

Zusammensetzung der Testkits

Menge	Artikel
gebrauchsfertig 12 x 8 Vertiefungen	Mikrotiterplatte (Mit polyklonalen Antikörpern beschichtet)
gebrauchsfertig 1 x 1 ml	Kontrollstammlösung (in wässriger Lösung mit Thimerosal.)
gebrauchsfertig 1 x 2 ml	Standardstammlösung (in wässriger Lösung mit Thimerosal.)
gebrauchsfertig 2 x 0,5 ml	Kontrollen Level 1 und 2 (in wässriger Lösung mit Thimerosal.)
gebrauchsfertig 150 µl	Konjugat- Konzentrat (HRP markierter Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Thimerosal)
gebrauchsfertig 15 ml	Konjugat Puffer (Phosphatpuffer mit Thimerosal und Proteinzusatz)
gebrauchsfertig 12 ml	Substrat (TMB)
gebrauchsfertig 12 ml	Stopplösung (0,5 M Schwefelsäure)
in 500 ml entionisiertem Wasser lösen.	Konzentrat für den Waschpuffer (Phosphatpuffer mit Thimerosal und Detergenz pH 7,4)
in 500 ml entionisiertem Wasser lösen.	Konzentrat für den Probenverdünnungspuffer (Phosphatpuffer mit Natriumazid und Proteinzusatz pH 7,4)

Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H2SO4). H2SO4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H2SO4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

Technische Merkmale

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien sollte vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden..

Allgemeine Hinweise

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Maier analytik GmbH übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Firma Maier Analytik GmbH, zurück zu senden.

Bestimmung von Lysozym im Stuhl mittels eines ELISAs.

Nur zur "in vitro Diagnostik"



Einführung

α1-Lysozym ist ein ca. 15 kDa großes Protein, der granulierten Zellen der myeloischen Reihe. Es kommt in hohen Konzentrationen in der Niere vor. Das Vorkommen von Lysozym in Fäzes ist durch intestinale Granulozyten zu erklären. In allen Zellen des entzündlichen Infiltrats bei Morbus Crohn kann Lysozym nachgewiesen werden. Auch eine aktive Sezernierung von Lysozym in das Darmlumen ist durch mononukleäre Zellen bekannt.

Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode

Proben, Kontrollen, Standards werden in eine mit Antikörper gegen Lysozym beschichtete Platte gegeben. Nach einem Inkubationsschritt und einem Waschschrift wird ein zweiter Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase markiert ist (Konjugat) hinzugegeben. Nach einem Inkubations- und Waschschrift wird Substrat hinzugegeben (TMB), das von der HRP umgesetzt wird. Nach einer Inkubation wird die Reaktion mit 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Die Farbreaktion wird bei 450 nm gemessen.

Indikation

Diagnose und Verlauf bei Morbus Crohn

1. Antikörper an der Platte:	Rabbit-Anti-human-Lysozym
Konjugat	Anti-Lysozym mit HRP markiert
Probenmaterial:	Stuhl 1/500 in Probenverdünnungspuffer
Probenvolumen	100 µl
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	0,067 ng/ml
Recovery :	92-110 %
Linearität (r= Korrelationskoeffizient):	r = 0,98
Intraassayvarianz:	< 7 %
Interassayvarianz:	< 11 %
Messbereich:	250 - 2000 ng/ml
Normbereich	< 650 ng/g

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

Verwendete Geräte und Materialien

- | | |
|--|---|
| Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.) | Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen |
| Messzylinder (500 ml) | 10µl und 100 µl Präzisionspipette |
| Multipette mit Aufsatz | Vortex-Mixer |
| Zentrifuge 3000 x g | Folie zum Abkleben der Platte |
| Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm. | |

Vorbereitungen für die Methodendurchführung						
1	Alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18-26 °C)bringen.					
2	Probenverdünnungspuffer: Das Röhrchen mit dem Probenverdünnungspufferkonzentrat wird in einem Wasserbad so lange erhitzt bis die Lösung klar ist. Danach wird der gesamte Inhalt in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt.					
3	Waschpuffer: Der gesamte Inhalt des Waschpufferkonzentrat wird in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt					
4	Vorbereitung der Stuhlproben: Stuhlproben werden eingewogen und 1/50 (Gewicht zu Volumen) mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt (Zu 0,1 g Stuhl werden 5 ml Puffer zugegeben).Die Proben werden so lange gemischt bis die Lösung homogen ist. Die Röhrchen werden 15 min bei 3000 g zentrifugiert.					
5	Verdünnen der Standards: Die Standardstammlösung hat eine Konzentration von 2000 ng/ml. Es werden nun 3 serielle Verdünnungen mit dem Probenverdünnungspuffer (PVP) hergestellt. 1. 450 µl Standardstammlösung + 450 µl PVP ergibt Standard 1000 ng/ml 2. 450 µl Standard 1000 + 450 µl PVP ergibt Standard 500 ng/ml 3. 450 µl Standard 500 + 450 µl PVP ergibt Standard 250 ng/ml					
5	Verdünnen der Kontrollen: Die Kontrollstammlösung hat eine Konzentration von 2000 ng/ml. Es werden nun 2 serielle Verdünnungen mit dem Probenverdünnungspuffer (PVP) hergestellt. 1. 450 µl Kontrollstammlösung + 450 µl PVP ergibt Kontrolle 1000 ng/ml 2. 450 µl Standard 1000 + 450 µl PVP ergibt Kontrolle 500 ng/ml					
6	Verdünnen der extrahierten Proben (1/10; Endverdünnung: 1/500) : 50 µl des klaren Überstandes wird in 450 µl des Probenverdünnungspuffers gelöst.					
7	Verdünnen des Konjugats (1/100)					
	Anzahl der Streifen	Konjugat	Konjugatpuffer	Anzahl der Streifen	Konjugat	Konjugat-puffer
	1	10 µl	1 ml	7	70 µl	7 ml
	2	20 µl	2 ml	8	80 µl	8 ml
	3	30 µl	3 ml	9	90 µl	9 ml
	4	40 µl	4 ml	10	100 µl	10 ml
	5	50 µl	5 ml	11	110 µl	11 ml
	6	60 µl	6 ml	12	120 µl	12 ml

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.
- Reagenzien mit einem Volumen kleiner als 200 µl sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** und **Probenpufferkonzentrat** müssen vor Gebrauch in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (35 ml bzw. 30 ml Konzentrat + 500 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentrate kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Die Pufferkonzentrate können bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnten Pufferlösungen sind bei 2-8 °C einen Monat in geschlossenen Gefäßen haltbar.
- Die **Standards und Kontrollen** sind bei <-15 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil und können bis zu 2-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.
- Die **Mikrotiterplatte** ist in verschlossenem Plastikbeutel 30 Tage bei Raumtemperatur und bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- **Alle anderen Testreagenzien** sind bei 2-8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- **Nach dem Öffnen des Kits beträgt die Haltbarkeit 30 Tage.**

Testansatz: alle Reaktionen sollten im Dunkeln stattfinden

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen.

100 µl Standards, Kontrollen und Proben laut Pipettierschema in die Vertiefungen pipetieren.

den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren

Waschen mit 3 * 250 µl Waschpuffer

100 µl verdünntes Konjugat (rote Deckel) in alle Vertiefungen

den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren

Waschen mit 3 * 250 µl Waschpuffer

100 µl Substrat (blauer Deckel) in alle Vertiefungen

den Testansatz **30 min** bei Raumtemperatur inkubieren

100 µl Stopplösung (gelber Deckel) in alle Vertiefungen

Die Färbung bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge 620nm messen.

Standards

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

Standard	1	2	3	4
Konzentration [ng/g]:	250	500	1000	2000

Die Konzentrationsangaben der Standards sind Nominalwerte und beziehen sich auf die Verdünnung der Proben (1/500). Damit kann die Konzentration pro Gramm Stuhl ermittelt werden. Bei der Verwendung anderer Verdünnungen muß die reale Standardkonzentration angenommen werden.

Konzentration [ng/ml]:	0,5	1,0	2,0	4,0
-------------------------------	------------	------------	------------	------------

Auswertung:

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die Punkt zu Punkt Auswertung :

Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

4-Parameter-Funktion Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

Gewichtete Spline-Funktion Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

Validierung Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Kontrolle 1:	→	350 – 650 ng/g
---------------------	---	-----------------------

Kontrolle 2:	→	700 – 1300 ng/g
---------------------	---	------------------------

Probenmaterial und Probenhaltbarkeit

Die Stuhlproben werden vor der Bestimmung extrahiert und verdünnt. Die Haltbarkeit der verdünnten Proben (1/50) beträgt 2 Tage bei 2-8 °C oder 12 Monate in tiefgefrorenem Zustand. Die Stuhlsuspension (1/500) ist nicht haltbar. Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen bzw. zu verdünnen.