

Testansatz

1 Kugel
50 µl Standards, Kontrollen und Proben laut Pipettierschema pipettieren
200 µl Tracer in alle Plastikröhrchen (12*75) pipettieren
den Testansatz mindestens 10 h 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
Konzentration [µg/g]:	0	0,25	1,0	4,0	16,0

Die Konzentrationsangabe 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.

Die Standards sind gegen Standardmaterial von Calbiochem kalibriert.

Aufbewahrung der Testkomponenten

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

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:

Kontrolle 1:	→	0,75 - 1,25 µg/g
Kontrolle 2:	→	3,0 - 5,0 µg/g

Bestimmung von Lysozym im Stuhl mittels eines Immunochemoluminometrischen Nachweisverfahrens (LIA).

Nur zur "in vitro Diagnostik"

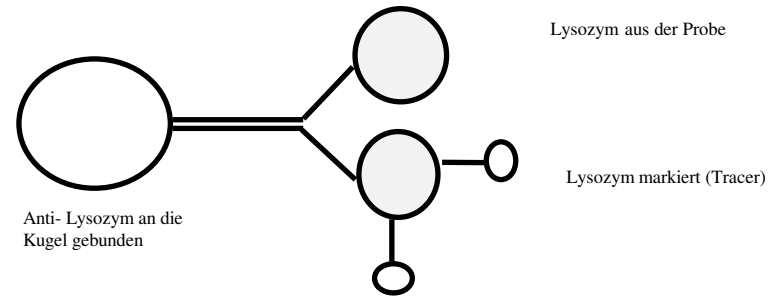


Einführung

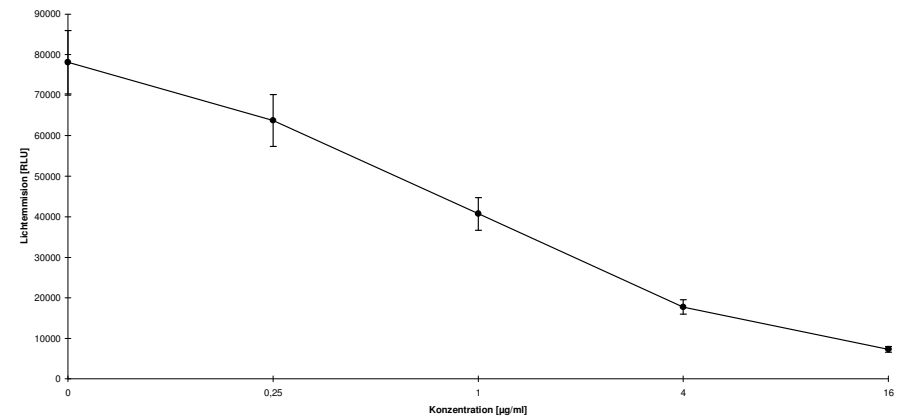
α1-Lysozym ist ein ca. 15 kDa großes Protein, der granulierten Zellen der myeloischen Reihe. Es kommt in hohen Konzentrationen in der Niere vor. Das Vorkommen von Lysozym in Fäzes ist durch intestinale Granulozyten zu erklären. In allen Zellen des entzündlichen Infiltrats bei Morbus Chron kann Lysozym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

Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode

Proben, Kontrollen, Standards und Tracer (markiertes Lysozym) werden zusammen mit dem Antikörper (Anti- Lysozym), 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-Lysozym
Tracer	Lysozym mit Akridiniumester markiert
Probenmaterial:	Stuhl 1/10 in PPGNE
Probenvolumen	50 µl
Analytische Sensitivität (untere Nachweisgrenze)	0,20 µg/g
Analytische Spezifität	Spezifisch für humanes Lysozym
Intraassayvarianz	< 10,1 % (n=24)
Interassayvarianz	< 13,1 % (n=16)
Linearität	88 - 108 % (0,16-100,7 mg/l)
Diagnostische Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	97,5 %
Diagnostische Spezifität (Morbus Chron)	69,8 %
Diagnostische Spezifität (Collitis Ulcerosa)	56,6 %
Meßbereich:	0,25 - 16 µg/g
Normbereich	< 1,0 µg/g

Zusammensetzung der Testkits

Menge	Artikel
gebrauchsfertig 100 Stk	100 Kugeln (die mit polyklonalen Antikörpern beschichtet sind. In einem proteinhaltigen Lagerungspuffer)
gebrauchsfertig 5 * 400 µl	5 Standards (wäßriger Lösung mit Natriumazid).
gebrauchsfertig 2 * 400 µl	Kontrollen Level 1 und 2 (in wäßriger Lösung mit Natriumazid.)
gebrauchsfertig 21 ml	Tracer (Akridiniumester markierter Antigen in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Natriumazid)
in 470 ml heißem entionisiertem Wasser lösen.	Konzentrat für den Probenverdünnungspuffer (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. Nach dem Öffnen der Packung ist der Testkit in gefrorenem Zustand noch mindestens ein Jahr, im Kühlschrank mindestens 4 Wochen haltbar.

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 (1000 ml)
- 50 µl Pipette
- Multipette mit 5 ml und 50 ml Aufsatz
- Vortex-Mixer
- Luminometer
- Automatisches Waschgerät oder Handwaschgerät oder Wasserstrahlpumpe zum Absaugen der Lösung

Methodendurchführung

Vorbereitungen für die Methodendurchführung	
1	Verdünnungsmedium: Der gesamte Inhalt des Probenverdünnungskonzentrats wird mit 470 ml heißem entionisiertem Wasser aufgefüllt und gut gemischt
2	Kit-Komponenten und Probenmaterial auftauen. Die schonendste Möglichkeit besteht darin, den Kit, bzw. die Proben einen Tag vor Gebrauch vom Gefrierfach in den Kühlschrank zu stellen.
3	Vorbereitung der Stuhlproben: 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
4	Kugeln vor Gebrauch mit entionisiertem Wasser waschen.
5	Die für den Testansatz benötigten Stuhl racks eindeutig beschriften. Verwendete Gefäße: Der Testansatz erfolgt in Plastikröhrchen (12*75) in speziellen Ständern

Pipettierschema (für manuelles Pipettieren oder Pipettieren mit einem Probenverteilsystem)

Stuhl rack-röhrchen-Nr.		Volumen
1, 2	Standard 0	50 µl
3, 4	Standard 1	50 µl
5, 6	Standard 2	50 µl
7, 8	Standard 3	50 µl
9, 10	Standard 4	50 µl
11, 12	Kontrolle I	50 µl
13, 14	Kontrolle II	50 µl
15, 16	Proben	50 µl
alle 25 Proben	Kontrolle I, II	50 µl
am Ende der Serie	Kontrolle I, II	50 µl

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.
- Einige Testkomponenten enthalten Stoffe aus Tieren oder Menschen und sind als potentiell infektiös anzusehen. Es müssen alle Vorkehrungen zum Umgang mit Infektiösem Material getroffen werden.
- Im Falle daß der Testkit beschädigt ist, oder Flüssigkeit ausläuft, so sollten kontaminierte Stellen mit viel Wasser gewaschen und anschließend desinfiziert 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 Pipettier volumina 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.
- 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.
- Die Entsorgung von nicht verwendeten Testkomponenten sollte berücksichtigen, daß der Testkit potentiell infektiöses Material, ebenso wie Natriumazid enthält.