

Testansatz

1 Kugel
10 µl Standards, Kontrollen und Proben laut Pipettierschema pipettieren
250 µl Tracer in alle Plastikröhrchen (12*75) pipettieren
den Testansatz mindestens <b>10 h</b> im Kühlschrank inkubieren
Waschen mit 2 * 4 ml aqua dest. (z.B. mit dem Immunowasher von Berthold)
den Überstand dekantieren oder absaugen
die gebundene Aktivität im Luminometer 2 Sekunden zählen.

Standards

Bei der Auswertung ist darauf zu achten, daß die folgenden Konzentrationen Verwendung finden:

Standard	0	1	2	3	4
<b>Konzentration [µg/g]:</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>400</b>	<b>1600</b>

Die Konzentrationsangaben der Standards sind Nominalwerte und beziehen sich auf die Verdünnung der Proben (1/10). Damit kann die Konzentration pro Gramm Stuhl ermittelt werden. Bei der Verwendung anderer Verdünnungen muß die reale Standardkonzentration angenommen werden. Die geschieht in dem die nominale Konzentration (Tabelle) durch 10 geteilt wird.

Auswertung

- Auswertung:** Nach dem Zählen der gebundenen Aktivität werden die Ergebnisse der Probenkonzentrationen
- automatisch berechnet (Auswerteverfahren: Spline-Approximation, Four-Parameter -Logistik, Logit-log, o.ä.) und ausgedruckt oder
  - manuell ausgewertet: Die Mittelwerte der Absorption der Doppelwerte berechnen. Konzentration der Standards (Abszisse) gegen die Lichtemission (Ordinate) auftragen. Für die Patientenproben werden die Werte an der Standardkurve abgelesen.
  - Im Falle von nicht optimalen Ergebnissen wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

Validierung

Die mitbestimmten Kontrollen sollten im folgenden Vertrauensbereich liegen:

<b>Kontrolle 1:</b>	→	<b>75 - 125 µg/g</b>
<b>Kontrolle 2:</b>	→	<b>300 - 500 µg/g</b>

**Bestimmung von  $\alpha_1$ -Antitrypsin im Stuhl mittels eines Immunochemoluminometrischen Nachweisverfahrens (LIA).**

Nur zur "in vitro" Diagnostik



Einführung

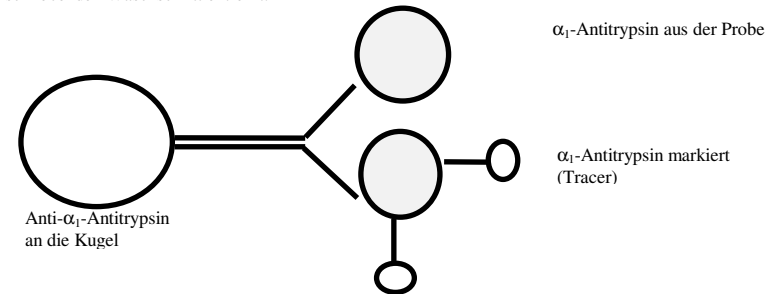
$\alpha_1$ -Antitrypsin ist ein ca. 50 kDa großes Akutphaseprotein, das in der Leber synthetisiert wird. Es dient der Inhibition von Serinproteasen. Durch diese antiproteolytische Eigenschaften unterliegt  $\alpha_1$ -Antitrypsin nur einer geringen intestinalen Degradation und wird nahezu unverändert im Stuhl ausgeschieden. Entzündliche Darmerkrankungen wie z.B. Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa führen zu einer Destruktion des Darmepithels. Das Auftreten von  $\alpha_1$ -Antitrypsin in Fäzes deutet auf eine mit Blutungen in das Darmlumen verbundene Entzündungsreaktion hin.

Vorteile

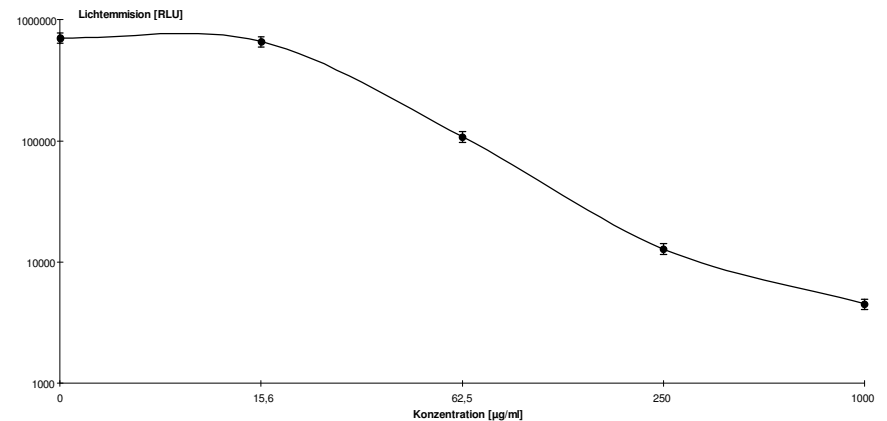
- Diese Methode stellt keine zusätzliche Belastung für den Patienten dar.

Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode

Proben, Kontrollen, Standards und Tracer (markiertes  $\alpha_1$ -Antitrypsin) werden zusammen mit dem Antikörper (Anti- $\alpha_1$ -Antitrypsin), der an die Polystyrolkugel gebunden ist inkubiert. Dabei konkurrieren die markierten Antigene (Tracer) mit den Antigenen aus der Probe um die Bindungsstellen des Antikörpers an der Kugel. Nicht gebundene Proteine werden mit dem anschließenden Waschschrift entfernt.



Mustereichkurve



**Assay Parameter**

1. Antikörper an der Kugel:	Rabbit-Anti-human- $\alpha_1$ -Antitrypsin
Tracer	$\alpha_1$ -Antitrypsin mit Akridiniumester markiert
Probenmaterial:	Stuhl 1/10 in PPGNE
Probenvolumen	10 $\mu$ l
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	14 $\mu$ g/g
Recovery :	> 97%
Linearität (r= Korrelationskoeffizient):	$r^2 > 0,997$
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	7,0 $\mu$ g/g
Intraassayvarianz:	< 8,99 %
Interassayvarianz:	< 10,24 %
Meßbereich:	25 - 1600 $\mu$ g/g
<b>Normbereich</b>	<b>&lt; 100 <math>\mu</math>g/g</b>

**Zusammensetzung der Testkits**

Menge	Artikel
gebrauchsfertig 100 Stk	<b>100 Kugeln</b> (die mit polyklonalen Antikörpern beschichtet sind. In einem proteinhaltigen Lagerungspuffer)
gebrauchsfertig 5 * 200 $\mu$ l	<b>5 Standards</b> (in wäßriger Lösung mit Natriumazid).
Gebrauchsfertig 2 * 200 $\mu$ l	<b>Kontrollen Level 1 und 2</b> (in wäßriger Lösung mit Natriumazid.)
gebrauchsfertig 26 ml	<b>Tracer</b> (Akridiniumester markierter Antigen in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Natriumazid)
in 470 ml heißem, entionisiertem Wasser lösen.	<b>Konzentrat für den Probenverdünnungspuffer</b> (Phosphatpuffer mit Natriumazid und Proteinzusatz pH 7,4)

**Aufbewahrung der Testkomponenten**

Der gesamte Kit wird in tiefgefrorenem Zustand gelagert. Assaypuffer, Kugeln und Probenverdünnungspuffer können auch im Kühlschrank gelagert werden.

**Probenmaterial und Probenhaltbarkeit**

Die Stuhlproben werden vor der Bestimmung extrahiert und verdünnt. Die Haltbarkeit der Proben beträgt 5 Tage bei 4 °C oder 12 Monate in tiefgefrorenem Zustand.

**Verwendete Geräte und Materialien**

- 100 Einwegröhrchen (12\*75 von Saarstedt)
- Probenständer und Ständer für Saarsredt-Röhrchen.
- Meßzylinder (500 ml)
- 10  $\mu$ l Pipette
- Multipipette mit 5 ml und 50 ml Aufsatz
- Vortex-Mixer
- Luminometer
- Automatisches Waschgerät oder Handwaschgerät oder Wasserstrahlpumpe zum Absaugen der Überstände

**Methodendurchführung**

Vorbereitungen für die Methodendurchführung	
<b>1</b>	<b>Verdünnungsmedium:</b> Das Röhrchen mit dem Probenverdünnungspufferkonzentrat wird in einem Wasserbad so lange erhitzt bis die Lösung klar ist. Danach wird der gesamte Inhalt in 470 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt.
<b>2</b>	<b>Kit-Komponenten und Probenmaterial auftauen.</b> Die schonendste Möglichkeit besteht darin, den Kit, bzw. die Proben einen Tag vor Gebrauch vom Gefrierfach in den Kühlschrank zu stellen.
<b>3</b>	<b>Vorbereitung der Stuhlproben:</b> Stuhlproben werden eingewogen und 1 / 10 (Gewicht zu Volumen) mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt (Zu 1,0 g Stuhl werden 9 ml Puffer zugegeben). Die Proben werden so lange gemischt bis die Lösung homogen ist. Die Röhrchen werden 15 min bei 3000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wird im Assay direkt eingesetzt
<b>4</b>	<b>Kugeln vor Gebrauch mit entionisiertem Wasser waschen.</b>
<b>5</b>	Die für den Testansatz benötigten Stuhltracks eindeutig beschriften. <b>Verwendete Gefäße:</b> Der Testansatz erfolgt in Plastikröhrchen (12*75) in speziellen Ständern

**Pipettierschema (für manuelles Pipettieren oder Pipettieren mit einem Probenverteilsystem)**

Stuhltrack-röhrchen-Nr.		Volumen
1, 2	Standard 0	10 $\mu$ l
3, 4	Standard 1	10 $\mu$ l
5, 6	Standard 2	10 $\mu$ l
7, 8	Standard 3	10 $\mu$ l
9, 10	Standard 4	10 $\mu$ l
11, 12	Kontrolle I	10 $\mu$ l
13, 14	Kontrolle II	10 $\mu$ l
15, 16	Proben	10 $\mu$ l
alle 25 Proben	Kontrolle I, II	10 $\mu$ l
am Ende der Serie	Kontrolle I, II	10 $\mu$ l

**Allgemeine Hinweise**

- Dieser Testkit und alle darin enthaltenen Komponenten dürfen nur zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt zur in vitro-Diagnostik verwendet werden.
- Alle mitgelieferten Testkomponenten enthalten Natriumazid. Bitte alle Sicherheitsmaßnahmen ergreifen. Die Berührung mit der Haut sollte vermieden werden.
- Alle Testkomponenten sollten immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Es sollte unter keinen Umständen mit dem Mund pipettiert werden.
- Während der Testdurchführung Einmalhandschuhe tragen.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Kit-Chargen dürfen nicht verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinischen Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Der Hersteller übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinischen Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller zu übersenden.
- Der Testkit ist nach Ablauf des auf die Packung aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.