

Instructions for use/Testanleitung


Pankrin™ ELISA

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 bei 2 – 8 °C

ELISA for the quantitative determination of pancreatic elastase and other pancreatic enzymes for the diagnosis of acute pancreatitis in human serum
ELISA zur quantitativen Bestimmung pankreatischer Elastase und weiterer pankreatischer Enzyme im Serum zur Diagnose einer akuten Pankreatitis

- For *in vitro* diagnostic use only -

- Nur zur *in vitro* Diagnostik -

 EU Registration No.: DE/CA81/IVD1688

Certified Quality Management System according to

DIN EN ISO 13485:2007

DIN EN ISO 9001:2008

R-Biopharm Order Code Number: G09039



Manufacturer: BIOSERV Diagnostics GmbH
Doberaner Str. 151, 18057 Rostock, Germany
Phone: +49 381 3758 2090
Fax: +49 381 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 6151 8102 0 ; Fax: +49 6151 8102 20
www.r-biopharm.com
E-mail: info@r-biopharm.com

Deutsch:

Verwendungszweck

Der Pankrin®-ELISA von BIOSERV Diagnostics dient der Diagnose oder dem Ausschluss einer akuten Pankreatitis bzw. eines akuten Schubes einer chronischen Pankreatitis bei Patienten mit Schmerzen im abdominalen Bereich.

Klinische Relevanz

Unter einer akuten Pankreatitis versteht man eine akute Entzündung des Pankreas. Die wichtigsten Mechanismen bei der akuten Pankreatitis sind die dystope Proteaseaktivierung in den Azinuszellen, die Blockade der luminalen Sekretion und die Bildung intrazellulärer Vakuolen (Schneider *et al.* 1999). Die jährliche Inzidenzrate liegt bei 50 bis 100 Erkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr. Das klinische Bild ist durch ausgeprägte abdominale Schmerzen und Allgemeinsymptome (Übelkeit, Erbrechen, Kreislaufschock) gekennzeichnet (Selberg und Henkel 1995). Die leichte Form, die ödematöse Pankreatitis (etwa 80 %), verläuft unkompliziert und eine Besserung unter adäquater Therapie tritt innerhalb von 72 Stunden ein. Die schwere Form, die hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis, wird durch Nekrosebildung und einen protrahierten Verlauf geprägt, wobei es häufig zu systemischen Komplikationen mit Versagen einzelner oder mehrerer Organsysteme kommt (Asanuma *et al.* 1999, Singer *et al.* 1988). Morphologisch treten eine Verdickung, eine unregelmäßige Begrenzung der Drüse und Flüssigkeit im Peritonealraum auf.

Hauptursachen der akuten Pankreatitis sind Alkoholabusus (Bank *et al.* 1999, Lankisch 2000) und eingeklemmte Gallensteine, die möglicherweise über einen Reflux in den Pankreasgang gelangen (Niederau *et al.* 1997, UHL *et al.* 1999, Sharma *et al.* 1999). Andere pathogenetische Faktoren sind seltener. Bei einem nicht unerheblichen Prozentsatz der Patienten mit akuter Pankreatitis wird kein Risikofaktor gefunden. Der Altersgipfel für Cholelithiasis (Gallensteinleiden) liegt zwischen 40-60 Jahren, für Alkoholabusus zwischen 20-40 Jahren.

Anwendungsgebiete

In der exokrinen Pankreasfunktionsdiagnostik unterstützt der Pankrin®-ELISA von BIOSERV Diagnostics als hochsensitives, hochspezifisches und in der klinischen Routine praktikables indirektes Testverfahren die Aussage der vom behandelnden Arzt mit sonographischen Untersuchungsmethoden gestellten Anfangsdiagnose.

Testprinzip

Der Pankrin®-ELISA von BIOSERV Diagnostics dient zur quantitativen Bestimmung der pankreatischen Elastase in Serum. Zur Erhöhung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität werden im Pankrin®-ELISA zusätzlich weitere pankreatische Enzyme im Serum detektiert. Die mit dem Pankrin®-ELISA von BIOSERV Diagnostics bestimmten Proteine sind absolut pankreasspezifisch. Die Bestimmung der Proteine erfolgt im Pankrin®-ELISA über die Molekülstruktur und nicht wie bei klinisch-chemischen Testverfahren über die Enzymaktivität, so dass auch bereits inaktivierte pankreatische Enzyme im Serum nachgewiesen werden. Die Summe der bei einem akuten Schub in das Serum gelangten pankreatischen Proteine kann über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden als die jeweiligen Einzelenzyme (Keim *et al.* 2003).

Der Pankrin[®]-ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) von BIOSERV Diagnostics ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Basis der Doppelsandwichttechnik arbeitet. Hochspezifische polyklonale Antikörper, die ausschließlich gegen Epitope auf humanen pankreatischen Proteinen gerichtet sind, sind an die Oberfläche der Näpfe der ELISA-Platte gebunden. Während der ersten Inkubationsphase werden pankreatische Proteine aus Serumproben bzw. Standards durch diese Antikörper gebunden und dadurch immobilisiert. Ein zweites Gemisch, diesmal mit Biotin konjugierter, wiederum ausschließlich pankreasprotein-spezifischer polyklonaler Antikörper reagiert in der sich anschließenden Inkubationsphase mit den in den Näpfen immobilisierten Pankreasproteinen. In der nächsten Inkubationsphase binden die zugegebenen Peroxidase-Streptavidin-Komplexe an das Biotin des Antikörper-Biotin-Konjugates. Durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase wird das Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) oxidiert. Die Enzymaktivität wird nach einer definierten Zeit durch Zugabe von 0,25 molarer Schwefelsäure (H₂SO₄) beendet. Das oxidierte TMB wird photometrisch bei 450 nm bestimmt. Eine Referenzmessung mit einer Wellenlänge von ≥ 550 nm wird empfohlen, ist aber nicht zwingend.

Bestandteile des Kits

(ausreichend für 96 Bestimmungen)

1.	Pankrin [®] Standardreihe 2x – pro Fläschchen	0,5 ml
–	Standard 1, lyophilisiert (100 Pankrin [®] -Einheiten/ml Serum – farbloser Schraubdeckel)	
–	Standard 2, lyophilisiert (200 Pankrin [®] -Einheiten/ml Serum – weißer Schraubdeckel)	
–	Standard 3, lyophilisiert (400 Pankrin [®] -Einheiten/ml Serum – gelber Schraubdeckel)	
–	Standard 4, lyophilisiert (800 Pankrin [®] -Einheiten/ml Serum – blauer Schraubdeckel)	
2.	Positivkontrolle, lyophilisiert (entspricht 200 Pankrin [®] -Einheiten/ml Serum $\pm 20\%$ – grüner Schraubdeckel)	0,5 ml
3.	Biotinylierte zweite polyklonale anti-Pankreasprotein-Antikörper (Biotinkonjugat, roter Schraubdeckel)	0,12 ml
4.	Biotinkonjugat-Verdünnungspuffer	8 ml
5.	Streptavidin-POD-Konjugat (gebrauchsfertig)	8 ml
6.	Waschpuffer (10-fach konzentriert)	2 x 50 ml
7.	Substratlösung (TMB, gebrauchsfertig)	13 ml
8.	Stopplösung (0,25 mol/l H ₂ SO ₄)	13 ml
9.	12 Mikrotiterstreifen à 8 Näpfe, beschichtet mit polyklonalen anti-Pankreasprotein-Antikörpern	96 Näpfe
10.	Halterung für einzelne Streifen	1 x

Erforderliche Geräte und Materialien, die nicht im Kit enthalten sind

1. Mikrotiterplattenleser mit 450 nm Filter, optional mit einem Referenzfilter ≥ 550 nm.
2. Mikroliterpipetten mit auswechselbaren Spitzen: 5 μ l, 50 μ l, 100 μ l and 1000 μ l.
3. Röhrchen für die Verdünnung der Proben.
4. Destilliertes Wasser.
5. Saugfähiges Papier.
6. Bitte verwenden Sie nur kalibrierte Pipetten und Geräte.

Warnungen und Hinweise

1. Dieser Testkit ist nur zur *in vitro* Diagnostik bestimmt.
2. Vermeiden Sie den Kontakt mit der Stopplösung (0,25 mol/l Schwefelsäure), sie könnte Hautirritationen und Verätzungen auslösen.
3. Pipettieren Sie niemals mit dem Mund.
4. Bitte betrachten Sie alle Proben als potenziell infektiös, und bearbeiten Sie sie nur mit äußerster Sorgfalt.
5. Der Umgang und die Entsorgung sollen 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.
3. Durchmischen Sie alle Reagenzien gründlich und ohne Schaumbildung.
4. Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, 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 (z.B. 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 Waschen (jeweils letzten Waschschrift) die in den Näpfen verbliebenen Flüssigkeitstropfen durch Ausklopfen auf saugfähiger Unterlage zu entfernen.
9. Da Enzymreaktionen grundsätzlich temperaturabhängig sind, können aufgrund der jeweiligen Labortemperatur unterschiedliche Extinktionen auftreten. Die in dieser Anleitung angegebenen Werte beziehen sich auf eine Labortemperatur von 21,5 °C.
10. Die Durchführung aller Tests im Doppelansatz ist empfehlenswert, da nur auf diese Weise Pipettier- oder Handhabungsfehler erkannt werden können.

Hinweise zu Lagerung und Haltbarkeit

1. Lagern Sie die Reagenzien bei 2 – 8 °C.
2. Die Reagenzien sind haltbar bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums des Kits.
3. Der angesetzte Waschpuffer ist bei 2-8 °C für 4 Wochen haltbar.
4. Verschließen Sie die Fläschchen unmittelbar nach dem Gebrauch.
5. Bewahren Sie die Mikrotiterstreifen im Folienbeutel mit Trockensubstanz auf. Verschließen Sie nach dem Öffnen und Entnehmen der Streifen die Folie wieder fest. Gut verschlossen sind die Mikrotiterstreifen im Kühlschrank nach Anbruch mindestens vier Wochen haltbar.

Probenmaterial

Serum

Probenentnahme und Vorbereitung

Entnehmen Sie Blut durch Venenpunktion und separieren Sie das Serum nach der Gerinnung durch Zentrifugieren bei Raumtemperatur. Vermeiden Sie eine Hämolyse. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Bewahren Sie die Röhrchen verschlossen auf, da die Lösungen sonst ihre Konzentration verändern können und ein Kontaminationsrisiko besteht.

1. Bearbeiten Sie alle Proben mit äußerster Sorgfalt und betrachten Sie sie grundsätzlich als potenziell infektiös.
2. Es sind keine Interferenzen mit extrinsischen Faktoren oder anderen Substanzen bekannt.
3. Die Proben können bei verschiedenen Temperaturen für folgende Zeitspannen aufbewahrt werden:
 - Umgebungstemperatur bis zu 30 °C : bis zu drei Tagen
 - Kühlschranktemperatur (2 – 8 °C) bis zu einer Woche
 - Haushaltsgefrierschranktemperatur (-10 °C – -20 °C): bis zu einem Jahr

Vorsichtsmaßnahmen:

Untersuchungsmaterial von Patienten, wie es für Laboratoriumsuntersuchungen eingesetzt wird, ist stets als potenziell infektiös einzustufen und entsprechend zu behandeln. Proben von Risikopatienten sollten stets gekennzeichnet und unter geeigneten Sicherheitsvorkehrungen bearbeitet werden. Darüber hinaus sind die jeweils geltenden Vorschriften zur Unfallverhütung, zum Umweltschutz und zum Umgang mit Gefahrstoffen einzuhalten. Insbesondere müssen stets geeignete Schutzkleidung und Schutzhandschuhe getragen werden.

ACHTUNG! Es sind keine Testsysteme erhältlich, die garantieren können, dass die Reagenzien dieses Kits absolut frei sind von Hepatitis B-Viren, Human Immunodeficiency Virus (HIV) oder anderen Krankheitserregern.

Testdurchführung

1. Vorbereitung des Waschpuffers (10-fach konzentriert): Verdünnen Sie den konzentrierten Waschpuffer (50 ml) mit 450 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser. Die verdünnte Lösung ist für 4 Wochen bei Kühlschranktemperatur haltbar (2 – 8 °C).
Achtung: Verwenden Sie kein Leitungswasser!
2. Vorbereitung der lyophilisierten Standards: Bereiten Sie jeden lyophilisierten Standard durch Hinzugabe von 500 µl aqua bidest. auf. Verwenden Sie keinen Puffer! Die rekonstituierten Standards sind bei 2 °C – 8 °C vier Wochen haltbar.
3. Bringen Sie alle Reagenzien auf Raumtemperatur und durchmischen Sie sie vor Gebrauch sorgfältig.
4. Befestigen Sie die benötigte Anzahl beschichteter Mikrotiterstreifen in der Halterung und beschriften Sie ein Pipettierschema entsprechend. Die Mikrotiterstreifen sind nach Anbruch der Packung innerhalb von vier Wochen zu verbrauchen.
5. Verdünnen Sie die Serumproben im Verhältnis 1:101 (1 + 100) im Waschpuffer (z.B. 25 µl Serum + 2.5 ml Waschpuffer). Bitte verwenden Sie für jeden Pipettiervorgang neue Pipettierspitzen. Die Verdünnungen sind nun gebrauchsfertig.
6. Füllen Sie je 50 µl des Blanks (= Nullstandard, Waschpuffer), der Standards, der Positivkontrolle sowie der verdünnten Serumproben in die entsprechenden Näpfe.
7. Inkubieren Sie den Ansatz 60 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 25 °C).
8. Schütten Sie die Inkubationslösung ab und waschen Sie die Näpfe 3 mal mit jeweils 200 µl Waschpuffer. 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 die biotinylierte anti-Pankreasprotein-Antikörper-Lösung im Verhältnis 1:201 im Biotinkonjugat-Verdünnungspuffer (1 Teil biotinylierte Antikörper + 200 Teile Konjugatpuffer); Beispiele:
 - 5 µl anti-Pankreasprotein-Antikörper-Lösung + 1 ml Biotinkonjugat-Verdünnungspuffer
 - 10 µl anti-Pankreasprotein-Antikörper-Lösung + 2 ml Biotinkonjugat-Verdünnungspuffer
 - 15 µl anti-Pankreasprotein-Antikörper-Lösung + 3 ml Biotinkonjugat-Verdünnungspuffer
 - 25 µl anti-Pankreasprotein-Antikörper-Lösung + 5 ml Biotinkonjugat-VerdünnungspufferPipettieren Sie jeweils 50 µl der verdünnten Lösung in die Näpfe.
10. Inkubieren Sie den Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 25 °C).
11. Schütten Sie die Inkubationslösung ab und waschen Sie die Näpfe 3 mal mit jeweils 200 µl Waschpuffer.
12. Klopfen Sie die verbliebenen Flüssigkeitsreste aus den Näpfen durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier oder Tuch. Belassen Sie zum Ausklopfen die Streifen in der Halterung.
13. Pipettieren Sie jeweils 50 µl des gebrauchsfertigen Streptavidin-Peroxidase-Konjugats in die Näpfe.
14. Inkubieren Sie den Ansatz für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 25 °C).
15. Schütten Sie die Inkubationslösung ab und waschen Sie die Näpfe 3 mal mit jeweils 200 µl Waschpuffer.

16. Klopfen Sie die verbliebenen Flüssigkeitsreste aus den Nöpfen durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier oder Tuch. Belassen Sie zum Ausklopfen die Streifen in der Halterung.
17. Pipettieren Sie jeweils 100 µl Substratlösung in jeden Napf.
18. Inkubieren Sie den Ansatz für 20 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 25 °C). Achtung: Nehmen Sie bitte die Zeit ab Beginn der Substrat-Pipettierung in den ersten Napf.
19. Beenden Sie die enzymatische Reaktion durch Hinzugabe von 100 µl Stopplösung in jeden Napf. Achtung: Pipettieren Sie die Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und in den gleichen Zeitintervallen wie die Substratlösung.
20. Bestimmen Sie die Extinktion in jedem Napf mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm. 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.
21. Der Wert der Positivkontrolle sollte zwischen 160 bis 240 Pankrin[®]-Einheiten/ml Serum liegen. Wenn sich die Positivkontrolle außerhalb dieses Bereiches befindet, sollte der Test wiederholt werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte nochmals alle Inkubationsschritte und -zeiten.
 - 21 a) Wenn die Positivkontrolle, die in diesem Kit enthalten ist, wiederholt Ergebnisse >240 Pankrin[®]-Einheiten/ml Serum aufweist, muss der Kit verworfen werden.
 - 21 b) Wenn die Positivkontrolle, die in diesem Kit enthalten ist, wiederholt Ergebnisse <160 Pankrin[®]-Einheiten/ml Serum aufweist, muss der Kit verworfen werden.

Enzymatische Reaktionen sind proportional zu Inkubationszeit und -temperatur. Dies ermöglicht, bei anderweitig fixierten physikochemischen Bedingungen, eine Interpolation und damit das Erstellen einer Standardkurve.

Wenn in einem Testdurchgang die Extinktion des Standards 4 (800-Pankrin[®]-Einheiten/ml-Serum) niedriger ist als 1,0, kann die enzymatische Reaktion des letzten Inkubationsschrittes zeitlich ausgedehnt werden, bis die gewünschte Extinktion erreicht worden ist.

Wenn andererseits die Extinktion des Standards 4 (800-Pankrin[®]-Einheiten/ml-Serum) über der oberen Messgrenze des Mikrotiterplattenphotometers liegt, muss die enzymatische Reaktionszeit herabgesetzt werden.

Da bei jedem Testansatz Standards und Kontrollen mitgeführt werden, werden die absoluten Ergebnisse nicht von temperaturabhängigen Schwankungen der Extinktion beeinflusst.

Pipettierschema für den Pankrin[®]-ELISA von BIOSERV Diagnostics

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	P	3	P	11	P	19	P	27	P	35
B	S	1	P	4	P	12	P	20	P	28	P	36
C	S	2	P	5	P	13	P	21	P	29	P	37
D	S	3	P	6	P	14	P	22	P	30	P	38
E	S	4	P	7	P	15	P	23	P	31	P	39
F	P	C	P	8	P	16	P	24	P	32	P	40
G	P	1	P	9	P	17	P	25	P	33	P	41
H	P	2	P	10	P	18	P	26	P	34	P	42

In diesem Pipettierschema sind die empfohlenen Positionen für den Blank, die Standards (S1 – S4), die Positivkontrolle (PC) und die Patientenproben (P1 – P42) als Doppelbestimmungen dargestellt.

Auswertung der Testergebnisse

1. Berechnen Sie die durchschnittlichen Extinktionswerte für jeden Standardwert, sowie für die Kontrolle und für die Patientenproben.
2. Die Extinktion (y-Achse) von jedem Standardwert wird im Verhältnis zur zugehörigen Konzentration an Pankrin[®] (x-Achse) graphisch dargestellt. Die daraus resultierende Kurve wird benutzt, um die Werte der Patientenproben zu bestimmen.
3. Den Extinktionen der Patientenproben werden durch Interpolation aus der Standardkurve korrespondierende Pankrin[®]-Konzentrationen zugeordnet.

Beschränkungen des Testes

- Bei Temperaturen, die höher als 30 °C liegen, sollten die Proben gekühlt oder gefroren transportiert werden. Bei solchen Umgebungstemperaturen sollte die enzymatische Farbreaktion verkürzt werden.
- Schwer hämolytische oder lipämische Seren oder Seren von Patienten mit Leberkrankheiten sollten nicht verwendet werden. Auch durch andere Erkrankungen wie etwa poly- oder monoklonale Gammopathien, Autoimmunerkrankungen oder durch einen veränderten Immunstatus können die Ergebnisse beeinträchtigt werden.

Erwartete Werte

- Normalbereich: <160 Pankrin[®]-Einheiten/ml Serum
- Fraglicher Bereich: 160 bis 190 Pankrin[®]-Einheiten/ml Serum
- Pathologischer Bereich:>190 Pankrin[®]-Einheiten /ml Serum

Diese Werte wurden an gesunden Probanden aus einem Kollektiv von 558 Blutspendern und 177 Patienten mit akuter Pankreatitis (klinisch abgeklärt) ermittelt. Die diagnostische Spezifität lag bei 96%, die diagnostische Sensitivität bei 98%.

Der cut-off des Testes liegt bei 175 Pankrin[®]-Einheiten/ml Serum. Deshalb wird bei Ergebnissen im fraglichen Bereich eine Wiederholung des Testes empfohlen. Bei nochmaligem Ergebnis im fraglichen Bereich sollten andere diagnostische Untersuchungen folgen.

Leistungsdaten des Pankrin[®]-Serum-ELISA von BIOSERV Diagnostics

1. Diagnostische Spezifität: 96%

Proben von 558 gesunden Probanden wurden untersucht. Diese Personen waren entweder gesunde Blutspender oder Patienten, bei denen bereits im Vorfeld eine pankreatische Erkrankung mit anderen diagnostischen Testmethoden ausgeschlossen worden war.

2. Diagnostische Sensitivität für akute Pankreatitis: 98%

Proben von 177 Patienten, die unter akuter Pankreatitis litten, wurden untersucht.

3. Intraserielle Variationskoeffizienten: 7,48% (5,07 – 9,10%)

Zur Bestimmung der intraserialen Variationskoeffizienten wurden sechs Kits von sechs verschiedenen Chargen, die an unterschiedlichen Tagen produziert wurden, verwendet. Eine Patientenprobe (Extinktion über 1,0) wurde 96 mal pro Testdurchlauf verwendet.

4. Interserielle Variationskoeffizienten: 6,51% (5,40 – 8,70%)

Zur Bestimmung der interserialen Variationskoeffizienten wurde jeweils ein Streifen von 12 Kits, die von sechs verschiedenen, an unterschiedlichen Tagen produzierten Chargen stammten, verwendet. Eine Patientenprobe (Extinktion über 1,0) wurde 72 mal pro Testdurchlauf verwendet.

English:

Intended Use

With the Pankrin™ ELISA from BIOSERV Diagnostics an acute pancreatitis or an acute attack of chronic pancreatitis is diagnosed in patients with abdominal pain.

Clinical Relevance

An acute pancreatitis, the acute inflammation of the pancreas, is mostly caused by the dystopic protease activation in the azinus cells, the obstruction of the luminal secretion and the formation of intracellular vacuoles (Schneider 1999). The yearly incidence rate is 50 to 100 cases per 100.000 persons. The clinical picture is determined by pronounced abdominal pain and general symptoms like nausea, vomiting, and circulatory collapse (Selberg *et al.* 1995). The mild form of an acute pancreatitis, the endematous pancreatitis (ca. 80% of all cases of an acute pancreatitis) progresses without complications and under adequate therapy patients normally recover within 72 hours. The severe form of an acute pancreatitis, the hemorrhagic narcotising pancreatitis is characterized by necrosis and by a protracted course with frequent failure of organs or organ systems (Asanuma *et al.* 1999, Singer *et al.* 1988). Morphologically a thickening and irregular delimitation of the pancreas can be observed as well as an accumulation of liquid in the peritoneal space. The main cause of an acute pancreatitis are an increased alcohol consumption (Blank *et al.* 1999, Lankisch 2000) and trapped gallstones which possibly get into the pancreatic duct via a reflux (Niederau *et al.* 1997, UHL *et al.* 1999, Sharma *et al.* 1999). Other pathogenetic factors are more rare. In a considerable percentage of the patients suffering from acute pancreatitis no risk factor can be detected. Cholelithiasis (gallstone disease) peaks between 40 and 60 years, the age maximum for alcohol abusus lies between 20 and 40 years.

Fields of Application

In the functional diagnostics of the exocrine pancreas the BIOSERV Pankrin™-ELISA is a sensitive and clinically easily practicable tool ideally complementing the sonographically established initial diagnosis.

Principles of the Assay Method

The proteins detected by the BIOSERV Pankrin™-ELISA are absolutely pancreas-specific. In addition to pancreatic elastase also other pancreatic enzymes are detected to increase the diagnostic sensitivity and specificity of the test. In marked contrast to clinical chemistry tests measuring only the enzymatic activity with the BIOSERV Pankrin™-ELISA the pancreatic proteins are determined immunologically, their immunological properties depending on the molecular structure. Therefore not only an absolute pancreas-specificity can be guaranteed but it is also possible to measure already inactivated proteins in the serum. The pancreatic proteins getting into the serum during an acute attack can thus be detected for a much longer period of time than with conventional clinical chemistry test systems.

The BIOSERV Pankrin™-ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay) is a solid phase enzyme immunoassay based on the double sandwich technique. The wells are coated with polyclonal antibodies specifically recognizing pancreatic proteins. Pancreatic proteins from the serum samples or standards are immobilized by these antibodies. Then a secondary polyclonal antibody solution also specifically reacting with pancreatic proteins is added and binds to the pancreatic proteins immobilized on the first antibody layer in the well. In the following incubation step the biotin-residue of the bound biotin-antibody-complex reacts with an added peroxidase-streptavidin-complex which then enzymatically oxidizes the added substrate TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine). This enzymatic activity is stopped after a defined time period by adding 0.25 mol/l H₂SO₄ and the amount of oxidized TMB is determined photometrically at 450 nm. The use of a reference measurement with a wavelength ≥550 nm is recommended.

Reagents

(sufficient for 96 determinations)

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Pankrin™ reference standard set (lyophilised) 2 x - per vial | 0.5 ml |
| – Standard 1 (100 Pankrin™ units/ml serum – colourless screw cap) | |
| – Standard 2 (200 Pankrin™ units/ml serum – white screw cap) | |
| – Standard 3 (400 Pankrin™ units/ml serum – yellow screw cap) | |
| – Standard 4 (800 Pankrin™ units/ml serum – blue screw cap) | |
| 2. Positive control, lyophilised (corresponding to 200 Pankrin™ units/ml serum ±20%, – green screw cap) | 0.5 ml |
| 3. Biotinylated secondary polyclonal anti-pancreas enzyme antibodies (red screw cap) | 0.12 ml |
| 4. Biotin conjugate dilution buffer | 8 ml |
| 5. Streptavidin horseradish peroxidase conjugate (ready for use) | 8 ml |
| 6. Washing solution (10x concentrated) | 2 x 50 ml |
| 7. Substrate solution (solution of TMB, ready for use) | 13 ml |
| 8. Stop solution (0.25 mol/l H ₂ SO ₄) | 13 ml |
| 9. Microtiter strips coated with polyclonal anti-pancreas enzyme antibodies | 96 wells |
| 10. Holder for single strips | 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. Distilled or deionised water.
5. Absorbent paper.
6. Please use only calibrated pipettes and instruments.

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 regard all samples as potentially infectious and handle them with utmost care.
5. 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 must be brought to room temperature 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. Since the kinetics of the enzymatic reaction depends on the surrounding temperature different extinctions correlating with the respective room temperature may be observed. The optimum laboratory room temperature is 21,5 °C (71 °F).
10. It is recommended to effect all tests in double determination in order to minimize the consequences of pipetting or handling errors.

Storage Instructions and Shelf Life Information

1. Store the reagents at 2 – 8 °C (36 °F – 46 °F).
2. The reagents remain stable until the expiration date of the kit.
3. The diluted washing solution is stable for 4 weeks at refrigerator temperatures (2 °C – 8 °C / 36 °F – 46 °F).
4. Put caps back on the vials immediately after use.
5. 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

Serum

Specimen Collection and Preparation

Collect blood by venipuncture, allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature; avoid haemolysis. Avoid repeated freezing and thawing. Store tubes closed as they may be a danger of contamination or alteration of concentration.

1. Handle all samples with utmost care since they may be infectious.
2. There are no known interferences with extrinsic factors or other substances.
3. Samples may be stored at different temperatures for the following time-spans:
 - Environmental temperature up to 30 °C (86 °F): up to three days
 - Refrigerator temperature (2 – 8 °C / 36 °F – 46 °F): up to one week
 - Household freezer temperature (-10 °C – -20 °C / 14 °F – -4 °F): up to one year

ATTENTION! There are no test methods available which may guarantee that Hepatitis B virus, Human Immunodeficiency Virus (HIV/HTLV-III/LAV), or other infectious agents are absent from the reagents in this kit. Therefore, all human blood products, including patient samples, should be considered potentially infectious.

Assay Procedure

1. Preparation of the washing solution(10x): Dilute the concentrated washing solution (50ml) with 450 ml distilled or deionised water. **Attention:** Do not use unpurified tap water!
2. Preparation of the lyophilised standards: Reconstitute each lyophilised standard with 500 µl aqua bidest. Do not use buffer! The reconstituted standards can be stored at 2 °C – 8 °C (36 °F – 46 °F) for four weeks.
3. Warm all reagents to room temperature and mix thoroughly before use.
4. Fix the required number of coated wells or strips in the strip holder. Fill in a paper form accordingly. Use up the microtiter strips within four weeks.
5. Dilute the serum samples 1:101 (1 + 100) with washing solution (e.g. 25 µl serum + 2.5 ml washing solution). The reconstituted standards are ready for use.
6. Pipette 50 µl each of the zero standard (blank, washing solution), the standards, positive control and the diluted serum samples with new disposable tips into the respective wells.
7. Incubate for 60 minutes at room temperature (18 – 25 °C).
8. Briskly shake out the contents of the wells and then rinse the wells 3 times with 200 µl diluted (see step 1) washing solution. Knock the residual water out of the wells by hitting them (in the holder) on absorbent paper or cloth.
9. Dilute the biotinylated anti-pancreatic protein antibody solution 1:201 with biotin conjugate buffer: (1 part biotinylated antibody + 200 parts conjugate buffer). Examples:
 - 5 µl anti-pancreatic protein antibody solution + 1 ml biotin conjugate buffer
 - 10 µl anti-pancreatic protein antibody solution + 2 ml biotin conjugate buffer
 - 15 µl anti-pancreatic protein antibody solution + 3 ml biotin conjugate buffer
 - 25 µl anti-pancreatic protein antibody solution + 5 ml biotin conjugate bufferDispense 50 µl into each well.
10. Incubate for 30 minutes at room temperature (18 – 25 °C).
11. Briskly shake out the contents of the wells and then rinse the wells 3 times with 200 µl diluted (see step 1) washing solution.
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 room temperature (18 – 25 °C).
15. Briskly shake out the contents of the wells and then rinse the wells 3 times with 200 µl diluted (see step 1) washing solution.
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 min at room temperature (18 – 25 °C) Attention: please take the time from start of pipetting the substrate.
19. Stop the enzymatic reaction by adding 100 µl stop solution to each well, in the same sequence and time interval as dispensing the substrate.
20. Measure the extinction of the samples at 450 nm. It is recommended to carry out the measurement of the extinction within 10 minutes after stopping the reaction.
21. The value of the positive control should be between 160 to 240 Pankrin units/ml serum. If the positive control should be out of this range, please repeat the test. In this case please check once again all incubation steps and times.
 - 21 a) If the positive control included to this kit repeats giving results higher than 240 Pankrin units/ml serum, the kit must be discarded.
 - 21b) If the positive control included to this kit repeats giving results lower than 160 Pankrin units /ml serum, the kit must be discarded.

As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature. This makes interpolation possible for fixed physico-chemical conditions.

If in a test run the absorbance of the 800 U/ml-standard is lower than 1.0 the incubation time of the final enzymatic reaction may be extended.

If, on the other hand, the absorbance of the 800 U/ml-standard is above the upper performance limit of the microplate spectrophotometer used the enzymatic reaction time may be reduced.

Since calibrators are assayed in each run, absorbance fluctuations do not affect the absolute results.

Pipetting Scheme for the Pankrin™ Serum ELISA from BIOSERV Diagnostics

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	P	3	P	11	P	19	P	27	P	35
B	S	1	P	4	P	12	P	20	P	28	P	36
C	S	2	P	5	P	13	P	21	P	29	P	37
D	S	3	P	6	P	14	P	22	P	30	P	38
E	S	4	P	7	P	15	P	23	P	31	P	39
F	P	C	P	8	P	16	P	24	P	32	P	40
G	P	1	P	9	P	17	P	25	P	33	P	41
H	P	2	P	10	P	18	P	26	P	34	P	42

In this pipetting scheme the recommended positions for the blank, standards (S1 – S4), positive control (PC) and for the patient samples (P1 – P42) are shown as double determinations.

Calculation of the Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of reference standards, controls and patient samples
2. The optical density of each standard value is plotted as y value (y-axis), the corresponding Pankrin™ value is drawn in as the x-value (x-axis). The resulting calibration curve is used to determine the values of the patient samples. The OD values of the serum samples are correlated with the corresponding Pankrin™ concentration values by interpolation.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration of Pankrin™ in U/ml from the standard curve.

Limitations of the Assay

- At temperatures higher than 30 °C (86 °F) the samples should be transported cooled or refrigerated. The time to stop the (enzymatic colour) reaction may have to be adjusted (shortened).
- Severely haemolytic or lipaemic sera or sera from patients with liver diseases should not be used. Results may be adversely affected by certain pathologic conditions, such as poly- and monoclonal gammopathies, autoimmune diseases or by an altered immune status.

Expected Values

- Normal: < 160 Pankrin™–Units/ml serum
- Near Cut-Off: 160 – 190 Pankrin™–Units/ml serum
- Pathological: > 190 Pankrin™–Units /ml serum

These ranges were determined in a normal collective of 558 blood donors and 177 clinically clarified patients with a specificity of 96% at a sensitivity of 98%.
The cut-off of the Pankrin ELISA is at 175 Pankrin™–Units/ml serum. In case of a value in the range near the cut-off (160 to 190 Pankrin™–Units/ml serum) we recommend a follow-up determination using a new serum sample taken within 24 hours. Other additional diagnostic examinations should follow, then.

Assay Performance Characteristics

1. Diagnostic Specificity: 96%

Samples from 558 healthy test persons were investigated. The test persons were either healthy blood donors or patients for whom pancreatic ailments had been excluded by other diagnostic methods.

2. Diagnostic Sensitivity for Chronic Pancreatitis: 98%

Samples from 177 patients suffering from acute pancreatitis were investigated.

3. Intraassay variation coefficient: 7.48% (5.07 – 9.10%)

For the determination of the intraassay variation coefficient 6 kits from 6 different batches (produced on different days) were used.

One patient sample (optical density about 1.0) was applied 96 times per testing procedure.

4. Interassay variation coefficient: 6.51% (5.40 – 8.70%)

In order to determine the coefficient of interassay variation one strip each of 12 kits stemming from 6 different batches (produced on different days) were used.

One patient sample (optical density about 1.0) was applied 72 times per testing procedure.

Bibliography

Especially for Pankrin®-Serum-ELISA from BIOSERV Diagnostics

Lankisch PG, Weber-Dany B, Doobe C, Finger T, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Keim V (2006): Pankrin: A new parameter for the diagnosis of acute pancreatitis in cases of late clinical presentation. *Pancreas* Volume 32/3, pages 330-331.

Keim, V, Teich, N, Bodeker H, Mossner, J (2003): Evaluation of Pankrin®, a new serum test for diagnosis of acute pancreatitis. *Clinica Chimica Acta* 332 , pages 45 – 50.

Generally for acute Pancreatitis

Asanuma Y, Fukuya T, Tanaka J-I, Sato T, Shibata S, Koyama K (1999): The Application of Immobilized Polymyxin B Fiber in the Treatment of Septic Shock Associated with Severe Acute Pancreatitis: Report of Two Cases. *Jpn. J. Surg* 29, pages 1177-1182.

Bank S, Indaram A (1999): Causes of acute and recurrent pancreatitis. *Gastroenterology Clinics of North America* 28, pages 571-589.

Lankisch PG, Büchler MW (2000): Akute Pankreatitis. *Deutsches Ärzteblatt* 31/32, Seiten 2106-2112.

Niederau C, Luthen R (1997): Current aspects in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Schweiz. Rundschau Med. Prax.* 86, pages 385-391.

Schneider DT, Nürnberger W, Stannigel H, Bönig H, Göbel U (1999): Adjuvant treatment of severe acute pancreatitis with C1 esterase inhibitor concentrate after haematopoietic stem cell transplantation. *Gut* 45, pages 733-736.

Selberg O, Henkel E (1995): Klinisch-chemische Diagnostik der akuten Pankreatitis. *Klinische Chemie* 10 (1995) Seiten 88-92.

Sharma VK, Howden CW (1999): Metaanalysis of randomised controlled trials of endoscopic retrograde cholangiography and endoscopic sphincterotomy for the treatment of acute biliary pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 94, pages 3211-3214.

Singer MV, Gyr KE, Sarle H (1988): Revised classification of pancreatitis. Report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 1984. *Gastroenterology* 89 (1988); pages 683-690.

Uhl W, Müller, CA, Krähenbühl L, Schmid SW (1999) Schölzel, St., Büchler, W.: Acute gallstone pancreatitis. *Surgical Endoscopy* 13, pages 1070-1076.

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
Tel.: 0381 3758 2090
Fax: 0381 3758 2099
E-mail: info@bioserv-diagnostics.com
Web: www.bioserv-diagnostics.com

