Stuhlproben dient.

Die Kavitäten der ELISA-Platte sind mit polyklonalen Antikörpern beschichtet, die im ersten Inkubationsschritt durch eine Antikörper-Antigen-Bindung humane Pankreas-Elastase-Moleküle aus Patientenproben immobilisieren. Im zweiten Inkubationsschritt werden mit Biotin markierte polyklonale Antikörper zugegeben, die an die immobilisierte humane Pankreas-Elastase binden. Im dritten Inkubationsschritt bindet das Streptavidin-Peroxidase (HRP)-Konjugat an Biotin. Um ungebundene Komponenten zu entfernen, erfolgt nach jedem Inkubationsschritt ein Waschschritt.

Die Peroxidase des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats setzt im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Endprodukt um. Die Farbreaktion wird nach einer definierten Zeit durch Zugabe von 0,25 M Schwefelsäure (H₂SO₄) abgestoppt. Die bei 450 nm Mess- und 620 nm Referenzfilter gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Pankreas-Elastase direkt proportional.

Testkomponenten (Lieferumfang)

			Für 96 Kavitäten
1		Mikrotiterplatte beschichtet mit polyklonalen anti-Pankreas-Elastase-Antikörpern (Kaninchen)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten, vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2		Washpuffer (10x) Phosphat-basierter Puffer	2 x 100 mL Konzentrat, farblos für 2 x 1000 mL Lösung, weiße Kappe
3		Standards 1 – 4 STD 1 50 µg/g STD 2 100 µg/g STD 3 200 µg/g STD 4 500 µg/g	Je 0,7 mL, gebrauchsfertig, farblos farblose Kappe weiße Kappe gelbe Kappe blaue Kappe
4		Kontrolle 1 70 - 110 µg/g	0,7 mL, gebrauchsfertig, farblos braune Kappe
5		Kontrolle 2 160 - 240 µg/g	0,7 mL, gebrauchsfertig, farblos, grüne Kappe

6	CONJ BIOTIN (201x)	Elastase-Antikörper biotinyliert (201x) biotinylierte, polyklonale anti-Pankreas-Elastase-Antikörper (Kaninchen)	0,12 mL, Konzentrat, farblos für 24 mL Lösung, rote Kappe
7	CONJ STREPT	Streptavidin-Konjugat	8,0 mL, gebrauchsfertig, rötlich gefärbt, lila Kappe
8	SUBSTR	Substrat < 0,1 % 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	13 mL, gebrauchsfertig, farblos, blaue Kappe
9	STOP	Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure	13 mL, gebrauchsfertig, farblos, gelbe Kappe
10	DIL BOTTLE	Leerflasche für die Verdünnung der biotinylierten anti-Pankreas-Elastase-Antikörper	unbefüllt, rote Kappe
11		Gebrauchsanleitung	1 Stück
12		Analysenzertifikat	1 Stück

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette • 8 Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen • 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät • Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und 620 nm Referenzfilter • deionisiertes Wasser • Messzylinder • Teströhrchen für die Probenverdünnung • Feinwaage zum Einwiegen des Stuhles • Stool Preparation Kit (GZ3008 / ACS-001) oder Extraktionspuffer (10x) (G09038P01 / ACS-002) • Wärme-/Brutschrank

Wichtige Hinweise



Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* diagnostischen Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden.

Die Gebrauchsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck und seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Komponenten aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt.

Alle im Zusammenhang mit Pancreatic Elastase ELISA auftretenden schwerwiegenden Vorkommnisse sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem Anwender und/oder Patient niedergelassen sind, zu melden.

Hinweise zur Testdurchführung

Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Alle Testkomponenten vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen.

Bei größeren Probenreihen empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette, um Zeitverzögerungen zu vermeiden.

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und die Dauer der Inkubationsschritte sind einzuhalten.

Die Durchführung der Absaug- und Waschschriffe kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Washers oder einer Wasserstrahlpumpe erfolgen.

Beim Waschvorgang dispensierten, verdünnten Waschpuffer mindestens 5 s einwirken lassen und Waschpufferreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen!

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Sicherheitshinweise


Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.

Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten.

Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potenziell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Zusätzliche Informationen über die Angaben in dieser Gebrauchsanleitung hinaus finden sich im Sicherheitsdatenblatt.

Das Produkt enthält folgende gefahrenbestimmende Substanz/en:

Testkomponente	Gefahrenkennzeichnung und ergänzende Angaben zu Inhaltsstoffen
WELLS	Enthält Material tierischen Ursprungs.
WASHBUF (10x)	-
STD 1 - 4	Enthält Material tierischen Ursprungs.
CONTROL 1	Enthält Material tierischen Ursprungs.
CONTROL 2	Enthält Material tierischen Ursprungs.
CONJ BIOTIN (201x)	Enthält Material tierischen Ursprungs.
CONJ STREPT	Enthält Material tierischen Ursprungs.
SUBSTR	EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
STOP	Gefahrbestimmende Komponente: Schwefelsäure 2,5 % Signalwort: Achtung  H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

Grenzen der Methode

Bei Umgebungstemperaturen über 40 °C sollten Patientenproben gekühlt oder gefroren transportiert werden (siehe Probenhaltbarkeit und -lagerung). Wässrige Stuhlproben können aufgrund des Verdünnungseffektes falsch niedrige Resultate ergeben. Bei wässrigem Stuhl sollte versucht werden, eine andere Probe mit festerer Konsistenz zu erhalten. Falls dies nicht möglich ist, kann der Stuhl pipettiert werden (10 µL wässriger Stuhl + 1 mL Extraktionspuffer (1x)). Da auf Grund der Verdünnung des Stuhls die Gefahr falsch pathologischer (falsch niedriger) Werte besteht, muss die Konsistenz vermerkt und im Falle eines pathologischen Befundes der Test mit einer formbaren Stuhlprobe wiederholt werden.

Es ist möglich, dass es bei einer Substitution mit Proteinen aus Schweinepankreas zu Kreuzreaktionen kommt. Eine Substitutionstherapie kann daher möglicherweise zu unterbrechen sein. Eine sichere Erkenntnis hinsichtlich der Notwendigkeit des Absetzens einer Substitutionstherapie vor Durchführung des Tests liegt nicht vor.

Behandlung der Proben

Probennahme

Stuhl in geeignetem Probenentnahmegefäß sammeln.

Probenhaltbarkeit und -lagerung

Stuhlproben können bei verschiedenen Temperaturen für folgende Zeitspannen aufbewahrt werden:

<u>Native humane Stuhlproben</u>		<u>Extrahierte Probenüberstände</u>	
<u>Lagerung</u>	<u>Dauer</u>	<u>Lagerung</u>	<u>Dauer</u>
2...8 °C	7 Tage	2...8 °C	3 Tage
20...22 °C	5 Tage	-18...-27 °C	1 Monat
40 °C	2 Tage		

Stuhlproben und extrahierter Probenüberstand können bis zu zweimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, darüber hinaus sollten die Proben bei Bedarf portioniert werden, um zu häufige Frier-Tau-Zyklen zu vermeiden.

Probenvorbereitung

Bei Probeneinwaage:

1. Vorbereitung des Extraktionspuffers (10x) (G09038P01/ACS-002) durch 1 : 10 Verdünnung (= 1+9) mit deionisiertem Wasser (z.B. 50 mL Extraktionspuffer (10x) + 450 mL deionisiertes Wasser)
2. Vermischung von Stuhlproben humanen Ursprungs 1 : 101 mit dem Extraktionspuffer (1x) (z.B. 10 mg Stuhl + 1 mL Extraktionspuffer (1x)).
3. Homogenisieren der Proben mit Hilfe eines Rotationsschüttlers und anschließende Sedimentation der festen Bestandteile.
4. Abnahme der Überstände nach 15 – 30 min Sedimentation bei Raumtemperatur oder alternativ bei 2...8 °C über Nacht.

Bei Verwendung des Stuhlaufbereitungskits:

Optional zur Einwaage der Stuhlproben kann das Stool Preparation Kit (GZ3008/ACS-001) verwendet werden, entsprechend der Gebrauchsanleitung.

Finale Probenverdünnung:

Die Überstände werden 1 : 201 (1+200) mit Waschpuffer (1x) (z.B. 25 µL Überstand + 5 mL Waschpuffer (1x)) verdünnt. Die so hergestellten Probenverdünnungen sind nun gebrauchsfertig für den Einsatz im Test.

Hinweis: Wenn im Extraktionspuffer oder im Waschpuffer Salzkristalle ausgefallen sind, sollten diese vor Gebrauch durch leichtes Schütteln und Erwärmen im Wasserbad bei 30 – 35 °C aufgelöst werden. Für spätere Untersuchungen können die abgenommenen Überstände bei ca. -18 °C bis zu 4 Wochen gelagert werden. Es ist unbedingt notwendig, dass bei der Lagerung die Überstände vom Sediment getrennt werden.

Behandlung der Reagenzien

Reagenzienhaltbarkeit und -lagerung

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzienflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zum aufgedruckten Verfalldatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 3 Monate haltbar. Der verdünnte Extraktionspuffer ist bei 2...8 °C bis zu 1 Monat haltbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2...8 °C bis zu 1 Monat haltbar. Die gebrauchsfertige Verdünnung des Biotin-Konjugates ist vorzugsweise vor jedem Testansatz frisch herzustellen. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Lagerung bei 2...8 °C bis zu 1 Monat möglich ist.

Reagenzienvorbereitung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminiumbeschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen.

Waschpuffer (10x) 1 : 10 mit deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 mL Waschpuffer (10x) + 90 mL deionisiertes Wasser.

Das konzentrierte Biotin-Konjugat (201x) mit Waschpuffer (1x) 1 : 201 verdünnen. Für das Ansetzen des gebrauchsfertigen Biotin-Konjugates die im Kit enthaltene Leerflasche mit rotem Deckel verwenden. Achtung: Leerflasche ist nur zum einmaligen Gebrauch bestimmt!

Beispiele: (1 Teil Biotin-Konjugat (201x) + 200 Teile Waschpuffer (1x)).

– 5 µL Biotin-Konjugat (201x) in 1 mL Waschpuffer (1x) (für 2 Mikrotitrationsstreifen)

– 25 µL Biotin-Konjugat (201x) in 5 mL Waschpuffer (1x) (für 10 Mikrotitrationsstreifen)

Testdurchführung

1. Testreagenzien und benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je 50 µL Blank (=Nullstandard bzw. verdünnter Waschpuffer)
50 µL

STD	1 - 4
-----	-------

 Standards 1-4
50 µL

CONTROL	1
---------	---

 Kontrolle 1
50 µL

CONTROL	2
---------	---

 Kontrolle 2
50 µL extrahierte und verdünnte Stuhlproben pipettieren.
3. Platte 60 min bei 37°C inkubieren.
4. Dekantieren und 3-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 50 µL

CONJ BIOTIN

 verdünntes Biotin-Konjugat pro Kavität pipettieren.
6. Platte 30 min bei 37°C inkubieren.
7. Dekantieren und 3-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 50 µL

CONJ STREPT

 Streptavidin-Konjugat pro Kavität pipettieren.
9. Platte 30 min bei 37°C inkubieren.
10. Dekantieren und 3-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
11. 100 µL

SUBSTR

 Substrat pro Kavität pipettieren.
12. 20 min **lichtgeschützt** bei 37°C inkubieren.
13. 100 µL

STOP

 Stopplösung pro Kavität pipettieren, kurz schütteln.
14. Messen der OD bei 450 nm Mess- und 620 nm Referenzfilter mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min.

Auswertung der Ergebnisse

Quantitative Auswertung

Es wird eine Standardkurve durch Auftragen der gemessenen Extinktionen der Standards 1-4 (y-Achse) gegen die entsprechenden Antigenkonzentrationen (x-Achse) konstruiert.

Zur Erstellung der Standardkurve werden die lineare Regression oder das 4-Parameter-Regressionsmodell empfohlen.

Anhand der Standardkurve werden die gemessenen Extinktionen der verdünnten Proben in µg Pankreas-Elastase/g Stuhl (Antigenkonzentration in µg/g Stuhl) umgewandelt. Die angegebenen Konzentrationen der Standards berücksichtigen bereits den regulären Verdünnungsfaktor der Stuhlprobenüberstände von 1 : 201.

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- OD-Mittelwert Blank (= Nullstandard bzw. verdünntem Waschpuffer) < 0,15
- Konzentrationsmittelwert Kontrolle 1 zwischen 70 µg/g und 110 µg/g
- Konzentrationsmittelwert Kontrolle 2 zwischen 160 µg/g und 240 µg/g

Sind die genannten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Die Abarbeitung muss gemäß Gebrauchsanleitung erfolgen (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, ist der Hersteller zu kontaktieren.

Interpretation der Ergebnisse

Normale exokrine Pankreas-Funktion	> 200 µg Elastase/g Stuhl
Leichte bis mittelschwere exokrine Pankreas-Insuffizienz	100 – 200 µg Elastase/g Stuhl
Schwere exokrine Pankreas-Insuffizienz	< 100 µg Elastase/g Stuhl

Leistungsmerkmale

Präzision

Zur Bestimmung der Präzision (Intra-Assay-, Inter-Assay-, Lot-zu-Lot-Variationskoeffizient) wurden 8 Proben an 20 Tagen, von 2 Operatoren in Doppelbestimmung und in 3 Chargen des Pancreatic Elastase ELISA untersucht.

Probe	Intra-Assay-Variationskoeffizient		Inter-Assay-Variationskoeffizient		Lot-zu-Lot-Variationskoeffizient	
	\bar{x} µg Elastase/g Stuhl	VK (%)	\bar{x} µg Elastase/g Stuhl	VK (%)	\bar{x} µg Elastase/g Stuhl	VK (%)
1	66,6	6,4	66,6	10,2	68,8	11,2
2	91,9	2,7	91,9	7,0	93,6	8,8
3	105,9	4,2	105,9	7,6	105,9	9,3
4	200,8	3,3	200,8	9,0	201,8	9,4
5	207,5	2,8	207,5	6,6	208,3	7,1
6	319,5	3,4	319,5	7,3	319,1	8,0
7	438,3	2,6	438,3	4,8	433,6	5,9
8	506,5	2,9	506,5	6,2	499,6	8,2

Linearität

Unter Verwendung einer Charge des Pancreatic Elastase ELISA wurde ein linearer Bereich von 0,3 bis 231,6 µg Elastase/g Stuhl mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,997 ermittelt.

Nachweisgrenzen (LoB, LoD, LoQ, High-Dose-Hook-Effekt)

Der Limit of Blank (LoB) des Pancreatic Elastase ELISA wurde durch eine 80-fach Bestimmung von verdünntem Waschpuffer mit 0,6 µg Elastase/g Stuhl bestimmt. Der Limit of Detection (LoD) des Pancreatic Elastase ELISA wurde durch die 80-fach Bestimmung einer Stuhlprobenverdünnung in den Konzentrationsbereich von LoB bis 4-fachen LoB mit 4,0 µg Elastase/g Stuhl bestimmt. Der Limit of Quantification (LoQ) des Pancreatic Elastase ELISA wurde durch die Untersuchung von 5 Stuhlprobenverdünnungen in einem zuvor empirisch ermittelten Konzentrationsbereich mit 61,4 µg Elastase/g Stuhl bestimmt.

Aufgrund der sukzessiven Testabarbeitung ist ein High-Dose-Hook-Effekt ausgeschlossen, was experimentell belegt werden konnte.

Sensitivität und Spezifität

Sensitivität und Spezifität des Pancreatic Elastase ELISA wurden im Rahmen einer Vergleichsstudie zu einem kommerziell erhältlichen ELISA bestimmt.

Für die Bestimmung der Sensitivität wurde ein Probenkollektiv von n = 102 klinisch charakterisierten Stuhlproben vergleichend getestet und die Ergebnisse in folgender Vier-Felder-Tafel gegenübergestellt. Das Kollektiv setzt sich aus Patienten mit diagnostiziertem Pankreaskarzinom, Diabetes mellitus, chronischer Pankreatitis und cystischer Fibrose zusammen.

n = 102 klinische Stuhlproben	Vergleichs-ELISA > 200 µg Elastase/g Stuhl	Vergleichs-ELISA < 200 µg Elastase/g Stuhl
Pancreatic Elastase ELISA > 200 µg Elastase/g Stuhl	47	2
Pancreatic Elastase ELISA < 200 µg Elastase/g Stuhl	5	48

Sensitivität: 96,0 %.

Für die Bestimmung der Spezifität wurde eine Kohorte von n=200 gesunden Stuhlprobenspendern vergleichend getestet und die Ergebnisse in folgender Vier-Felder-Tafel gegenübergestellt.

n = 200 Stuhlprobenspender	Vergleichs-ELISA > 200 µg Elastase/g Stuhl	Vergleichs-ELISA < 200 µg Elastase/g Stuhl
Pancreatic Elastase ELISA > 200 µg Elastase/g Stuhl	195	2
Pancreatic Elastase ELISA < 200 µg Elastase/g Stuhl	1	2

Spezifität: 99,5 %.

Wiederfindung

Um Aussagen zur Wiederfindung von Konzentrationsmesswerten für den Pancreatic Elastase ELISA treffen zu können, wurde eine schwach reaktive Probe (~100 µg Elastase/g Stuhl) mit einer hochreaktiven Probe (> 300 µg Elastase/g Stuhl) im Verhältnis von 1 Teil zu 9 Teilen versetzt und die Abweichung von der errechneten Elastasekonzentration und der gemessenen Elastasekonzentration bestimmt. Dabei lag die Abweichung von der errechneten zur gemessenen Elastasekonzentration zwischen 9,0 und 16,1 %.

Kreuzreaktivität

Folgende Mikroorganismen wurden mit einer Keimzahl von $\geq 10^8$ Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro mL in Probenpuffer bzw. klinische Isolate in 1 : 20.000 Verdünnung im Pancreatic Elastase ELISA getestet. Dabei wurden keine Kreuzreaktivitäten bestimmt.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559
<i>Campylobacter fetus</i>	ATCC 27374
<i>Campylobacter jejunii</i>	ATCC 32291
<i>Campylobacter lari</i>	ATCC 35221
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	ATCC 43954
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
<i>Clostridium difficile</i>	VPI 10463
<i>Clostridium sordelli</i>	ATCC 9714
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 20481
<i>Morganella morganii</i>	ATCC 25830
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC 27337
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906

<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 49128
<i>Salmonella anatum</i>	ATCC 9270
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>thyphimurium</i>	ATCC 14028
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>galolyticus/enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Salmonella infantis</i>	ATCC 51741
<i>Salmonella paratyphi A</i>	ATCC 11511
<i>Salmonella paratyphi B</i>	ATCC 8759
<i>Salmonella paratyphi C</i>	Nr. 2 Pasteur
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813
<i>Vibrio cholerae</i>	klinisches Isolat
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:3	klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:9	klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> RK1 0803733	klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> Y11	klinisches Isolat

Interferenz

Die nachfolgend aufgelisteten Substanzen zeigten bei Zumischung zu analytischen und schwach reaktiven Stuhlproben keinen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf 30 mg Stuhlprobe:

(-)-Scopolamine n-Butylbromid (0,5 %, Buscopan®), Bariumsulfat (5 %), Biotin (0,001%) Bismuth(III)subsalicylat (0,5 %, Pepto-Bismol), Cyclamat (5 %), Diclofenac (0,5 %), Hämoglobin human (5 %), Blut human (5 %), Hylak® N (5 %), Iberogast® (5 %), Immodium® akut duo (0,12/7,5 %), Loperamid-Hydrochlorid (5 %, Loperamid-CT akut), Metronidazol (0,5 %), Mucin (5 %), Nexium® (0,25 %), Nifuroxazid (0,5 %, Pentofuryl®), Palmitinsäure (20 %), Pankreas-Pulver vom Schwein (5%, Pangrol® 25.000), Pankreas-Pulver vom Schwein (2,5%, Pankreatan® 36.000), Pankreas-Pulver vom Schwein (2,5%, Panzytrat® 40.000), Pankreatin (5%, Kreon® 35.000), Perenterol forte (0,5 %), Rennie® (20 %), Simagel® (1 %), Stearinsäure (20 %), Vancomycin (0,5 %).

Klinische Leistung

Mit dem Pancreatic Elastase ELISA wurden im Zeitraum von 2003 bis 2021 im europäischen Raum und anderen Gebieten 15 klinische Studien durchgeführt, anhand derer die klinische Leistung eindeutig festgestellt werden konnte [1-15].

Mit dem Pancreatic Elastase ELISA wurde eine Auswahl an klinischen Proben innerhalb einer externen klinischen Leistungsstudie untersucht, aus der wiederum retrospektiv folgende Leistungsparameter berechnet wurden.

Diagnostische Sensitivität	60 % Chronische Pankreatitis 79 % Cystische Fibrose 41 % Diabetes mellitus 61 % Pankreaskarzinom 61% Gesamt
Diagnostische Spezifität	88 % Gesamt
Positiver prädiktiver Wert	59,6 % Chronische Pankreatitis 79,2 % Cystische Fibrose 41,2 % Diabetes mellitus 61,1 % Pankreaskarzinom 91,9% Gesamt
Negativer prädiktiver Wert	31,3 % Chronische Pankreatitis 9,8 % Cystische Fibrose 17,9 % Diabetes mellitus 13,2 % Pankreaskarzinom 51,7% Gesamt
Likelihood-Verhältnis	5,2 = (LR+), 0,5 = (LR-) Chronische Pankreatitis 6,9 = (LR+), 0,2 = (LR-) Cystische Fibrose 3,6 = (LR+), 0,7 = (LR-) Diabetes mellitus 5,3 = (LR+), 0,4 = (LR-) Pankreaskarzinom 6 = (LR+), 0,4 = (LR-) Gesamt

Aus einer Vergleichsuntersuchung unter Verwendung klinisch charakterisierter Proben des Pancreatic Elastase ELISA mit einem Vergleichs-ELISA ergeben sich folgende Ergebnisse:

Diagnostische Sensitivität	92,6 %
Diagnostische Spezifität	97,6 %
Positiver prädiktiver Wert	89,3 %
Negativer prädiktiver Wert	98,4 %
Likelihood-Verhältnis	38,27 (LR+) 0,08 (LR-)

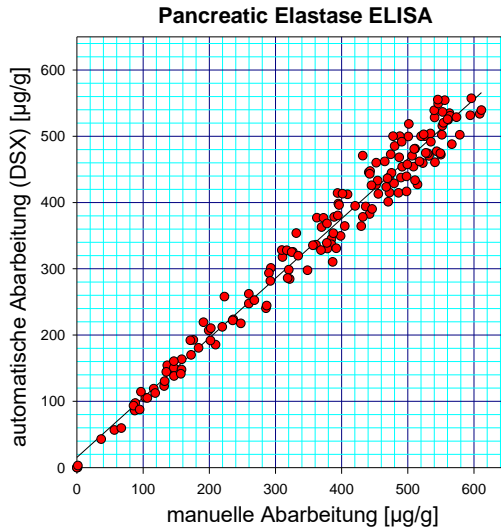
Applikation

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des Pancreatic Elastase ELISA auf einem Mikrotiterplatten-Vollautomaten (wie z.B. DS2 oder DSX) können in Abhängigkeit vom verwendeten Gerät und von den individuellen Geräteeinstellungen im Vergleich zur manuellen Bearbeitung höhere OD-Werte gemessen werden.

Korrelation: manuelle – automatische Abarbeitung

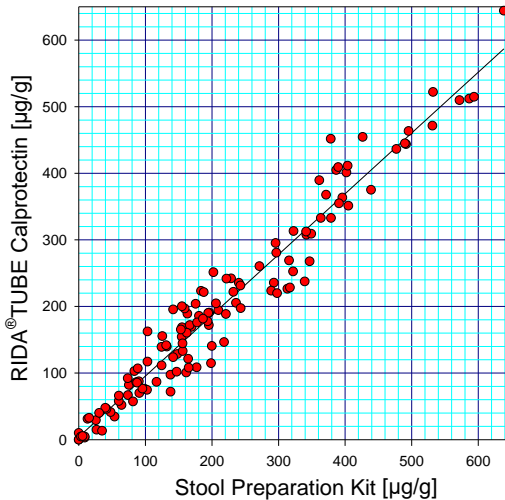
Im Rahmen der Untersuchung von 160 Stuhlproben wurde bei parallel durchgeführter manueller und automatischer Abarbeitung in 3 Chargen (DSX®, Dynex Technologies) ein mittlerer Korrelationskoeffizient von $r = 0,986$ ermittelt.



Äquivalenzstudie Stuhlaufbereitungssysteme

Im Rahmen der Untersuchung von n=120 Stuhlproben wurde bei parallel durchgeführter Probenvorbereitung unter Verwendung des Stool Preparation Kits (ACS-001) und dem RIDA®TUBE Calprotectin (R-Biopharm, GZ3016) in einer Charge des Pancreatic Elastase ELISA (G09040) ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,974$ ermittelt.

Pancreatic Elastase ELISA



Probenvorbereitung (optional)

Bei Verwendung des Stuhlaufbereitungskits RIDA®TUBE Calprotectin (R-Biopharm, GZ3016)

Optional zur Einwaage der Stuhlproben kann das Stuhlaufbereitungskit von R-Biopharm RIDA®TUBE Calprotectin verwendet werden.

Finale Probenverdünnung:

Die Überstände werden 1 : 81 (1+80) mit Waschpuffer (1x) (z.B. 25 µL Überstand + 2 mL Waschpuffer (1x)) verdünnt. Die so hergestellten Probenverdünnungen sind gebrauchsfertig für den Einsatz im Test.

Probenthalbarkeit und -lagerung für RIDA®TUBE Calprotectin (R-Biopharm, GZ3016)

Stuhlproben in Extraktionsröhrchen oder extrahierte Probenüberstände können bei verschiedenen Temperaturen für folgende Zeitspannen aufbewahrt werden:

Stuhlproben in Extraktionsröhrchen		Extrahierte Probenüberstände	
Lagerung	Dauer	Lagerung	Dauer
2...8 °C	3 Tage	2...8 °C	über Nacht
23 °C	nicht möglich	23 °C	nicht möglich
-20 °C	nicht möglich	-20 °C	nicht möglich

Hinweis: Es wird empfohlen die Probenextraktion, die Probenverdünnung mit dem RIDA®TUBE Calprotectin (R-Biopharm, GZ3016) und Probestellung im Pancreatic Elastase ELISA am selben Tag durchzuführen. Darüber hinaus ist es möglich, die mit dem RIDA®TUBE Calprotectin (R-Biopharm, GZ3016) generierten Probenextrakte im Extraktionsröhrchen bis zu 72 h bei 2...8 °C zu lagern und die separierten Probenüberstände über Nacht bei 2...8 °C für eine anschließende Testung zu nutzen. Es ist nicht möglich, die Probenextrakte, die Probenüberstände oder die Probenverdünnungen über einen längeren Zeitraum als angegeben zu testen oder bei höheren oder niedrigeren Temperaturen als 2...8 °C zu lagern und zu testen.


Hinweis: Weitere Informationen finden sich in der Gebrauchsanleitung des RIDA®TUBE Calprotectin (R-Biopharm, GZ3016).


Änderungshistorie

















Version	Abschnitt	Änderungen
2022-10_v01	Gesamtes Dokument	Neuerstellung
2023-09_v02	Wichtige Hinweise; Auswertung der Ergebnisse	Aktualisierung Sicherheitshinweise; Gefahrenkennzeichnung Aktualisierung Quantitative Auswertung: Lineare Regression

Pancreatic Elastase ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative detection of pancreatic elastase in stool samples of human origin

REF G09038  96
IVD In-vitro diagnostic medical device **CE**

 **Seramun Diagnostica GmbH** • Sprenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

 IVD In-vitro diagnostic medical device	 UDI Unique device identifier	 Manufacturer
 Country of manufacture and date of manufacture	 REF Article number	 SN Serial number
 Keep away from sunlight	 Humidity limitation	 LOT Batch code
 Consult instructions for use	 Temperature limit	 Do not reuse
 Sufficient for <i>n</i> tests	 Biohazard	 Use-by date
		 Attention

Intended Use

Pancreatic Elastase ELISA is an IVD test for the quantitative determination of pancreatic elastase in stool samples of human origin by a laboratory professional user.

The test can be used in combination with accessories Stool Preparation Kit from Bioserv Diagnostics GmbH (GZ3008) or Stool Preparation Kit from Seramun Diagnostica GmbH (ACS-001). Alternatively, it can be used with Extraction Buffer (10x) from Bioserv Diagnostics GmbH (G09038P01) or Extraction buffer (10x) from Seramun Diagnostica GmbH (ACS-002).

It is intended to aid in the diagnosis of exocrine pancreatic insufficiency in samples of patients with symptoms of an exocrine pancreatic insufficiency.

The test must not be used with specimen materials other than stool samples of human origin, for screening, monitoring, diagnosis, prediction, prognosis, as companion diagnostic, in the near patient setting and by lay persons.

Principle of the Test

Pancreatic Elastase ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) is a solid phase enzyme immunoassay based on the double sandwich technique for the quantitative determination of pancreatic elastase in human stool samples.

The wells of the microtiter plate are coated with polyclonal antibodies, which immobilize human pancreatic elastase molecules from patient samples by antibody-antigen binding in the first incubation step. In the second incubation step, biotin-labelled polyclonal antibodies are added that bind to the immobilized human pancreatic elastase. In the third incubation step, the streptavidin-peroxidase (HRP) conjugate binds to the biotin. To remove unbound components, a washing step is performed after each incubation step.

In the following enzymatic reaction step, the peroxidase of the streptavidin-peroxidase conjugate converts the colorless substrate solution to a blue reaction product. The reaction is stopped by the addition of stop solution, resulting in a color change from blue to yellow. The optical density (OD) of the reaction product measured at 450 nm and 620 nm reference filter, respectively, is directly proportional to the concentration of the specifically bound pancreatic elastase.

Test Components (Delivery Scope)

			For 96 wells
1	WELLS	Microtiter plate coated with polyclonal anti-pancreatic-elastase-antibodies (rabbit)	12 single breakable 8-well strips, vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF (10x)	Wash buffer (10x) Phosphate-based buffer	2 x 100 mL concentrate, for 2 x 1000 mL solution, colorless white cap
3	STD 1 - 4	Standards 1 – 4 STD 1 50 µg/g STD 2 100 µg/g STD 3 200 µg/g STD 4 500 µg/g	0.7 mL each, ready to use, colorless cap white cap yellow cap blue cap
4	CONTROL 1	Control 1 70 - 110 µg/g	0.7 mL, ready to use, colorless brown cap
5	CONTROL 2	Control 2 160 - 240 µg/g	0.7 mL, ready to use, colorless, green cap
6	CONJ BIOTIN (201x)	Elastase-antibody biotinylated (201x) biotinylated, polyclonal anti-pancreatic-elastase-antibody (rabbit)	0.12 mL, concentrate, colorless for 24 mL solution red cap

7	CONJ STREPT	Streptavidin-HRP conjugate	8.0 mL, ready to use, colored reddish, purple cap
8	SUBSTR	Substrate < 0.1 % 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine	13 mL, ready to use, colorless, blue cap
9	STOP	Stop solution 0.25 M sulphuric acid	13 mL, ready to use, colorless, yellow cap
10	DIL BOTTLE	Empty bottle for dilution of elastase-antibody biotinylated	empty, red cap
11		Instructions for Use	1 piece
12		Certificate of Analysis	1 piece

Additional Materials and Aids Required for the Test Procedure

Adjustable single-channel-micropipette • 8-channel pipette or multi-pipette with pipette tips • 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer • microplate reader with 450 nm measuring filter and ≥ 620 nm reference filter • deionized water • measuring cylinder • tubes for sample preparation • precision scale for sample weighing • Stool Preparation Kit (GZ3008 / ACS-001) or Extraction buffer (10x) (G09038P01 / ACS-002) • incubator

Important Information



This device is for *in-vitro* diagnostic use only. Follow the instructions carefully. The kit may be performed by laboratory professionals only.

The instructions for use must be strictly followed. Do not use reagents from damaged packages or bottles. The shelf life specified must be observed. Do not mix components with reagents from other manufacturers.

Mixing of test kit components of different lots is not allowed.

All serious incidents occurring in relation with Pancreatic Elastase ELISA must be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU member state in which user and/or patient are located.

Information on Assay Procedure


All reagents should be stored at 2...8 °C. Bring all test components to room temperature before use. For larger sample series, pipetting reagents from liquid reservoirs using a multichannel pipette is recommended to avoid time delays. Follow the pipetting scheme and time schedules of the protocol. Wash solution should be allowed a minimum reaction time of 5 s in the wells per wash cycle. Remove wash buffer residues by thoroughly aspirating or tapping out the cavities! The aspiration and washing steps can be performed manually or with the help of a microplate washer or waterjet pump. Protect substrate from light!

Safety Instructions

Reagents must not be swallowed. Contact with skin or mucous membranes should be avoided. Some reagents may contain biocides as preservative. Handle all components and patient samples as if potentially hazardous and infectious.

Additional information may be taken from the Material Safety Data Sheet.

Product contains the following hazardous component/-s:

Test component	Hazard labeling and supplementary information on ingredients
WELLS	Contains material of animal origin.
WASHBUF (10x)	-
STD 1 - 4	Contains material of animal origin.
CONTROL 1	Contains material of animal origin.
CONTROL 2	Contains material of animal origin.
CONJ BIOTIN (201x)	Contains material of animal origin.
CONJ STREPT	Contains material of animal origin.
SUBSTR	EUH210: Safety data sheet available on request.
STOP	<p>Hazard components: sulphuric acid 2.5 % Signal word: Warning</p>  <p>H290: May be corrosive to metals.</p>

Limitations of the Procedure

At temperatures higher than 40 °C samples should be transported refrigerated or frozen (see Sample Shelf Life and Storage). Aqueous stool samples may result in falsely low results due to the dilution effect. In case of watery stool, another sample with more solid consistency should be obtained. If this is not possible, the stool may be pipetted (e.g. 10 µL watery stool + 1 mL Extraction buffer (1x)). Since there is a risk of false pathological (falsely low) values due to the dilution of the stool, the consistency should be noted and in case of a pathological finding, the test must be repeated with a solid stool sample.

It is possible that substitution with porcine pancreatic proteins leads to cross-reactions. Substitution therapy might therefore have to be interrupted. There is no firm evidence regarding the need to discontinue substitution therapy before performing the assay.

Sample Treatment

Sample Collection

Collect stool sample in suitable sampling container.

Sample Shelf Life and Storage

Stool samples can be stored at different temperatures for the following time periods.

Native human stool samples		Extracted sample supernatants	
storage	Duration	storage	duration
2...8 °C	7 days	2...8 °C	3 days
20...22 °C	5 days	-18...-27 °C	1 month
40 °C	2 days		

Stool samples and extracted sample supernatant may be frozen and thawed up to two times. It is recommended to aliquot samples to avoid frequent freeze and thaw cycles.

Sample Preparation

For sample weighing:

1. Preparation of Extraction buffer (10x) by 1 : 10 dilution (= 1+9) with deionized water (e.g. 50 mL Extraction buffer (10x) + 450 mL deionized water)
2. Mixing of stool samples of human origin 1 : 101 with Extraction buffer (1x) (e.g. 10 mg stool + 1 mL Extraction buffer (1x)).
3. Homogenization of the samples by means of a rotary shaker and subsequent sedimentation of solid constituents.
4. Removal of the supernatants after 15 - 30 min sedimentation at room temperature or alternatively at 2...8 °C overnight.

Using the Stool Preparation Kit:

Optionally, Stool Preparation Kit (GZ3008/ACS-001) can be used for weighing stool samples, according to its instructions for use.

Final dilution of sample:

Sample supernatants will be diluted 1 : 201 (1 + 200) with wash buffer (1x) (e.g. 25 µL supernatant + 5 mL wash buffer (1x)). The prepared sample dilutions are now ready to use for testing.

Note: If salt crystals have precipitated in the extraction or wash buffer, dissolve them before use by gently shaking and heating in a water bath at 30 - 35 °C. For analysis, the collected supernatants can be stored at -18 °C for up to 4 weeks. It is important that supernatants are separated from the sediment during storage.

Reagent Treatment

Reagent Shelf Life and Storage

The complete test kit with sealed reagent bottles and microtiter strips is stable until the printed expiration date when stored at 2...8 °C. All opened test kit components are stable for up to 3 months if stored properly at 2...8 °C. The diluted extraction buffer can be used at 2...8 °C up to 1 month. The diluted wash buffer can be used at 2...8 °C for up to 1 month. It is recommended to prepare a fresh ready to use dilution of the biotin conjugate prior to use. Further investigations have shown that storage at 2...8 °C is possible for up to 1 month.

Reagent Preparation

Microtiter plate with breakable 8-well strips vacuum sealed with desiccant. Allow packaging to reach room temperature before opening. Protect unused wells from moisture and store refrigerated with desiccant in the original bag carefully resealed.

Dilute wash buffer (10x) 1 : 10 with deionized water.

Example: 10 mL wash buffer (10x) + 90 mL deionized water.

Dilute concentrated biotin conjugate (201x) with wash buffer (1x) 1 : 201. Use the empty bottle with red cap included in the kit for preparation of the ready to use biotin conjugate.

Note: Empty bottle is for single use only.

Examples: (1 part biotin conjugate (201x) + 200 parts wash buffer (1x)).

– 5 µL biotin conjugate (201x) in 1 mL wash buffer (1x) (for 2 microtitration strips)

– 25 µL biotin conjugate (201x) in 5 mL wash buffer (1x) (for 10 microtitration strips)

Assay Procedure

1. Allow test reagents and required number of wells to reach room temperature (RT). Shake reagents gently before use. Avoid foaming.
2. Pipette 50 μ L Blank (=zero standard, diluted wash buffer)
50 μ L

STD	1 - 4
-----	-------

 Standards 1-4
50 μ L

CONTROL	1
---------	---

 Control 1
50 μ L

CONTROL	2
---------	---

 Control 2
50 μ L extracted and diluted stool specimen each.
3. Incubate for 60 min at 37 °C.
4. Decant, then wash each well 3 x with 300 μ L diluted wash buffer. Tap dry onto absorbent paper if necessary.
5. Pipette 50 μ L

CONJ BIOTIN

 diluted biotin conjugate per cavity.
6. Incubate for 30 min at 37 °C.
7. Decant, then wash each well 3 x with 300 μ L diluted wash buffer. Tap dry onto absorbent paper if necessary.
8. Pipette 50 μ L

CONJ STREPT

 Streptavidin-HRP conjugate per cavity.
9. Incubate for 30 min at 37 °C.
10. Decant, then wash each well 3 x with 300 μ L diluted wash buffer. Tap dry onto absorbent paper if necessary.
11. Pipette 100 μ L

SUBSTR

 Substrate per cavity.
12. Incubate for 20 min at 37 °C **protected from light**.
13. Pipette 100 μ L

STOP

 Stop solution per cavity, mix gently.
14. Read OD at 450 nm for measuring and \geq 620 nm as reference with a microplate reader within 30 min following reaction stop.

Evaluation of Results

Quantitative Evaluation

A calibrator curve is generated by plotting the measured absorbances of standards 1-4 (y-axis) against the corresponding antigen concentrations (x-axis).

Linear regression or 4-parameter regression model are recommended to generate the standard curve.

By referring to the standard curve, the measured absorbances of the diluted samples are converted to μ g pancreatic elastase/g stool (antigen concentration in μ g/g stool). The indicated concentrations of the calibrators already take into account the standard dilution factor of the stool samples of 1 : 201.

The test run is valid if:

- the mean OD of the Blank (=zero standard, diluted wash buffer) is < 0.15
- the mean concentration of Control 1 is between 70 μ g/g and 110 μ g/g
- the mean concentration of Control 2 is between 160 μ g/g and 240 μ g/g

If the above-mentioned quality criteria are not met, test should be repeated strictly following the test procedure (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps, etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact the manufacturer.

Interpretation of Results

Normal exocrine pancreatic function	> 200 µg elastase/g stool
Mild/moderate exocrine pancreatic insufficiency	100 – 200 µg elastase/g stool
Severe exocrine pancreatic insufficiency	< 100 µg elastase/g stool

Performance Characteristics

Precision

To determine the precision (Intra-Assay-, Inter-Assay- and Lot-to-Lot-coefficient of variation), 8 samples were determined on 20 days by two operators in duplicates within 3 batches of Pancreatic Elastase ELISA.

Sample	Intra-Assay-coefficient of variation		Inter-Assay-coefficient of variation		Lot-to-Lot-coefficient of variation	
	\bar{x} µg elastase/g stool	CV (%)	\bar{x} µg elastase/g stool	CV (%)	\bar{x} µg elastase/g stool	CV (%)
1	66.6	6.4	66.6	10.2	68.8	11.2
2	91.9	2.7	91.9	7.0	93.6	8.8
3	105.9	4.2	105.9	7.6	105.9	9.3
4	200.8	3.3	200.8	9.0	201.8	9.4
5	207.5	2.8	207.5	6.6	208.3	7.1
6	319.5	3.4	319.5	7.3	319.1	8.0
7	438.3	2.6	438.3	4.8	433.6	5.9
8	506.5	2.9	506.5	6.2	499.6	8.2

Linearity

Using one batch of Pancreatic Elastase ELISA, a linear range of 0.3 to 231.6 µg elastase/g stool was determined with a coefficient of determination of 0.997.

Limits of Detection (LoB, LoD, LoQ, High-Dose-Hook-Effect)

The Limit of Blank (LoB) of Pancreatic Elastase ELISA has been determined by 80-fold determination of diluted wash buffer at 0.6 µg elastase/g stool. The Limit of Detection (LoD) of Pancreatic Elastase ELISA has been determined by 80-fold determination of a diluted stool sample within the concentration range of LoB to 4-fold LoB at 4.0 µg elastase/g stool. The Limit of Quantification (LoQ) of Pancreatic Elastase ELISA has been determined by examination of 5 stool dilutions in a previously empirically calculated range of concentration at 61.4 µg elastase/g stool.

Due to successive test processing a high-dose hook effect is excluded, which has been proven experimentally.

Sensitivity and Specificity

Sensitivity and specificity of Pancreatic Elastase ELISA have been determined in comparison to a commercially available ELISA.

For the determination of the sensitivity a sample collective of n = 102 clinically characterized stool samples were examined. Results were compared in the following four-cross-tabulation. The collective is composed of patients diagnosed with pancreatic cancer, diabetes mellitus, chronic pancreatitis and cystic fibrosis.

n = 102 clinical stool samples	Comparative ELISA > 200 µg elastase/g stool	Comparative ELISA < 200 µg elastase/g stool
Pancreatic Elastase ELISA > 200 µg elastase/g stool	47	2
Pancreatic Elastase ELISA < 200 µg elastase/g stool	5	48

Sensitivity: 96.0%

For the determination of the specificity a cohort of n = 200 healthy stool sample donors were examined and the results compared in the following four-cross-tabulation.

n = 200 healthy stool sample donors	Comparative ELISA > 200 µg elastase/g stool	Comparative ELISA < 200 µg elastase/g stool
Pancreatic Elastase ELISA > 200 µg elastase/g stool	195	2
Pancreatic Elastase ELISA < 200 µg elastase/g stool	1	2

Specificity: 99.5%

Recovery

To determine the recovery of concentration measurements for Pancreatic Elastase ELISA, a weakly reactive sample (~100 µg elastase/g stool) was mixed with a highly reactive sample (> 300 µg elastase/g stool) in the ratio of 1 part to 9 parts and the deviation between calculated elastase concentration and measured elastase concentration was determined. The deviation of calculated to measured elastase concentration was between 9.0 and 16.1 %.

Cross reactivity

The following microorganisms were diluted in wash buffer (1x) at $\geq 10^8$ colony-forming units (CFU) per mL, alternatively clinical isolates diluted 1 : 20.000 were tested in the Pancreatic Elastase ELISA. No cross reactivity has been shown.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285	<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 49128
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559	<i>Salmonella anatum</i>	ATCC 9270
<i>Campylobacter fetus</i>	ATCC 27374	<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>thyphimurium</i>	ATCC 14028
<i>Campylobacter jejunii</i>	ATCC 32291	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>galolyticus/enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Campylobacter lari</i>	ATCC 35221	<i>Salmonella infantis</i>	ATCC 51741
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	ATCC 43954	<i>Salmonella paratyphi A</i>	ATCC 11511
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	<i>Salmonella paratyphi B</i>	ATCC 8759
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	<i>Salmonella paratyphi C</i>	Nr. 2 Pasteur
<i>Clostridium difficile</i>	VPI 10463	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022
<i>Clostridium sordelli</i>	ATCC 9714	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	<i>Vibrio cholerae</i>	clinical isolate
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC 13883	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 20481	<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:3	clinical isolate
<i>Morganella morganii</i>	ATCC 25830	<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:9	clinical isolate
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC 27337	<i>Yersinia enterocolitica</i> RKI 0803733	clinical isolate
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906	<i>Yersinia enterocolitica</i> Y11	clinical isolate

Interference

None of the following substances added to analyte-containing samples and weakly reactive samples showed a significant impact on the test result: The mentioned concentrations refer to 30 mg faeces.

(-)-Scopolamine n-Butyl bromide (0.5 %, Buscopan®), Barium sulfate (5 %), Biotin (0.001%), Bismuth(III) subsalicylate (0.5 %, Pepto-Bismol), Cyclamat (5 %), Diclofenac (0.5 %), hemoglobin human (5 %), blood human (5 %), Hylak® N (5 %), Iberogast® (5 %), Immodium® akut duo (0.03/1.9 %), Loperamid hydrochloride (5 %, Loperamid-CT akut), Metronidazole (0.5 %), Mucin (5 %), Nexium® (0.25 %), Nifuroxazide (0.5 %, Pentofuryl®), palmitic acid (20 %), pancreas powder from pig (5%, Pangrol® 25.000), pancreas powder from pig (2.5%, Pankreatan® 36.000), pancreas powder from pig (2.5%, Panzytrat® 40.000), Pankreatin (5%, Kreon® 35.000), Perenterol forte (0.5 %), Rennie® (20 %), Simigel® (1 %), stearic acid (20 %), Vancomycin (0.5 %).

Clinical Performance

A total of 15 clinical studies have been performed on Pancreatic Elastase ELISA in the European area and other areas between 2003 and 2021. The clinical performance of these studies has been clearly demonstrated [1-15].

Pancreatic Elastase ELISA was used to test a selection of clinical samples within an external clinical performance study, from which the following performance parameters were calculated retrospectively.

Diagnostic sensitivity	60 % Chronic pancreatitis 79 % Cystic fibrosis 41 % Diabetes mellitus 61 % Pancreatic cancer 61% Total
Diagnostic specificity	88 % Total
Positive predictive value	59.6 % Chronic pancreatitis 79.2 % Cystic fibrosis 41.2 % Diabetes mellitus 61.1 % Pancreatic cancer 91.9% Total
Negative predictive value	31.3 % Chronic pancreatitis 9.8 % Cystic fibrosis 17.9 % Diabetes mellitus 13.2 % Pancreatic cancer 51.7% Total
Likelihood-ratio	5.2 = (LR+), 0.5 = (LR-) Chronic pancreatitis 6.9 = (LR+), 0.2 = (LR-) Cystic fibrosis 3.6 = (LR+), 0.7 = (LR-) Diabetes mellitus 5.3 = (LR+), 0.4 = (LR-) Pancreatic cancer 6 = (LR+), 0.4 = (LR-) Total

From a comparative study using clinically characterized samples of Pancreatic Elastase ELISA with comparative ELISA, the following results are obtained:

Diagnostic sensitivity	92.6 %
Diagnostic specificity	97.6 %
Positive predictive value	89.3 %
Negative predictive value	98.4 %
Likelihood-ratio	38.27 (LR+) 0.08 (LR-)

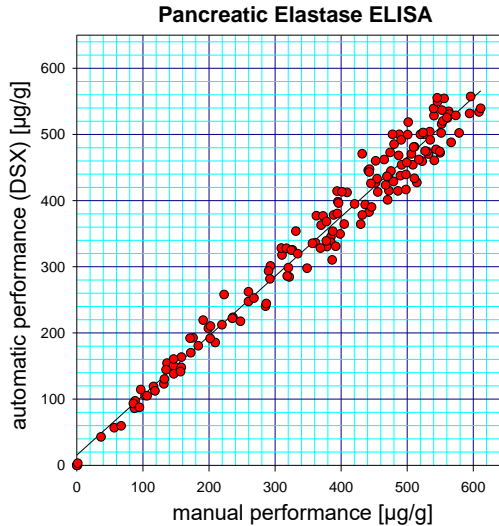
Application

Automated Workflow

Performing Pancreatic Elastase ELISA on fully automated microplate processors (e.g. DS2® or DSX) may cause elevated absorbances in comparison to the manual procedure due to individual differences concerning wash procedures and general technical specifications of the equipment.

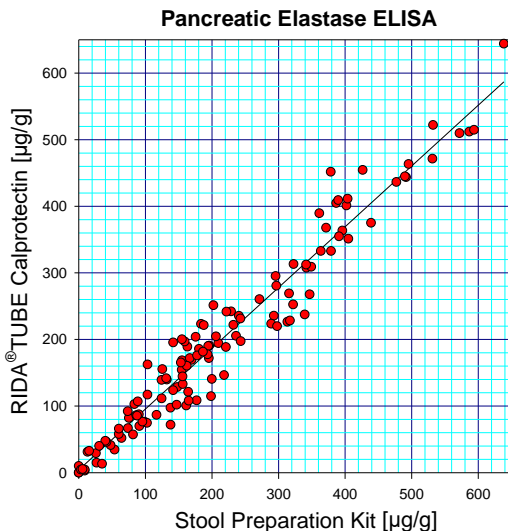
Correlation: manual – automated workflow

A panel of 160 stool specimens was processed manually and automatically in parallel in 3 batches (DSX®, Dynex Technologies). The average correlation coefficient was calculated at $r = 0.986$.



Equivalence Study Stool Preparation Systems

A panel of 120 stool specimens was investigated in parallel, by sample preparation with Stool Preparation Kit (ACS-001) and RIDA®TUBE Calprotectin (R-Biopharm, GZ3016) in one batch of the Pancreatic Elastase ELISA (G09040). The average correlation was calculated at $r = 0.974$.



Sample Preparation (optional)

Using the RIDA®TUBE Calprotectin (R-Biopharm, GZ3016):

As an alternative to stool sample weighing the stool preparation kit RIDA®TUBE Calprotectin from R-Biopharm can be used.

Final dilution of sample:

Sample supernatants have to be diluted 1 : 81 (1 + 80) with wash buffer (1x) (e.g. 25 µL supernatant + 2 mL wash buffer (1x)). The prepared sample dilutions are ready to use for testing.

Sample Shelf Life and Storage for RIDA®TUBE Calprotectin (R-Biopharm, GZ3016)

Stool samples in extraction tubes or extracted sample supernatants can be stored at different temperatures for the following time periods.

<u>Stool samples in extraction tubes</u>		<u>Extracted sample supernatants</u>	
storage	duration	storage	duration
2...8 °C	3 days	2...8 °C	overnight
23 °C	not possible	23 °C	not possible
-20 °C	not possible	-20 °C	not possible

Note: It is recommended to perform sample extraction, sample dilution with RIDA®TUBE Calprotectin (R-Biopharm, GZ3016) and sample testing in Pancreatic Elastase ELISA on the same day. In addition, it is possible to store the sample extracts generated with the RIDA®TUBE Calprotectin (R-Biopharm, GZ3016) in the extraction tube for up to 3 days at 2...8 °C before testing. Separated sample supernatants may be stored overnight at 2...8°C before testing. It is not possible to keep sample extracts, sample supernatants or sample dilutions for a longer period than specified or to store them at higher or lower temperatures than 2...8 °C before testing.

Note: Further information can be found in the instructions for use of the RIDA®TUBE Calprotectin (R-Biopharm, GZ3016).

History of Changes

Version	Section	Modifications
2022-10_v01	Entire document	Document creation
2023-09_v02	Important Information; Evaluation of Results	Update Safety Instructions; Hazard labeling Update Quantitative Evaluation: linear regression

References

Citations belonging to the section Clinical Performance

1. Pietzner, M., et al., Exocrine Pancreatic Function Modulates Plasma Metabolites Through Changes in Gut Microbiota Composition. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021. **106**(5): p. e2290-e2298.
2. Boga, S., et al., Liver and pancreas: 'Castor and Pollux' regarding the relationship between hepatic steatosis and pancreas exocrine insufficiency. *Pancreatol*, 2020. **20**(5): p. 880-886.
3. Aksoz, Z., et al., The easy way of evaluating exocrine pancreatic insufficiency in type 2 diabetes : listen to the patients' complaints and look in their eyes! *Acta Gastroenterol Belg*, 2020. **83**(3): p. 407-412.
4. Akay, S., B. Sirin, and B. Unsal, Fecal Elastase Levels Predict Honeycombing in Pancreas Detected with Endoscopic Ultrasound. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2018. **2018**: p. 4625247.
5. Ellemunter, H., et al., Fecal Calprotectin in Cystic Fibrosis and Its Relation to Disease Parameters: A Longitudinal Analysis for 12 Years. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2017. **65**(4): p. 438-442.
6. Aoufi Rabih, S., et al., Exocrine pancreatic insufficiency and chronic pancreatitis in chronic alcoholic liver disease: coincidence or shared toxicity? *Pancreas*, 2014. **43**(5): p. 730-4.
7. Fernandez-Lorenzo, A.E., et al., V232D mutation in patients with cystic fibrosis: Not so rare, not so mild. *Medicine (Baltimore)*, 2018. **97**(28): p. e11397.
8. Demoulin, N., et al., Enteric hyperoxaluria in chronic pancreatitis. *Medicine (Baltimore)*, 2017. **96**(19): p. e6758.
9. Shin, Y.C., et al., Effects of pancreatectomy on nutritional state, pancreatic function, and quality of life over 5 years of follow up. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2020.
10. Srivastava, A., et al., Prevalence and predictive factors of undernutrition and low bone mineral density in children with chronic pancreatitis. *Pancreatol*, 2021. **21**(1): p. 74-80.
11. Singh, N., et al., Antioxidants for Pancreatic Functions in Chronic Pancreatitis: A Double-blind Randomized Placebo-controlled Pilot Study. *J Clin Gastroenterol*, 2020. **54**(3): p. 284-293.
12. Chowdhury, S.D., et al., Pancreatic exocrine insufficiency: Comparing fecal elastase 1 with 72-h stool for fecal fat estimation. *Indian J Gastroenterol*, 2016. **35**(6): p. 441-444.
13. O'Sullivan, B.P., et al., Evolution of pancreatic function during the first year in infants with cystic fibrosis. *J Pediatr*, 2013. **162**(4): p. 808-812 e1.
14. Malluta, E.F., et al., Pancreatic endosonographic findings and clinical correlation in Crohn's disease. *Clinics (Sao Paulo)*, 2019. **74**: p. e853.
15. Bartels, R.H., et al., Pancreatic Enzyme Replacement Therapy in Children with Severe Acute Malnutrition: A Randomized Controlled Trial. *J Pediatr*, 2017. **190**: p. 85-92 e2.

Common citations

1. Basturk, A., Y. Curek, R. Felek, G. Celmeli and R. Artan (2021). "Exocrine pancreas functions in children with type 1 diabetes mellitus." *Arab J Gastroenterol* **22**(3): 236-239.
2. Beyer, G., Hoffmeister, A., Michl, P., Gress, T. M., Huber, W., Algül, H., ... & Mayerle, J. (2022). S3-Leitlinie Pankreatitis—Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs-und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)—September 2021—AWMF Registernummer 021-003. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, **60**(03), 419-521.
3. Dominici, R. and C. Franzini (2002). "Fecal elastase-1 as a test for pancreatic function: a review." *Clin Chem Lab Med* **40**(4): 325-332.
4. Gonzales, A. C., S. M. Vieira, R. L. Maurer, F. A. Silva and T. R. Silveira (2011). "Use of monoclonal faecal elastase-1 concentration for pancreatic status assessment in cystic fibrosis patients." *J Pediatr (Rio J)* **87**(2): 157-162.
5. Gullo, L., L. Graziano, S. Babbini, A. Battistini, R. Lazzari and R. Pezzilli (1997). "Faecal elastase 1 in children with cystic fibrosis." *Eur J Pediatr* **156**(10): 770-772.
6. Keim, V., Teich, N., & Moessner, J. (2003). Clinical value of a new fecal elastase test for detection of chronic pancreatitis. *Clinical laboratory*, **49**(5-6), 209-215.
7. Löser, C., A. Möllgaard and U. R. Fölsch (1996). "Faecal elastase 1: a novel, highly sensitive, and specific tubeless pancreatic function test." *Gut* **39**(4): 580-586.
8. Naruse, S., H. Ishiguro, S. B. Ko, T. Yoshikawa, T. Yamamoto, A. Yamamoto, S. Futakuchi, H. Goto, Y. Saito and S. Takahashi (2006). "Fecal pancreatic elastase: a reproducible marker for severe exocrine pancreatic insufficiency." *J Gastroenterol* **41**(9): 901-908.
9. Rothenbacher, D., M. Löw, P. D. Hardt, H. U. Klör, H. Ziegler and H. Brenner (2005). "Prevalence and determinants of exocrine pancreatic insufficiency among older adults: results of a population-based study." *Scand J Gastroenterol* **40**(6): 697-704.