

Instructions for use / Testanleitung / Instruções de utilização

Pancreatic Elastase ELISA

ELISA for the determination of human pancreatic elastase
ELISA zur Bestimmung der humanen pankreatischen Elastase
ELISA para a determinação de elastase pancreática humana

R-Biopharm Order Code No.: G09040 Version SK15

Size: 12 strips with 8 wells each (individually breakable)

Storage: 2 °C – 8 °C (36 °F – 46 °F)

Anzahl: 12 Streifen mit jeweils 8 Nöpfen (einzeln brechbar)

Lagerung: 2 °C – 8 °C

Dimensão: 12 tiras com 8 poços cada (quebráveis individualmente)

Armazenagem: 2 °C - 8 °C

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative determination of human pancreatic elastase in faeces as an aid in the diagnosis of the exocrine pancreatic function
Enzymimmunoassay (ELISA) zur quantitativen Bestimmung von humaner pankreatischer Elastase in Stuhl zur Diagnose einer exokrinen pankreatischen Insuffizienz.
Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a determinação quantitativa da elastase pancreática humana em fezes, como ajuda ao diagnóstico da função pancreática exócrina

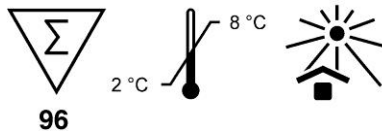
- For *in vitro* diagnostic use only -
- Nur zur *in vitro* Diagnostik -
- Apenas para uso em diagnóstico *in vitro* -

EU Registration No.: DE/CA81/2009-17

Certified Quality Management System according to

ISO 13485

REF G09040



IVD **CE**

BIOSERV
DIAGNOSTICS



Manufacturer: BIOSERV Diagnostics GmbH
Doberaner Str. 151, 18057 Rostock, Germany
Phone: +49 (0) 381 3758 2091
Fax: +49 (0) 381 3758 2099
www.bioserv-diagnostics.com
E-mail: info@bioserv-diagnostics.com

Sold and Marketed by:



R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt,
Germany
Phone: +49 (0) 6151 8102 0
Fax: +49 (0) 6151 8102 20
www.r-biopharm.com
E-mail: info@r-biopharm.com

Deutsch:

Verwendungszweck

Der Pankreas-Elastase-ELISA von BIOSERV Diagnostics dient der Bestimmung humaner pankreatischer Elastase in Stuhl.

Klinische Relevanz

Pankreatische Elastase ist ein proteolytisches Verdauungsenzym, das ausschließlich im Pankreas gebildet wird und während der Darmpassage eine außergewöhnliche Stabilität aufweist. Verglichen mit der Konzentration im Zwölffingerdarm ist pankreatische Elastase in sechsfach höherer Konzentration im Stuhl nachweisbar. Die Konzentration der pankreatischen Elastase im Stuhl korreliert direkt mit der exokrinen sekretorischen Kapazität des Pankreas.

Die polyklonalen Antikörper, die in diesem Test eingesetzt werden, sind spezifisch gegen definierte Aminosäuresequenzen des humanen pankreatischen Elastase-Moleküls gerichtet. Diese Aminosäuresequenzen sind spezies- und organspezifisch.

Anwendungsgebiete

Der Pankreas-Elastase-ELISA von BIOSERV Diagnostics ist ein Bestandteil der klinischen Diagnostik zur Diagnose einer pankreatischen Insuffizienz, die verursacht werden kann durch:

- Chronische Pankreatitis
- Mukoviszidose (zystische Fibrose)
- Diabetes mellitus
- Gallensteinleiden (Cholelithiasis)
- Hereditäre Pankreatitis
- Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
- Pankreaskarzinom
- Autoimmunologisch verursachte Pankreatitis
- Shwachman-Diamond Syndrom
- Autoimmunerkrankungen und Konnektivitäten
- Zollinger-Ellison-Syndrom

Testprinzip

Der Pankreas-Elastase-ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) von BIOSERV Diagnostics ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf Basis der Doppelsandwichtechnik der quantitativen Bestimmung von pankreatischer Elastase in humanen Stuhlproben dient. Zwei polyklonale Antikörpergemische kommen zum Einsatz. Als Antigen für die Immunisierung werden synthetische Peptidsequenzen aus der humanen Pankreas-Elastase verwendet. Diese Antikörper erkennen jeweils zahlreiche verschiedene Epitope auf genau definierten spezies- und organspezifischen Elastase- Aminosäuresequenzen. BIOSERV Diagnostics verwendet diese Antikörper, um durch das Detektieren zahlreicher unterschiedlicher Epitope zu einer besseren diagnostischen Sensitivität und Spezifität zu gelangen (vgl. die Literaturliste im Anhang).

Die Näpfe der ELISA-Platte sind mit diesen polyklonalen Antikörpern beschichtet, die im ersten Inkubationsschritt durch Antikörper-Antigen-Bindung humane Pankreas-Elastase-Moleküle aus Patientenproben bzw. Kalibratoren (Standards) und Kontrollen immobilisieren. Im zweiten Inkubationsschritt werden mit Biotin markierte polyklonale Antikörper zugegeben und an die immobilisierte humane Pankreas-Elastase gebunden. Im dritten Inkubationsschritt bindet das Biotin ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Durch die Peroxidase wird das Substrat TMB (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin) oxidiert, was zu einer blauen Farbreaktion führt. Die Farbreaktion wird nach einer definierten Zeit durch Zugabe von 0,25 M Schwefelsäure (H₂SO₄) abgestoppt. Das oxidierte TMB wird photometrisch bei 450 nm bestimmt. Eine Referenzmessung bei einer Wellenlänge von ≥ 550 nm wird empfohlen, ist aber nicht zwingend erforderlich.

Bestandteile des Kits (ausreichend für 96 Bestimmungen)

1. Standardreihe, gebrauchsfertig, pro Fläschchen	0,7 ml
– Standard SK15 (15 µg Elastase/g – farbloser Schraubdeckel mit rosa Steckplättchen)	
– Standard 1 (50 µg Elastase/g – farbloser Schraubdeckel)	
– Standard 2 (100 µg Elastase/g – weißer Schraubdeckel)	
– Standard 3 (200 µg Elastase/g – gelber Schraubdeckel)	
– Standard 4 (500 µg Elastase/g – blauer Schraubdeckel)	
2. Kontrolle 1 (entspricht 70 - 110 µg Elastase/g – brauner Schraubdeckel)	0,7 ml
3. Kontrolle 2 (entspricht 160 - 240 µg Elastase/g – grüner Schraubdeckel)	0,7 ml
4. Waschlösung (10x)	2 x 100 ml
5. Biotinylierte polyklonale anti-Elastase-Antikörper (201x, roter Schraubdeckel)	0,12 ml
6. Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (gebrauchsfertig)	8 ml
7. Substratlösung (TMB, gebrauchsfertig)	13 ml
8. Stopplösung (0,25 M H ₂ SO ₄ , gebrauchsfertig)	13 ml
9. Mikrotiterstreifen + Halter	96 Kavitäten
10. Leerflasche zum Ansetzen des biotinylierten anti-Elastase-Antikörpers	

Erforderliche Geräte und Materialien, die nicht im Kit enthalten sind

1. Mikrotiterplattenleser mit 450 nm Filter, optional mit einem Referenzfilter ≥ 550 nm.
2. Mikrotiterpipetten mit auswechselbaren Spitzen: 5 µl, 50 µl, 100 µl und 1000 µl.
3. Röhrchen für die Verdünnung der Proben.
4. Reinstwasser (empfohlene Reinheit nach ISO 3696 Qualität 1).
5. Saugfähiges Papier.
6. Feinwaage zum Einwiegen des Stuhles (oder BIOSERV Stuhlaufbereitungskit).
7. Brutschrank bzw. Wärmekammer für Automaten.
8. Extraktionspuffer (Kat.-Nr. G09038P01) oder BIOSERV Stuhlaufbereitungskit (Kat.-Nr. GZ3008).

Warnungen und Hinweise

1. Dieser Testkit ist nur zur *in vitro*-Diagnostik bestimmt.
2. Vermeiden Sie den Kontakt mit der Stopplösung (0,25 M Schwefelsäure), sie könnte Hautirritationen und Verätzungen auslösen.
3. Pipettieren Sie niemals mit dem Mund.
4. Bitte verwenden Sie nur kalibrierte Pipetten und Geräte.
5. Bitte betrachten Sie alle Proben als potenziell infektiös und bearbeiten Sie diese nur mit äußerster Sorgfalt.
6. Der Umgang und die Entsorgung müssen entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien erfolgen.

Hinweise zur Vorbereitung der Testbestandteile

1. Die Bestandteile dieses Kits bilden eine integrale Einheit und dürfen daher nicht mit den Bestandteilen anderer Kits gemischt werden.
2. Bringen Sie alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18 – 25 °C).
3. Durchmischen Sie alle Reagenzien gründlich und ohne Schaumbildung.
4. Wurde die Testdurchführung einmal begonnen, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
5. Pipettieren Sie alle Reagenzien und Proben auf den Grund der Näpfe. Mischen oder Schütteln nach dem Pipettieren ist nicht erforderlich.
6. Verwenden Sie für jede Probe jeweils eine neue Pipettenspitze.
7. Bringen Sie vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand (die Proben vorverdünnen, die benötigten Näpfe in den Halter setzen, etc.). Eine gute Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Unterbrechung und verhindert damit das Auftreten einer Verschiebung der Messwerte.
8. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, die Näpfe nach den einzelnen Inkubationsschritten gründlich zu waschen und nach dem letzten Waschen in den Näpfen verbliebene Wassertropfen durch Ausklopfen auf saugfähiger Unterlage zu entfernen.

- Die Durchführung aller Teste im Doppelansatz ist empfehlenswert, da nur auf diese Weise Pipettier- oder Handhabungsfehler erkannt werden können.

Hinweise zu Lagerung und Haltbarkeit

- Lagern Sie die Reagenzien bei 2 – 8 °C. **Weder der gesamte Kit, noch einzelne Kitbestandteile, dürfen eingefroren werden!**
- Die nicht angebrochenen Reagenzien sind haltbar bis zum aufgedruckten Haltbarkeitsdatum des Kits. Achtung! Sobald der Testkit in Gebrauch ist, ist die verbleibende Restlaufzeit kürzer als auf dem Außenlabel ausgewiesen. Alle Einzelbestandteile des Kits müssen nach Anbruch sofort wieder fest verschlossen und weiterhin bei 2 – 8 °C gekühlt werden. Der Kit sollte dann **innerhalb von vier Wochen** abgearbeitet werden. Anderenfalls besteht die Gefahr eventuell abweichender Testergebnisse.
- Der angesetzte Waschpuffer ist bei 2 – 8 °C für 4 Wochen haltbar.
- Der angesetzte Extraktionspuffer ist bei 2 – 8 °C für 4 Wochen haltbar (nicht Bestandteil des Kits).
- Verschließen Sie die Fläschchen unmittelbar nach dem Gebrauch.
- Bewahren Sie die Mikrotiterstreifen im Folienbeutel mit Trockensubstanz auf. Verschließen Sie nach dem Entnehmen der Streifen aus dem Beutel den Verschluss des Folienbeutels wieder fest. So verschlossen sind die Mikrotiterstreifen im Kühlschrank bei 2 – 8 °C mindestens vier Wochen haltbar.

Probenmaterial

Humaner Stuhl

Hinweise zur Lagerung und Aufbereitung der Proben

- Verwenden Sie frische Stuhlproben. Bearbeiten Sie alle Proben mit äußerster Sorgfalt und betrachten Sie sie grundsätzlich als potenziell infektiös.
- Stuhlproben können bei verschiedenen Temperaturen für folgende Zeitspannen aufbewahrt werden:
 - Umgebungstemperatur bis 40 °C: bis zu fünf Tagen
 - Kühlschranktemperatur (2 – 8 °C): bis zu einer Woche
 - Haushaltsgefrierschranktemperatur (ca. -18 °C): bis zu einem Jahr
- Vorgehensweise bei wässrigem Stuhl:

Bei wässrigem Stuhl versuchen Sie bitte, eine andere Probe mit festerer Konsistenz zu erhalten. Falls dies nicht möglich sein sollte, kann der Stuhl auch pipettiert werden. 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.

Vorsichtsmaßnahmen:

Die Bestandteile des Testkits enthalten keine Materialien humanen Ursprungs. Aber Untersuchungsmaterial von Patienten ist stets als potenziell infektiös einzustufen und entsprechend zu behandeln. Beachten Sie auch die geltenden Vorschriften zur Unfallverhütung, zum Umweltschutz und zum Umgang mit Gefahrstoffen. Tragen Sie in jedem Fall geeignete Schutzkleidung und Schutzhandschuhe.

Vorbereitung der Stuhlproben

- Bei Probeneinwaage
 - Vorbereitung des Extraktionspuffers (10x konzentriert, **nicht Bestandteil des Kits**):
Verdünnen Sie das Extraktionspufferkonzentrat 1:10 (= 1 + 9) mit Reinstwasser (z.B. 50 ml Extraktionspuffer + 450 ml Aqua dest.)
 - Trieren Sie ein etwa 12 ml fassendes Röhrchen mit Stopfen auf einer Feinwaage (Empfindlichkeit 1mg). Verbringen Sie mit einer Impföse oder mit einem Spatel 30 bis 100 mg Stuhl in das Röhrchen. Auf 10 mg Stuhl wird 1 ml Extraktionspuffer gegeben (z. B. 70 mg Stuhl + 7 ml Puffer oder z.B. 83 mg Stuhl + 8,3 ml Puffer).
 - Homogenisieren Sie die Proben sehr gut, z.B. mit Hilfe eines Rotationsschüttlers der Fa. Vortex, und lassen Sie anschließend die festen Bestandteile sedimentieren. Nach ca. 15 - 30 min werden die Überstände abgenommen. Die Sedimentation kann alternativ auch über Nacht bei 2 – 8 °C erfolgen.

2. Bei Verwendung des BIOSERV Stuhlprobenaufbereitungskits
 - Optional zur Einwaage der Stuhlproben, bietet BIOSERV Diagnostics das komplett gebrauchsfertige Stuhlprobenaufbereitungskit (Kat.-Nr. GZ3008) zur einfachen, zuverlässigen und hygienischen Präparation von Stuhlproben an.

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

Testdurchführung

1. Vorbereitung des Waschpuffers (10x konzentriert): Verdünnen Sie das Waschpufferkonzentrat 1:10 mit Reinstwasser (empfohlene Reinheit nach ISO 3696 Qualität 1). (z.B. 100 ml Waschpufferkonzentrat + 900 ml Aqua dest.). **Achtung:** Verwenden Sie nur Reinstwasser zum Ansetzen des Waschpuffers!
2. Bringen Sie alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18 – 25 °C) und durchmischen Sie diese vor Gebrauch.
3. Befestigen Sie die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen in der Halterung und beschriften Sie ein Pipettierschema entsprechend.
4. Verdünnen Sie die Stuhlprobenextrakte 1:201 (1+200) mit Waschpuffer (z.B. 25 µl Stuhlextrakt + 5 ml Waschpuffer). Die Verdünnungen sind nun gebrauchsfertig; die Standards werden bereits gebrauchsfertig geliefert. Bitte verwenden Sie für jeden Pipettiervorgang (für jeden Extrakt) eine neue Pipettenspitze.
5. Füllen Sie je 50 µl Blank (=Nullstandard, =Waschpuffer), Elastase-Standards, Kontrollen, sowie die extrahierten und verdünnten Patientenproben in die entsprechenden Näpfe.
6. Inkubieren Sie den Ansatz für 60 Minuten bei 37 °C.
7. Verwerfen Sie die Inkubationslösung (bei manueller Abarbeitung: einfach abschütten) und waschen Sie die Näpfe 3-mal mit jeweils 200 µl Waschpuffer.
8. Klopfen Sie die verbliebenen Flüssigkeitsreste aus den Näpfen durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier oder Tuch. Belassen Sie zum Ausklopfen die Streifen in der Halterung.
9. Verdünnen Sie den biotinylierten anti-Elastase-Antikörper (roter Deckel) 1:201 mit Waschpuffer
Verwenden Sie zum Ansetzen des Konjugates die im Kit enthaltene Leerflasche mit dem roten Deckel.
Achtung: Die Leerflasche ist nur zum einmaligen Gebrauch bestimmt!
(1 Teil biotinylierter Antikörper + 200 Teile Waschpuffer). Beispiele:
 - 5 µl biotinylierte anti-Elastase-Antikörper in 1 ml Waschpuffer (für 2 Mikrotiterstreifen)
 - 10 µl biotinylierte anti-Elastase-Antikörper in 2 ml Waschpuffer (für 4 Mikrotiterstreifen)
 - 15 µl biotinylierte anti-Elastase-Antikörper in 3 ml Waschpuffer (für 6 Mikrotiterstreifen)
 - 25 µl biotinylierte anti-Elastase-Antikörper in 5 ml Waschpuffer (für 10 Mikrotiterstreifen).Pipettieren Sie jeweils 50 µl der verdünnten Lösung in die Näpfe.
Hinweis: Vor jedem Testlauf ist darauf zu achten, dass der biotinylierte Antikörper frisch angesetzt wird.
10. Inkubieren Sie den Ansatz für 30 min bei 37 °C.
11. Verwerfen Sie die Inkubationslösung und waschen Sie die Näpfe 3-mal mit je 200 µl Waschpuffer.
12. Klopfen Sie die verbliebenen Flüssigkeitsreste aus den Näpfen durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier.
13. Pipettieren Sie jeweils 50 µl des gebrauchsfertigen Streptavidin-Peroxidase-Konjugats in die Näpfe.
14. Inkubieren Sie den Ansatz für 30 min bei 37 °C.
15. Verwerfen Sie die Inkubationslösung (bei manueller Abarbeitung: einfach abschütten) und waschen Sie die Näpfe 3-mal mit je 200 µl Waschpuffer.
16. Klopfen Sie die verbliebenen Flüssigkeitsreste aus den Näpfen durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier.
17. Pipettieren Sie jeweils 100 µl Substratlösung in die Näpfe.
18. Inkubieren Sie den Ansatz für 20 min bei 37 °C. **Achtung:** Zeitnahme ab Beginn der Substratlösung-Pipettierung in den ersten Napf. Inkubation muss in dunkler Umgebung erfolgen.
19. Beenden Sie die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung in jeden Napf.

Achtung: Pipettieren Sie die Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und in den gleichen Zeitintervallen wie bei der Zugabe der Substratlösung.

Bestimmen Sie die Extinktion in jedem Napf bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer. Wir empfehlen, die Farbreaktionen innerhalb von 10 Minuten nach dem Abstoppen zu messen. Jedes Mikrotiterplatten-Photometer mit einem 450-nm-Filter kann verwendet werden. Eine Referenzmessung bei einer Wellenlänge von ≥ 550 nm wird empfohlen, ist aber nicht zwingend.

Pipettierschema für den Pankreas-Elastase-ELISA SK15 von BIOSERV Diagnostics

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	P	1	P	9	P	17	P	25	P	33
B	SK	15	P	2	P	10	P	18	P	26	P	34
C	S	1	P	3	P	11	P	19	P	27	P	35
D	S	2	P	4	P	12	P	20	P	28	P	36
E	S	3	P	5	P	13	P	21	P	29	P	37
F	S	4	P	6	P	14	P	22	P	30	P	38
G	C	1	P	7	P	15	P	23	P	31	P	39
H	C	2	P	8	P	16	P	24	P	32	P	40

In diesem Pipettierschema sind die empfohlenen Positionen für den Blank (= Nullstandard), die Standards (SK15 - S4), die Kontrollen (C1 und C2) und die Patientenproben (P1 - P40) als Doppelbestimmungen dargestellt.

Auswertung der Testergebnisse

1. Vom Hersteller werden zur Testauswertung die lineare Regression bzw. der 4 Parameter Fit empfohlen.
2. Berechnen Sie die durchschnittlichen Extinktionswerte für die Standardreihe, Kontrollen und Patientenproben.
3. Die Extinktion (Y-Achse) von jedem Standardwert wird im Verhältnis zur zugehörigen Konzentration an Elastase (X-Achse) graphisch dargestellt. Die daraus resultierende Kurve wird benutzt, um die Werte der Patientenproben zu bestimmen.
4. Den Extinktionen der Proben werden mit Hilfe der Standardkurve ihre entsprechenden Elastase-Konzentrationen zugeordnet.
5. Der Wert der Kontrolle 1 sollte zwischen 70 $\mu\text{g/g}$ und 110 $\mu\text{g/g}$ liegen. Der Wert der Kontrolle 2 sollte zwischen 160 mg/g und 240 mg/g liegen. Wenn sich eine der Kontrollen außerhalb dieses Bereiches befindet, sollte der Test wiederholt werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte nochmals alle Inkubationsschritte und -zeiten.

Beschränkungen des Tests

- Bei Temperaturen, die höher als 40 °C liegen, sollten die Proben gekühlt oder gefroren transportiert werden.
- Wässrige Stuhlproben können aufgrund des Verdünnungseffektes falsch niedrige Resultate ergeben. Hinweise zur Verfahrensweise mit wässrigen Stuhlproben lesen Sie bitte unter Punkt 3 „Hinweise zur Lagerung und Aufbereitung der Proben“.
- Wenn die optische Dichte des Blanks (= Nullstandard, = Waschpuffer) höher ist als OD 0.15, sollte der Test wiederholt werden.
- Es ist möglich, dass es bei einer Substitution mit Proteinen aus Schweinepankreas zu Kreuzreaktionen kommen könnte. Eine Substitutionstherapie könnte daher möglicherweise zu unterbrechen sein. Eine sichere Erkenntnis hinsichtlich der Notwendigkeit des Absetzens einer Substitutionstherapie vor Durchführung des Tests liegt nicht vor.

Erwartete Werte

- Schwere exokrine pankreatische Insuffizienz < 100 μg Elastase/g Stuhl

- | | |
|--|-------------------------------|
| – Mittlere bis leichte exokrine pankreatische Insuffizienz | 100 - 200 µg Elastase/g Stuhl |
| – Normale exokrine pankreatische Funktion | > 200 µg Elastase/g Stuhl |

Leistungsdaten

1. Diagnostische Spezifität: 95 %

Proben von 609 gesunden Probanden wurden untersucht. 78 dieser Personen waren gesunde Blutspender, bei 531 Personen war bereits im Vorfeld eine pankreatische Erkrankung mit anderen diagnostischen Methoden (Ultraschall, ERCP) ausgeschlossen worden.

2. Diagnostische Sensitivität:

Schwere chronische Pankreatitis (unter 100 µg pankreatische Elastase pro g Stuhl): **94 %**

Proben von 46 Patienten, die unter schwerer chronischer Pankreatitis litten, wurden untersucht. Die Diagnose war nach Ultraschall und ERCP gestellt worden.

Mittlere bis leichte chronische Pankreatitis (100 bis 200 µg pankreatische Elastase pro g Stuhl): **63 %** Proben von 56 Patienten, die unter mittlerer bis leichter chronischer Pankreatitis litten, wurden untersucht. Die Diagnose war nach Ultraschall und ERCP gestellt worden.

3. Diagnostische Sensitivität für Pankreas-Karzinom: 61 %

Proben von 51 Patienten mit klinisch diagnostiziertem Pankreas-Karzinom wurden untersucht.

4. Diagnostische Sensitivität für Mukoviszidose (zystische Fibrose): 100 %

Proben von 36 Patienten mit klinisch diagnostizierter zystischer Fibrose wurden untersucht.

5. Intra-Assay Präzision

Zur Bestimmung der Intra-Assay Präzision wurden sechs, den gesamten Messbereich des Testes abdeckende und klinisch definierte Proben, in insgesamt 36 Einzelbestimmungen getestet. Die Testung wurde mit drei verschiedenen Lots durchgeführt. (N = 3 x 36)

	Elastase Konzentration (MW in µg/g)	Standardabweichung (SD in µg/g)	Variationskoeffizient (VK in %)
Probe 1	45	3,80	5,96 (3,88 – 7,10)
Probe 2	105	8,73	4,93 (3,82 – 6,03)
Probe 3	250	15,11	3,51 (2,43 – 4,85)
Probe 4	182	12,2	3,32 (2,63 – 4,07)
Probe 5	327	12,5	2,77 (2,45 – 3,14)
Probe 6	385	23,4	2,92 (2,21 – 4,01)

6. Inter-Assay Präzision

Zur Bestimmung der Inter-Assay Präzision wurden vier, den gesamten Messbereich des Testes abdeckende und klinisch definierte Proben an zehn verschiedenen Tagen bestimmt. Die Messungen wurden dabei jeweils in zwei separaten Läufen als Doppelbestimmung ausgeführt und verglichen (N = 10 x 2 x 2).

	Elastase Konzentration (MW in µg/g)	Standardabweichung (SD in µg/g)	Variationskoeffizient (VK in %)
Probe 1	55	5,17	10,21
Probe 2	264	16,67	6,62
Probe 3	193	8,79	8,26
Probe 4	328	17,66	5,62

7. Inter-Lot Präzision

Zur Bestimmung der Inter-Lot Präzision wurden sechs, den gesamten Messbereich des Testes abdeckende und klinisch definierte Proben, in drei verschiedenen Lots (N = 3) bestimmt und verglichen. Jede Messung wurde jeweils in zwei unabhängigen Läufen als Doppelbestimmung durchgeführt.

	Elastase Konzentration (MW in µg/g)	Standardabweichung (SD in µg/g)	Variationskoeffizient (VK in %)
Probe 1	92	3,85	4,17
Probe 2	248	8,03	3,24
Probe 3	102	5,30	5,19
Probe 4	187	7,68	4,10
Probe 5	316	14,32	4,53
Probe 6	396	15,56	3,93

English:

Intended Use

The Pancreatic Elastase ELISA from BIOSERV Diagnostics is an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative determination of human pancreatic elastase in faeces.

Clinical Significance

Pancreatic Elastase is a proteolytic enzyme exclusively produced in pancreas. The enzyme stability is remarkably high during the intestinal passage and is even accumulated in a six-fold concentration in stool, compared to the concentration in the duodenal juice. The determination of enzyme concentration in faeces reflects the exocrine secretory capacity of the pancreas.

The polyclonal antibodies used in this assay are specifically directed against defined peptide sequences of the human pancreatic elastase molecule. These sequences are species- and organ specific.

Fields of Application

The Pancreatic Elastase ELISA from BIOSERV Diagnostics is a part in clinical practice to diagnose exocrine pancreatic insufficiency, which may be caused by:

- Chronic pancreatitis
- Cystic fibrosis
- Diabetes mellitus
- Cholelithiasis
- Hereditary Pancreatitis
- Chronical- inflammatory bowel disease
- Pancreatic carcinoma
- Autoimmunologically caused pancreatitis
- Shwachman-Diamond-Syndrome
- Autoimmune- and connective tissue diseases
- Zollinger-Ellison-Syndrome

Principles of the Assay Method

The Pancreatic Elastase ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) from BIOSERV Diagnostics is a solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay based on a double-sandwich technique for the quantitative determination of human pancreatic elastase in faeces. Two polyclonal antibodies are recognizing several different epitopes on defined species- and organ-specific human pancreatic elastase peptide sequences. BIOSERV Diagnostics is using polyclonal antibodies which recognize several different epitopes in parallel to reach a higher diagnostic sensitivity and specificity (see bibliography).

The ELISA microplate is coated with antibodies directed against human pancreatic elastase binding the pancreatic elastase contained in the patient samples or in the standards, respectively. In the following step the second antibody, labelled with biotin, binds to the immobilized pancreatic elastase. To visualize the bound pancreatic elastase, the biotin binds in the following step to streptavidin- labelled horseradish-peroxidase. The peroxidase then oxidizes the substrate TMB (3,3',5,5'- tetramethylbenzidine). The reaction will be stopped by addition of 0.25 mol/l H₂SO₄. The developed dye (oxidized TMB) can be measured photometrically at 450 nm. A reference measurement using a reference filter at ≥ 550 nm wavelength is recommended but not mandatory.

Reagents (sufficient for 96 determinations)

1. Reference standard set (ready for use) - per vial	0.7 ml
– Standard SK15 (15 µg elastase/g – colourless screw cap with pink insert)	
– Standard 1 (50 µg elastase/g – colourless screw cap)	
– Standard 2 (100 µg elastase/g – white screw cap)	
– Standard 3 (200 µg elastase/g – yellow screw cap)	
– Standard 4 (500 µg elastase/g – blue screw cap)	
2. Control 1 (equivalent to 70 - 110 µg elastase/g – brown screw cap)	0.7 ml
3. Control 2 (equivalent to 160 - 240 µg elastase/g – green screw cap)	0.7 ml
4. Washing solution (10x)	2 x 100 ml
5. Elastase-antibody biotinylated (201x, red screw cap)	0.12 ml
6. Streptavidin conjugate (ready for use)	8 ml
7. Substrate buffer solution (solution of TMB, ready for use)	13 ml
8. Stop solution (0.25 mol/l H ₂ SO ₄ , ready for use)	13 ml
9. Microtiter strips + holder	96 wells
10. Dilution bottle for elastase-antibody biotinylated	1 x

Materials Required but not Included

1. Microplate reader with 450 nm filter, optionally with a reference filter ≥ 550 nm.
2. Microliter pipettes with disposable tips: 5 µl, 50 µl, 100 µl and 1000 µl.
3. Tubes for the dilution of the samples.
4. Ultrapure water (recommendation: according to ISO 3696 grade 1).
5. Absorbent paper.
6. Accuracy weighing scales for weighing the stool samples or BIOSERV Stool Sample Preparation Set (Cat.-No. GZ3008).
7. Incubator respectively incubation chamber for automates.
8. Extraction buffer (Cat.-No. G09038P01) or BIOSERV Stool Sample Preparation Set (Cat.-No. GZ3008)

Warnings and Precautions

1. This kit is intended for *in vitro* use only.
2. Avoid contact with the stop solution, it may cause skin irritations and burns.
3. Do not pipette reagents by mouth.
4. Please use only calibrated pipettes and instruments.
5. Please regard all samples as potentially infectious and handle them with utmost care.
6. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation where this exists.

Instructions for Reagent Preparation

1. The components of this kit are intended for use as an integral unit and should not be interchanged with the components of other kits.
2. All reagents and specimens have to be brought to room temperature (18 – 25°C / 64 – 77 °F) before use.
3. All reagents have to be mixed without foaming.
4. Once the test procedure has been started, all steps should be continued without interruption.
5. Pipette all reagents and samples onto the bottom of the wells. Mixing or shaking after pipetting is not required.
6. Use new disposable tips for each specimen.
7. Before starting the assay, all reagents to be used should be prepared and ready for immediate use, all needed strips should be secured in the holder etc. This will ensure equal time periods for each pipetting step without interruption.
8. For optimal results it is important to wash the wells thoroughly after incubation and to remove even the last water drops by hitting the plate on absorbent paper or cloth.
9. It is recommended to conduct all tests in double determination in order to minimize the

Storage Instructions and Shelf Life Information

1. Store the reagents at 2 - 8 °C (36 - 46 °F). **Do not freeze the kit or kit components!**
2. The reagents which are not yet opened remain stable until the expiration date of the kit.
Attention please: Once the kit is in use, the remaining shelf life is much shorter than mentioned at the kit label. All ingredients have to be closed accurately immediately after use, stored at 2 - 8 °C temperature and should then be used up **within the next 4 weeks**. Otherwise the results could be differing.
3. The diluted washing solution is stable for 4 weeks at refrigerator temperatures (2 - 8 °C / 36 - 46 °F).
4. The diluted extraction buffer can be stored for 4 weeks at refrigerator temperatures (2 - 8 °C / 36 - 46 °F, **not included!**).
5. Put caps back on the vials immediately after use.
6. Store the microtiter strips in a dry bag with desiccants. The remaining strips must be stored in the tightly resealed bag together with the desiccants. Under these storage conditions, they are stable at least for 4 weeks after opening of the sealed bag.

Sample Material

Human Faeces

Specimen Collection and Preparation

1. Use fresh faeces samples. Handle all samples with utmost care and treat them as potentially infectious material.
2. Samples may be stored at different temperatures for the following time-spans:
Environmental temperature up to 40 °C (104 °F): up to five days
Refrigerator temperature 2 - 8 °C (36 - 46 °F): up to one week
Household freezer temperature ca. -18 °C (-0.4 °F): up to one year
3. Procedure for watery stool:
In case of a watery stool sample, try to collect another sample with a more solid consistency. If this is not possible, the sample can be pipetted. Since the dilution of the watery stool sample may cause false pathological (false low) results, the consistency must be noted. In case of a pathological result the test needs to be repeated with a formed stool sample.

Precautions for users:

The test kit does not contain any substances of human origin. However, the stool samples must be treated as potentially infectious and handled in accordance with national safety regulations. Please adhere to the applicable regulations for accident prevention, environment protection and handling of hazardous substances. Please wear suitable protective clothing and disposable gloves in any case.

Preparation of the faeces samples

1. Preparation of the Extraction buffer (10 x concentrated, **not included!**):
 - Dilute the extraction buffer 1:10 with ultrapure water (e.g. 50 ml + 450 ml). The diluted solution can be stored for 4 weeks at refrigerator temperatures (2 - 8 °C / 36 - 46 °F).
 - Use a 12 ml tube with a spatula (or with an inoculation loop) to weigh 30 - 100 mg faeces on a scales with a sensitivity of 1 mg. Add 1 ml diluted extraction buffer per 10 mg faeces (e.g. 70 mg faeces in 7 ml buffer, 83 mg faeces in 8.3 ml buffer).
 - Homogenise the samples thoroughly by means of a vortex mixer (2 minutes). After sedimentation of solid constituents (at least 15 - 30 minutes), the supernatant can be used for the determination of the Elastase after dilution. It is also possible to let the sedimentation take place overnight at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).
2. Usage of the BIOSERV Stool Sample Preparation Set.
 - Optionally to manual weighing of faeces samples BIOSERV Diagnostics offers the completely ready-to-use Stool Sample Preparation Set (Cat.-No. GZ3008) for convenient, reliable and hygienic preparation of faeces samples. Each device is already filled with extraction buffer.

Attention: If in extraction buffer or washing solution salt crystals have been falling out, please dissolve them by shaking carefully and by growing warm in a water bath at 30 – 35 °C before use.

For later examinations the supernatants can be frozen at -18 °C for a time period of four weeks.

Attention: It is absolutely necessary to separate clearly the supernatants from the sediment before storage.

Assay Procedure

1. Preparation of the washing solution (10 x concentrated): The concentrated washing solution (100 ml) must be diluted with 900 ml ultrapure water (according to ISO 3696 grade 1).
Attention: Use ultrapure water only for preparation of washing buffer.
2. Warm all reagents to room temperature and mix thoroughly before use.
3. Fix the required number of coated wells or strips in the strip holder.
4. Dilute the supernatants of extracted faeces 1:201 (1+200) with washing solution (e.g. 25 µl supernatant + 5 ml washing solution). The dilutions are now ready for use. Please use a new disposable tip in each case.
5. Dispense 50 µl of the blank (= zero standard, = washing solution), elastase standards, controls, each extracted and diluted faeces samples with new disposable tips into the respective wells.
6. Incubate for 60 minutes at 37 °C / 98 °F.
7. Briskly shake out the contents of the strips and then rinse the wells 3 times with 200 µl washing buffer each.
8. Knock the residual water out of the wells by hitting them (in the holder) on absorbent paper or cloth.
9. Dilute the biotinylated anti-elastase antibody 1:201 (red screw cap) with washing solution. Use the included empty dilution bottle. **Attention: The dilution bottle is intended for one-time use only!** (1 part biotinylated antibody + 200 parts washing solution). Examples:
 - 5 µl biotinylated anti-elastase antibody in 1 ml washing solution (for 2 strips)
 - 10 µl biotinylated anti-elastase antibody in 2 ml washing solution (for 4 strips)
 - 15 µl biotinylated anti-elastase antibody in 3 ml washing solution (for 6 strips)
 - 25 µl biotinylated anti-elastase antibody in 5 ml washing solution (for 10 strips)Dispense 50 µl into each well.
Attention: The biotinylated antibody solution has to be prepared freshly before every run of the test.
10. Incubate for 30 minutes at 37 °C / 98 °F.
11. Briskly shake out the contents of the strips and then rinse the wells 3 times with washing solution, each time using 200 µl.
12. Knock the residual water out of the wells by hitting them (in the holder) on absorbent paper or cloth.
13. Dispense 50 µl of streptavidin peroxidase conjugate (ready for use) into each well.
14. Incubate for 30 minutes at 37 °C / 98 °F.
15. Briskly shake out the contents of the strips and then rinse the wells 3 times with washing solution, each time using 200 µl.
16. Knock the residual water out of the wells by hitting them (in the holder) on absorbent paper or cloth.
17. Dispense 100 µl of substrate solution into each well.
18. Incubate for 20 minutes at 37 °C / 98 °F. **Attention:** Set time at start of pipetting the first substrate sample. Incubate in the dark.
19. Stop the enzymatic reaction by adding 100 µl stop solution to each well. **Attention:** Apply the stop solution then in the same chronological order and using the same time intervals as when adding the substrate.
Read the absorbance of each well at 450 nm with a microplate reader. It is recommended that the wells be read within 10 minutes after stopping the enzymatic reaction. Any 96 well microplate reader capable of determining the absorbance at 450 nm may be used. A reference measurement using a wavelength ≥ 550 nm is recommended, but not absolutely necessary.

Pipetting Scheme for the Pancreatic Elastase ELISA SK15 from BIOSERV Diagnostics

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	P	1	P	9	P	17	P	25	P	33
B	SK	15	P	2	P	10	P	18	P	26	P	34
C	S	1	P	3	P	11	P	19	P	27	P	35
D	S	2	P	4	P	12	P	20	P	28	P	36
E	S	3	P	5	P	13	P	21	P	29	P	37
F	S	4	P	6	P	14	P	22	P	30	P	38
G	C	1	P	7	P	15	P	23	P	31	P	39
H	C	2	P	8	P	16	P	24	P	32	P	40

In this pipetting scheme the recommended positions for the blank (zero standard), standards (SK15 – S4), controls (C1 and C2) and for the patient samples (P1 – P40) are shown as double determinations.

Calculation of the Results

1. The manufacturer recommends for test analysis the linear regression respectively a four parameter fit.
2. Calculate the average absorbance values for each set of reference standards, controls and patient samples.
3. The average absorbance (Y) of each reference standard is plotted against its corresponding concentration (X).
4. Use the average absorbance of each patient sample to determine the corresponding elastase value by simple interpolation from this standard curve.
5. The value of control 1 should be within a range of 70 µg/g and 110 µg/g and control 2 should be within a range of 160 µg/g and 240 µg/g. If either control is outside its corresponding range the test should be repeated. In this case please check all incubation steps and times.

Limitations of the Assay

- At temperatures higher than 40 °C (104 °F) the samples should be transported cooled or refrigerated.
- Watery faeces from patients with diarrhoea may lead to falsely low readings because of a dilution effect. For further advice regarding treatment of watery stool, please refer to point 3 under paragraph "Specimen Collection and Preparation".
- If the optical density of the blanks (= zero standard, = washing solution) is higher than OD 0.15 the test should be repeated.
- It could be possible that a cross-reaction with porcine proteins may occur. Therefore it would be recommended to interrupt an enzyme substitution therapy. But there is no proven knowledge for what concerns the necessity to interrupt a substitution therapy before conducting this assay.

Expected Values

- | | |
|--|--------------------------------|
| – severe exocrine pancreatic insufficiency | < 100 µg elastase/g faeces |
| – moderate exocrine pancreatic insufficiency | 100 – 200 µg elastase/g faeces |
| – normal exocrine pancreatic function | > 200 µg elastase/g faeces |

Assay Performance Characteristics

1. Diagnostic specificity: 95 %

Samples from 609 healthy individuals were investigated. 78 of these subjects were healthy blood donors, for the remaining 531 patients a pancreatic disease had been excluded by other diagnostic methods (ultrasonography, ERCP).

2. Diagnostic sensitivity:

Severe chronic pancreatitis (below 100 mg pancreatic elastase per g stool) **94 %**

Samples from 46 patients suffering from a severe chronic pancreatitis, diagnosed by ultrasonography and ERCP, were investigated.

Mild chronic pancreatitis (between 100 and 200 mg pancreatic elastase per g stool) **63 %**

Samples from 56 patients suffering from a mild chronic pancreatitis, as diagnosed by ultrasonography and ERCP, were investigated.

3. Diagnostic sensitivity for pancreatic carcinoma: 61 %

Samples from 51 patients suffering from clinically diagnosed pancreatic cancer were investigated.

4. Diagnostic sensitivity for cystic fibrosis: 100 %

Samples from 36 patients suffering from a clinically diagnosed cystic fibrosis were investigated.

5. Intra-Assay Reproducibility

The intra-assay reproducibility was determined by measuring six clinically defined faeces samples (covering the whole measuring range of the kit) in 36 replicates each. The testing was conducted in three different lots. (N = 36 x 3)

	Elastase concentration (mean value in µg/g)	Standard deviation (SD in µg/g)	Coefficient of variation (CV in %)
Sample 1	45	3,80	5,96 (3,88 – 7,10)
Sample 2	105	8,73	4,93 (3,82 – 6,03)
Sample 3	250	15,11	3,51 (2,43 – 4,85)
Sample 4	182	12,2	3,32 (2,63 – 4,07)
Sample 5	327	12,5	2,77 (2,45 – 3,14)
Sample 6	385	23,4	2,92 (2,21 – 4,01)

6. Inter-Assay Reproducibility

The inter-assay reproducibility was determined by measuring four clinically defined faeces samples (covering the whole measuring range of the kit) on ten individual days. The measurements were conducted in two separate runs each and as double replicate. (N = 10 x 2 x 2)

	Elastase concentration (mean value in µg/g)	Standard deviation (SD in µg/g)	Coefficient of variation (CV in %)
Sample 1	55	5,17	10,21
Sample 2	264	16,67	6,62
Sample 3	193	8,79	8,26
Sample 4	328	17,66	5,62

7. Inter-Lot Reproducibility

The inter-lot reproducibility was determined by measuring six clinically defined faeces samples (covering the whole measuring range of the kit) in three different lots (N = 3). The measurements were conducted in two separate runs each as double replicate.

	Elastase concentration (mean value in µg/g)	Standard deviation (SD in µg/g)	Coefficient of variation (CV in %)
Sample 1	92	3,85	4,17
Sample 2	248	8,03	3,24
Sample 3	102	5,30	5,19
Sample 4	187	7,68	4,10
Sample 5	316	14,32	4,53
Sample 6	396	15,56	3,93

Bibliography Regarding the Pancreatic Elastase ELISA from BIOSERV Diagnostics

- Weiss FU, Budde C, Lerch MM (2016): Specificity of a Polyclonal Fecal Elastase ELISA for CELA3. *PLoS One*. 2016 Jul 26;11(7):e0159363.
- Erickson JA, Aldeen WE, Grenache DG, Ashwood ER (2008): Evaluation of a fecal pancreatic elastase-1 enzyme-linked immunosorbent assay: Assessment versus an established assay and implication in classifying pancreatic function. *Clinica Chimica Acta*, Vol 397, issues 1-2, November 2008, pages 87-91.
- Qualia CM, Villalona JF, Ren C, Rossi TM (2007): Specificity of the Polyclonal Antibody Test System For Human Elastase in Stool. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol 45:E26 # 66, 2007
- Weiss U, Ruthenbueger M, Hammer E, Voelker U, Lerch MM (2006): Assessment of Isoform Specificity of a Polyclonal Elastase ELISA. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 43:E32 # 58, 2006.
- Abdel Rahman A, Abdul Wahab A, Abdel Rahman MO (2006): Faecal elastase-1 concentration in cystic fibrosis patients with CFTR I1234V mutation. *Acta Paediatrica*, 95: 1066-1069.
- Hahn JU, Bochnig S, Kerner W, Koenig H, Sporleder B, Lankisch PG, Maisonneuve P, Lowenfels AB (2005): A New Fecal Elastase 1 Test Using Polyclonal Antibodies for the Detection of Exocrine Pancreatic Insufficiency. *Pancreas* Vol 30, No 2, pages 189 – 190.
- Miendje Y, Maisin D, Sipewa MJ, Deprez P, Buts JP, De Nayer P, and Philippe M (2004): Polyclonal versus monoclonal ELISA for the determination of faecal elastase-1: Diagnostic Value in Cystic Fibrosis and Chronic Pancreatic Insufficiency. *Clinical Laboratory*, Vol. 50, Nr. 7+8, pages 419 – 414
- Keim V, Teich N, and Moessner J (2003): Clinical Value of a New Fecal Elastase Test for Detection of Chronic Pancreatitis. *Clinical Laboratory* Vol. 5 +6, pages 209 – 215.
- Garcia-Bueno CA, Rossi TM, Lee KW, Yuwono, MT, Robinson A, Tjota A (2002): Quantification of fecal elastase-1 using either polyclonal or monoclonal antibodies. *Gastroenterology* Vol. 122 (4), page A-510.
- Deprez PH, Natale M Del, Deji MYV, Pauwels S, Philippe M (2002): Comparative Evaluation of 13C- Mixed Triglyceride Breath Test and Faecal Elastase 1 Tests in the Assessment of Exocrine Pancreatic Insufficiency. *Gastroenterology*, Vol 122, no 4, page A-510.
- Tomášová H, Zemková D, Bartosová J, Skalická, V, Koloušková S, Nevoral J, Macek MJ and Vávrová V (2002): Proper interpretation of Elastase 1 activities in Stool: experience of the Prague CF centre. *Proceedings of the 25th European Cystic Fibrosis Conference (Volume ISBN 88-323-2622-1, CD ISBN 88-323-2623-X)*; page 111 – 114
- Keim V, Teich N, and Moessner J. (2000): Value of polyclonal elastase ELISA for diagnosis of chronic pancreatitis. *Pancreas*, Vol. 21, Number 4, November 2000, page 453.

Português:

Utilização prevista

O Pancreatic Elastase ELISA da BIOSERV Diagnostics é um ensaio de imunoabsorção enzimática para a determinação quantitativa da elastase pancreática humana em fezes.

Significado clínico

A elastase pancreática é uma enzima proteolítica produzida exclusivamente no pâncreas. A estabilidade da enzima é notavelmente elevada durante a passagem intestinal, sendo mesmo acumulada numa concentração seis vezes superior nas fezes, em comparação com a concentração no suco duodenal. A determinação da concentração da enzima nas fezes reflete a capacidade secretora exócrina do pâncreas.

Os anticorpos policlonais utilizados neste ensaio estão especificamente direcionados contra sequências definidas de péptidos da molécula da elastase pancreática humana. Estas sequências são específicas da espécie e do órgão.

Campos de aplicação

O Pancreatic Elastase ELISA da BIOSERV Diagnostics faz parte da prática clínica para diagnosticar a insuficiência pancreática exócrina, que pode ser causada por:

- pancreatite crónica
- fibrose quística
- diabetes mellitus
- litíase da via biliar principal
- pancreatite hereditária
- doença inflamatória crónica do intestino
- carcinoma pancreático
- pancreatite autoimune
- síndrome de Shwachman-Diamond
- doenças autoimunes e do tecido conjuntivo
- síndrome de Zollinger-Ellison

Princípios do método de ensaio

O Pancreatic Elastase ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay - Ensaio de imunoabsorção enzimática) da BIOSERV Diagnostics é um ensaio de imunoabsorção enzimática de fase sólida baseado numa técnica de sanduíche dupla, para a determinação quantitativa da elastase pancreática humana em fezes. Dois anticorpos policlonais reconhecem vários epitopos diferentes em sequências de péptidos de elastase pancreática humana específica da espécie e do órgão. A BIOSERV Diagnostics utiliza anticorpos policlonais que reconhecem vários epitopos diferentes em paralelo para atingir uma sensibilidade e especificidade de diagnóstico mais elevadas (ver bibliografia).

A microplaca ELISA está revestida com anticorpos direcionados contra a elastase pancreática humana, que se ligam à elastase pancreática contida nas amostras do paciente ou nos padrões, respetivamente. No passo seguinte, o segundo anticorpo, rotulado com biotina, liga-se à elastase pancreática imobilizada. Para visualizar a elastase pancreática ligada, a biotina liga-se, no passo seguinte, à peroxidase de rábano rotulada com estreptavidina. A peroxidase oxida então o substrato TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina). A reação será interrompida adicionando 0,25 mol/l H₂SO₄. O corante desenvolvido (TMB oxidado) poderá ser medido fotometricamente a 450 nm. Recomenda-se, não sendo obrigatória, uma medição de referência utilizando um filtro de referência com o comprimento de onda ≥ 550 nm.

Reagentes (suficiente para 96 determinações)

1. Conjunto de padrão de referência (pronto a utilizar) - por frasco	0,7 ml
– Padrão SK15 (15 µg elastase/g – tampa de enroscar incolor com entalhe cor-de-rosa)	
– Padrão 1 (50 µg elastase/g – tampa de enroscar incolor)	
– Padrão 2 (100 µg elastase/g – tampa de enroscar branca)	
– Padrão 3 (200 µg elastase/g – tampa de enroscar amarela)	
– Padrão 4 (500 µg elastase/g – tampa de enroscar azul)	
2. Controlo 1 (equivalente a 70 - 110 µg elastase/g – tampa de enroscar castanha)	0,7 ml
3. Controlo 2 (equivalente a 160 - 240 µg elastase/g – tampa de enroscar verde)	0,7 ml
4. Solução de lavagem (10x)	2 x 100 ml
5. Anticorpo de elastase biotilado (201x, tampa de enroscar vermelha)	0,12 ml
6. Conjugado de estreptavidina (pronto a utilizar)	8 ml
7. Solução de tampão de substrato (solução de TMB, pronta a utilizar)	13 ml
8. Solução de paragem (0,25 mol/l H ₂ SO ₄ , pronta a utilizar)	13 ml
9. Tiras de microtitulação + suporte	96 poços
10. Frasco de diluição para anticorpo de elastase biotilado	1 x

Materiais necessários, mas não incluídos

1. Leitor de microplacas com filtro de 450 nm, em opção com um filtro de referência ≥ 550 nm.
2. Pipetas de microtitulação com pontas descartáveis: 5 µl, 50 µl, 100 µl e 1000 µl.
3. Tubos para diluição das amostras.
4. Água ultrapura (recomendação: de acordo com a ISO 3696 grau 1).
5. Papel absorvente.
6. Balanças de precisão para pesar as amostras de fezes ou o Conjunto de preparação de amostras de fezes BIOSERV (N.º cat. GZ3008).
7. Incubador respetivamente câmara de incubação para autómatos.
8. Tampão de extração (N.º cat. G09038P01) ou Conjunto de preparação de amostras de fezes BIOSERV (N.º cat. GZ3008)

Avisos e precauções

1. Este kit está previsto apenas para utilização *in vitro*.
2. Evite o contacto com a solução de paragem, pois pode causar irritações cutâneas e queimaduras.
3. Não pipete reagentes com a boca.
4. Utilize apenas pipetas e instrumentos calibrados.
5. Considere todas as amostras como potencialmente infecciosas e manuseie-as com todo o cuidado.
6. O manuseamento e a eliminação deverão ser de acordo com os procedimentos definidos por orientações ou regulamentos nacionais adequados de segurança para risco biológico, onde existam.

Instruções para preparação do reagente

1. Os componentes deste kit estão concebidos para utilização como unidade integral, e não devem ser trocados com componentes de outros kits.
2. Todos os reagentes e amostras devem ser colocados à temperatura ambiente (18 - 25 °C) antes da utilização.
3. Todos os reagentes devem ser misturados sem criar espuma.
4. Após iniciar o procedimento de teste, todos os passos deverão ser realizados sem interrupção.
5. Pipete todos os reagentes e amostras para o fundo dos poços. Não é necessário misturar ou agitar após a pipetagem.
6. Utilize pontas descartáveis novas para cada amostra.
7. Antes de iniciar o ensaio, todos os reagentes a utilizar deverão estar preparados e prontos para utilização imediata; todas as tiras necessárias deverão estar presas no suporte, etc. Isto garantirá períodos de tempo idênticos par cada passo de pipetagem, sem interrupção.
8. Para resultados ideais, é importante lavar os poços cuidadosamente, após a incubação, e remover todas as gotas de água batendo com a placa em papel absorvente ou num pano.

9. Recomenda-se realizar todos os testes em determinação dupla, para minimizar as consequências da pipetagem ou erros de manuseamento.

Instruções de armazenagem e informação de prazo de validade em armazenagem

1. Armazene os reagentes a 2 - 8 °C. **Não congele o kit ou os respetivos componentes!**
2. Os reagentes que ainda não estão abertos permanecem estáveis até ao prazo de validade do kit. Tenha em atenção: assim que o kit estiver a ser utilizado, o prazo de validade restante é muito inferior ao indicado no rótulo do kit. Todos os ingredientes deverão ser cuidadosamente fechados imediatamente após a utilização, conservados a uma temperatura de 2 - 8 °C e deverão então ser utilizados **durante as 4 semanas seguintes**. Caso contrário, os resultados podem ser afetados.
3. A solução de lavagem diluída é estável durante 4 semanas a temperaturas de frigorífico (2 - 8 °C).
4. O tampão de extração diluído pode ser armazenado durante 4 semanas a temperaturas de frigorífico (2 - 8 °C, **não incluído!**).
5. Volte a colocar as tampas nos frascos imediatamente após a utilização.
6. Armazene as tiras de microtitulação num saco seco com dessecantes. As tiras restantes deverão ser armazenadas no saco bem fechado, juntamente com os dessecantes. Nestas condições de armazenagem, estão estáveis durante, pelo menos, 4 semanas após a abertura do saco selado.

Material da amostra

Fezes humanas

Recolha e preparação da amostra

1. Utilize amostras de fezes frescas. Manuseie todas as amostras com todo o cuidado e trate-as como material potencialmente infeccioso.
2. As amostras deverão ser armazenadas a diferentes temperaturas, durante os períodos de tempo seguintes:

Temperatura ambiente até 40 °C:	até cinco dias
Temperatura de frigorífico 2 - 8 °C:	até uma semana
Temperatura de congelador doméstico, aproximadamente -18 °C:	até um ano
3. Procedimento para fezes aquosas:

Em caso de amostra de fezes aquosas, tente recolher outra amostra com consistência mais sólida. Caso não seja possível, a amostra poderá ser pipetada. Uma vez que a diluição da amostra de fezes aquosas pode causar resultados patológicos falsos (baixos falsos), a consistência deve ser registada. No caso de um resultado patológico, o teste deverá ser repetido com uma amostra de fezes formada.

Precauções de utilização:

O kit de teste não contém quaisquer substâncias de origem humana. No entanto, as amostras de fezes devem ser tratadas como potencialmente infecciosas e manuseadas de acordo com os regulamentos de segurança nacionais. Consulte os regulamentos aplicáveis para prevenção de acidentes, proteção do ambiente e manuseamento de substâncias perigosas. Utilize sempre vestuário de proteção adequado e luvas descartáveis.

Preparação das amostras de fezes

1. Preparação do tampão de extração (10 x concentrado, **não incluído!**):
 - Dilua o tampão de extração 1:10 com água ultrapura (por exemplo, 50 ml + 450 ml). A solução diluída pode ser armazenada durante 4 semanas a temperaturas de frigorífico (2 - 8 °C).
 - Utilize um tubo de 12 ml com uma espátula (ou com uma ansa de inoculação) para pesar 30 – 100 mg de fezes numa balança com sensibilidade de 1 mg. Adicione 1 ml de tampão de extração diluído por 10 mg de fezes (por exemplo, 70 mg de fezes em 7 ml de tampão, 83 mg de fezes em 8,3 ml de tampão).
 - Homogeneíze as amostras cuidadosamente através de um misturador Vortex (2 minutos). Após a sedimentação dos componentes sólidos (pelo menos 15 - 30 minutos), o sobrenadante pode ser utilizado

para a determinação da elastase após a diluição. É também possível deixar a sedimentação ocorrer durante a noite a 2 - 8 °C.

2. Utilização do Conjunto de preparação de amostras de fezes BIOSERV.

- Como alternativa à pesagem manual de amostras de fezes, a BIOSERV Diagnostics oferece o Conjunto de preparação de amostras de fezes totalmente pronto a utilizar (N.º de cat. GZ3008), para a preparação conveniente, fiável e higiénica de amostras de fezes. Cada dispositivo está já cheio com tampão de extração.

Atenção: Se caírem cristais de sal do tampão de extração ou da solução de lavagem, dissolva-os agitando cuidadosamente e aquecendo em banho-maria a 30 - 35 °C antes da utilização.

Para exames posteriores, os sobrenadantes podem ser congelados a -18 °C durante até quatro semanas.

Atenção: É absolutamente necessário separar claramente os sobrenadantes do sedimento antes do armazenamento.

Procedimento de ensaio

1. Preparação da solução de lavagem (10 x concentrado): A solução de lavagem concentrada (100 ml) deve ser diluída com 900 ml de água ultrapura (de acordo com a ISO 3696 grau 1).
Atenção: Utilize água ultrapura apenas para a preparação do tampão de lavagem.
2. Aqueça todos os reagentes até à temperatura ambiente e misture cuidadosamente antes da utilização,
3. Fixe o número necessário de poços revestidos ou tiras no suporte de tiras.
4. Dilua os sobrenadantes das fezes extraídas a 1:201 (1+200) com solução de lavagem (por exemplo, 25 µl de sobrenadante + 5 ml de solução de lavagem). As diluições estão agora prontas a utilizar. Utilize uma ponta descartável nova em cada caso.
5. Dispense 50 µl em branco (= zero padrão, = solução de lavagem), padrões de elastase, controlos, cada amostra de fezes extraída e diluída com novas pontas descartáveis nos poços respetivos.
6. Incube durante 60 minutos a 37 °C.
7. Agite vigorosamente os conteúdos das tiras e enxague os poços 3 vezes com 200 µl de tampão de lavagem de cada vez.
8. Retire a água residual dos poços batendo com eles (no suporte) em papel absorvente ou num pano.
9. Dilua o anticorpo antielastase biotilado a 1:201 (tampa de enroscar vermelha) com solução de lavagem. Utilize o frasco de diluição vazio incluído. **Atenção: O frasco de diluição está previsto apenas para uma utilização!** (1 parte anticorpo biotilado + 200 partes de solução de lavagem). Exemplos:
 - 5 µl anticorpo antielastase biotilado em 1 ml de solução de lavagem (para 2 tiras)
 - 10 µl anticorpo antielastase biotilado em 2 ml de solução de lavagem (para 4 tiras)
 - 15 µl anticorpo antielastase biotilado em 3 ml de solução de lavagem (para 6 tiras)
 - 25 µl anticorpo antielastase biotilado em 5 ml de solução de lavagem (para 10 tiras)Dispense 50 µl em cada poço.
Atenção: A solução de anticorpo biotilado deve ser preparada de fresco antes de cada execução do teste.
10. Incube durante 30 minutos a 37 °C.
11. Agite vigorosamente os conteúdos das tiras e enxague os poços 3 vezes com solução de lavagem, utilizando 200 µl de cada vez.
12. Retire a água residual dos poços batendo com eles (no suporte) em papel absorvente ou num pano.
13. Dispense 50 µl de conjugado de peroxidase de estreptavidina (pronto a utilizar) em cada poço.
14. Incube durante 30 minutos a 37 °C.
15. Agite vigorosamente os conteúdos das tiras e enxague os poços 3 vezes com solução de lavagem, utilizando 200 µl de cada vez.
16. Retire a água residual dos poços batendo com eles (no suporte) em papel absorvente ou num pano.
17. Dispense 100 µl de solução de substrato em cada poço.

18. Incube durante 20 minutos a 37 °C. **Atenção:** Registe o tempo no início da pipetagem da primeira amostra de substrato. Incube num local escuro.
19. Interrompa a reação enzimática adicionando 100 µl de solução de paragem a cada poço. **Atenção:** Aplique a solução de paragem pela mesma ordem cronológica e utilizando os mesmos intervalos utilizados ao adicionar o substrato.

Leia a absorbância de cada poço a 450 nm com um leitor de microplacas. Recomenda-se que os poços sejam lidos no prazo de 10 ml após parar a reação enzimática. Pode utilizar-se qualquer leitor de microplacas com 96 poços, capaz de determinar a absorbância a 450 nm. Recomenda-se uma medição de referência, utilizando um comprimento de onda \geq 550 nm, mas não é absolutamente necessário.

Esquema de pipetagem para o Pancreatic Elastase ELISA SK15 da BIOSERV Diagnostics

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EM BRANCO	EM BRANCO	P	1	P	9	P	17	P	25	P	33
B	SK	15	P	2	P	10	P	18	P	26	P	34
C	S	1	P	3	P	11	P	19	P	27	P	35
D	S	2	P	4	P	12	P	20	P	28	P	36
E	S	3	P	5	P	13	P	21	P	29	P	37
F	S	4	P	6	P	14	P	22	P	30	P	38
G	C	1	P	7	P	15	P	23	P	31	P	39
H	C	2	P	8	P	16	P	24	P	32	P	40

Neste esquema de pipetagem, as posições recomendadas para a posição em branco (padrão zero), padrões (SK15 – S4), os controlos (C1 e C2) e as amostras do paciente (P1 – P40) estão mostradas como determinações duplas.

Cálculo dos resultados

1. O fabricante recomenda a análise de teste da regressão linear com um ajuste de quatro parâmetros, respetivamente.
2. Calcule os valores de absorbância médios para cada conjunto de padrões de referência controlos e amostras de paciente.
3. A absorbância média (Y) de cada padrão de referência é traçada em relação à sua concentração correspondente (X).
4. Utilize a absorbância média de cada amostra de paciente para determinar o valor de elastase correspondente pela simples interpolação desta curva padrão.
5. O valor do controlo 1 deverá estar entre 70 µg/g e 110 µg/g e o controlo 2 deverá estar entre 160 µg/g e 240 µg/g. Caso algum dos controlos esteja fora do intervalo correspondente, o teste deverá ser repetido. Neste caso, verifique todos os passos e tempos de incubação.

Limitações do ensaio

- A temperaturas superiores a 40 °C, as amostras deverão ser transportadas arrefecidas ou refrigeradas.
- As fezes aquosas de pacientes com diarreia podem levar a leituras baixas falsas devido ao efeito de diluição. Para mais conselhos relativamente ao tratamento de fezes aquosas, consulte o ponto 3 no parágrafo «Recolha e preparação da amostra».
- Se a densidade ótica dos em branco (= padrão zero, = solução de lavagem) for superior a DO 0,15, o teste deverá ser repetido.
- É possível a ocorrência de uma reação cruzada com proteínas de suíno. Nesse caso, recomendar-se-ia interromper uma terapia de substituição de enzimas. No entanto, não existem dados comprovados sobre o que indicará a necessidade de interromper uma terapia de substituição antes de realizar este ensaio.

Valores esperados

- insuficiência pancreática exócrina grave < 100 µg elastase/g fezes
- insuficiência pancreática exócrina moderada 100 - 200 µg elastase/g fezes
- função pancreática exócrina normal > 200 µg elastase/g fezes

Características de desempenho do ensaio

1. Especificidade do diagnóstico: 95 %

Investigaram-se amostras de 609 pessoas saudáveis. 78 destes participantes eram doadores de sangue saudáveis, para os restantes 531 pacientes, tinha-se excluído uma doença pancreática por outros métodos de diagnóstico (ultrassonografia, CPRE).

2. Sensibilidade do diagnóstico:

Pancreatite crónica grave (inferior a 100 mg de elastase pancreática por g de fezes) **94 %**

Investigaram-se amostras de 46 pacientes que sofriam de pancreatite crónica grave, diagnosticada por ultrassonografia e CPRE.

Pancreatite crónica ligeira (entre 100 e 200 mg de elastase pancreática por g de fezes) **63 %**

Investigaram-se amostras de 56 pacientes que sofriam de pancreatite crónica ligeira, conforme diagnóstico por ultrassonografia e CPRE.

3. Sensibilidade do diagnóstico para carcinoma pancreático: 61 %

Foram investigadas amostras de 51 pacientes que sofriam de cancro pancreático, clinicamente diagnosticado.

4. Sensibilidade do diagnóstico para fibrose quística: 100 %

Foram investigadas amostras de 36 pacientes que sofriam de fibrose quística, clinicamente diagnosticada.

5. Reprodutibilidade intraensaio

A reprodutibilidade intraensaio foi determinada medindo seis amostras de fezes clinicamente definidas (cobrindo todo o intervalo de medição do kit) em 36 réplicas cada. Os testes foram realizados em três lotes diferentes. (N = 36 x 3)

	Concentração de elastase (valor médio em µg/g)	Desvio padrão (DP em µg/g)	Coefficiente de variação (CV em %)
Amostra 1	45	3,80	5,96 (3,88 – 7,10)
Amostra 2	105	8,73	4,93 (3,82 – 6,03)
Amostra 3	250	15,11	3,51 (2,43 – 4,85)
Amostra 4	182	12,2	3,32 (2,63 – 4,07)
Amostra 5	327	12,5	2,77 (2,45 – 3,14)
Amostra 6	385	23,4	2,92 (2,21 – 4,01)

6. Reprodutibilidade interensaio

A reprodutibilidade interensaio foi determinada medindo quatro amostras de fezes clinicamente definidas (cobrindo todo o intervalo de medição do kit) em dez dias individuais. As medições foram realizadas em duas execuções separadas e como réplica dupla. (N = 10 x 2 x 2)

	Concentração de elastase (valor médio em µg/g)	Desvio padrão (DP em µg/g)	Coefficiente de variação (CV em %)
Amostra 1	55	5,17	10,21
Amostra 2	264	16,67	6,62
Amostra 3	193	8,79	8,26
Amostra 4	328	17,66	5,62

7. Reprodutibilidade interlote

A reprodutibilidade interlote foi determinada medindo seis amostras de fezes clinicamente definidas (cobrindo todo o intervalo de medição do kit) em três lotes diferentes (N = 3). As medições foram realizadas em duas execuções separadas cada e como réplica dupla.

	Concentração de elastase (valor médio em µg/g)	Desvio padrão (DP em µg/g)	Coefficiente de variação (CV em %)
Amostra 1	92	3,85	4,17
Amostra 2	248	8,03	3,24
Amostra 3	102	5,30	5,19
Amostra 4	187	7,68	4,10
Amostra 5	316	14,32	4,53
Amostra 6	396	15,56	3,93

Bibliografia relacionada com o Pancreatic Elastase ELISA da BIOSERV Diagnostics

- Weiss FU, Budde C, Lerch MM (2016): Specificity of a Polyclonal Fecal Elastase ELISA for CELA3. *PLoS One*. 26 jul 2016;11(7):e0159363.
- Erickson JA, Aldeen WE, Grenache DG, Ashwood ER (2008): Evaluation of a fecal pancreatic elastase-1 enzyme-linked immunosorbent assay: Assessment versus an established assay and implication in classifying pancreatic function. *Clinica Chimica Acta*, Vol 397, edições 1-2, novembro 2008, páginas 87-91.
- Qualia CM, Villalona JF, Ren C, Rossi TM (2007): Specificity of the Polyclonal Antibody Test System For Human Elastase in Stool. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol 45:E26 # 66, 2007
- Weiss U, Ruthenbueger M, Hammer E, Voelker U, Lerch MM (2006): Assessment of Isoform Specificity of a Polyclonal Elastase ELISA. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 43:E32 # 58, 2006.
- Abdel Rahman A, Abdul Wahab A, Abdel Rahman MO (2006): Faecal elastase-1 concentration in cystic fibrosis patients with CFTR I1234V mutation. *Acta Paediatrica*, 95: 1066-1069.
- Hahn JU, Bochnig S, Kerner W, Koenig H, Sporleder B, Lankisch PG, Maisonneuve P, Lowenfels AB (2005): A New Fecal Elastase 1 Test Using Polyclonal Antibodies for the Detection of Exocrine Pancreatic Insufficiency. *Pancreas* Vol 30, N.º 2, páginas 189 – 190.
- Miendje Y, Maisin D, Sipewa MJ, Deprez P, Buts JP, De Nayer P, and Philippe M (2004): Polyclonal versus monoclonal ELISA for the determination of faecal elastase-1: Diagnostic Value in Cystic Fibrosis and Chronic Pancreatic Insufficiency. *Clinical Laboratory*, Vol. 50, N.º 7+8, páginas 419 – 414
- Keim V, Teich N, and Moessner J (2003): Clinical Value of a New Fecal Elastase Test for Detection of Chronic Pancreatitis. *Clinical Laboratory* Vol. 5 +6, páginas 209 – 215.
- Garcia-Bueno CA, Rossi TM, Lee KW, Yuwono, MT, Robinson A, Tjota A (2002): Quantification of fecal elastase-1 using either polyclonal or monoclonal antibodies. *Gastroenterology* Vol. 122 (4), página A-510.
- Deprez PH, Natale M Del, Deji MYV, Pauwels S, Philippe M (2002): Comparative Evaluation of 13C- Mixed Triglyceride Breath Test and Faecal Elastase 1 Tests in the Assessment of Exocrine Pancreatic Insufficiency. *Gastroenterology*, Vol 122, n.º 4, página A-510.
- Tomášová H, Zemková D, Bartosová J, Skalická, V, Koloušková S, Nevoral J, Macek MJ and Vávrová V (2002): Proper interpretation of Elastase 1 activities in Stool: experience of the Prague CF centre. *Proceedings of the 25th European Cystic Fibrosis Conference (Volume ISBN 88-323-2622-1, CD ISBN 88-323-2623-X)*; página 111 – 114
- Keim V, Teich N, and Moessner J. (2000): Value of polyclonal elastase ELISA for diagnosis of chronic pancreatitis. *Pancreas*, Vol. 21, Número 4, novembro 2000, página 453.

Also available from BIOSERV Diagnostics:

Please contact us for more information: info@bioserv-diagnostics.com

Gastroenterology	Order Code	Determinations per Kit
Human Pancreatic Elastase ELISA (pancreatic insufficiency)	BS - 86 - 01	96
Accessories Kit: Stool Sample Preparation Kit with 45 Tubes	BS - 00 - 03	
Pankrin™ ELISA (acute pancreatitis)	BS - 86 - 02	96
Infertility		
Anti-Spermatozoa Antibody Latex Agglutination Test	BS- 10 - 10	50
Anti-Spermatozoa Antibody ELISA for Serum	BS - 10 - 20	96
Anti-Spermatozoa Antibody ELISA for Seminal Plasma	BS - 10 - 21	96
Anti-Spermatozoa Antibody Haemagglutination Test	BS - 10 - 30	40
Anti-Spermatozoa Antibody ELISA - Ig Classifying for Serum	BS - 10 - 50	96
Anti-Zona Pellucida Antibody Latex Agglutination Test	BS - 20 - 10	50
Anti-Zona Pellucida Antibody ELISA	BS - 20 - 20	96
Anti-Zona Pellucida Antibody Haemagglutination Test	BS - 20 - 30	40
Anti-Zona Pellucida Antibody ELISA - Ig Classifying	BS - 20 - 50	96
Anti-Ovary Antibody Latex Agglutination Test	BS - 40 - 10	50
Anti-Ovary Antibody ELISA	BS - 40 - 20	96
Anti-Ovary Antibody Haemagglutination Test	BS - 40 - 30	40
Anti-Ovary Antibody ELISA - Ig Classifying	BS - 40 - 50	96
Monitoring of Risk Pregnancies		
IGF-BP1 ELISA (PP12)	BS - 30 - 10	96
Glycodelin ELISA (PP14)	BS - 30 - 20	96

BIOSERV Diagnostics GmbH

Doberaner Str. 151

18057 ROSTOCK / GERMANY

Phone: +49 (0) 381 3758 2091

Fax: +49 (0) 381 3758 2099

E-mail: info@bioserv-diagnostics.com

Web: www.bioserv-diagnostics.com

