

Testansatz

50 µl Standards, Kontrollen und Proben laut Pipettierschema in Platte pipettieren
den Testansatz mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubieren
50 µl Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren
den Testansatz 1 h 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 620 nm messen.
Sollte die Extinktion des Standard 0 den Meßbereich des Photometers übersteigen, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm gemessen werden.

Standards

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

Standard	1	2	3	4
Konzentration [µg/g]:	0,5	2,0	8,0	32

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.

Validierung

Die mitbestimmten Kontrollen sollten im folgenden Vertrauensbereich liegen:

Kontrolle 1:	→	1,0 - 3,0 µg/g
Kontrolle 2:	→	5,0 – 11,0 µg/g

Bestimmung von Hämoglobin im Stuhl mittels eines Immunologischen Nachweisverfahrens (EIA).

Nur zur "in vitro" Diagnostik



Einführung

Das Kolonkarzinom ist weltweit die dritthäufigste Krebsart mit 600.000 neu diagnostizierten Fällen. Er entwickelt sich aus makroskopisch sichtbaren und lange Jahre bestehenden Praekanzerosen. Während Patienten mit kolorektalen Tumoren fortgeschrittenen Stadiums eine sehr schlechte Prognose haben, können Tumoren, die sehr früh erkannt werden normalerweise noch vor der Metastasierung chirurgisch entfernt werden. Das Ziel ist es demnach, mit diagnostischen Mitteln diese Präkanzerosen zu entdecken. Der vorgestellte Assay bietet einen Schritt in diese Richtung.

Vorteile

Das Hämoglobin erkennt mit einer hohen Wahrscheinlichkeit Kolonkarzinome besser als andere bisherige Parameter . In Kombination mit dem Hb-Hp-Komplex können auch Frühstadien erkannt werden.

- Immunologische Methoden werden von allen namhaften Instituten in Amerika als Screeningparameter empfohlen.
- Dieser Assay besticht durch seine hohe Spezifität.

Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode

Proben, Kontrollen, Standards und Konjugat (markiertes Hämoglobin) werden zusammen mit dem Antikörper (Anti-Hämoglobin), der an die Mikrotiterplatte gebunden ist inkubiert. Dabei konkurrieren die markierten Antigene (Konjugat) mit den Antigenen aus der Probe um die Bindungsstellen des Antikörpers an der Platte. Nicht gebundene Proteine werden mit dem anschließenden Waschschrift entfernt.

Vorbereitungen für die Methodendurchführung

1	Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.					
2	Verdünnungsmedium: 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 1/10 Gewicht zu Volumen) mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt (Zu 1 g Stuhl werden 10 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 eingestetzt.					
5	Verdünnen des Konjugats (1/50):					
	Anzahl der Streifen	Konjugat	Konjugat-puffer	Anzahl der Streifen	Konjugat	Konjugat-puffer
	1	10 µl	0,5 ml	7	70 µl	3,5 ml
	2	20 µl	1,0 ml	8	80 µl	4,0 ml
	3	30 µl	1,5 ml	9	90 µl	4,5 ml
	4	40 µl	2,0 ml	10	100 µl	5,0 ml
	5	50 µl	2,5 ml	11	110 µl	5,5 ml
	6	60 µl	3,0 ml	12	120 µl	6,0 ml

Assay Parameter

1. Antikörper an der Platte	Rabbit-Anti-human-Hämoglobin
Konjugat	Human-Hämoglobin mit HRP markiert
Probenmaterial:	Stuhl 1/50 in Probenpuffer
Probenvolumen	50 µl
Meßbereich:	0,02 – 3,2 µg/ml
Normbereich	< 2,0 µg/g
High dose hook:	kein High dose hook bis 2000 µg/g
Recovery :	Mittel : 93 %
Linearität (r= Korrelationskoeffizient):	r ² > 0,991
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	0,2 µg/g
Intraassayvarianz:	< 13,3 %
Interassayvarianz:	< 13,2%

Zusammensetzung der Testkits

Menge	Artikel
gebrauchsfertig 1 Stk	Mikrotiterplatte (mit polyklonalen Antikörpern beschichtet)
gebrauchsfertig 4 x 500 µl	4 Standards (in wäßriger Lösung mit Natriumazid).
Gebrauchsfertig 2 x 500 µl	Kontrollen Level 1 und 2 (in wäßriger Lösung mit Natriumazid.)
gebrauchsfertig 150 µl	Konjugat (HRPr markiertes Antigen in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Thimerosal)
gebrauchsfertig 12 ml	Substrat (TMB)
gebrauchsfertig 12 ml	Stopplösung (0,5 M Schwefelsäure)
gebrauchsfertig 15 ml	Konjugatpuffer (proteinhaltiger Phosphatpuffer mit Thimerosal)
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)

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 Saarde)td)
- Probenständer und Ständer für Saarde-Röhrchen.
- Meßzylinder (500 ml)
- 40 µl Pipette
- Multipette mit 5 ml und 50 ml Aufsatz
- Platereader
- Automatisches Waschgerät oder Handwaschgerät oder Wasserstrahlpumpe zum Absaugen der Lösung

Vorbereitungen für die Pipettierschema (für manuelles Pipettieren oder Pipettieren mit einem Probenverteilsystem)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	Standard 4	P 2	P 6	P 10	P 14	P 18	P 22	P 26	P 30	P 34	P 38
B	BLK	Standard 4	P 2	P 6	P 10	P 14	P 18	P 22	P 26	P 30	P 34	P 38
C	Standard 1	Kontrolle 1	P 3	P 7	P 11	P 15	P 19	P 23	P 27	P 31	P 35	P 39
D	Standard 1	Kontrolle 1	P 3	P 7	P 11	P 15	P 19	P 23	P 27	P 31	P 35	P 39
E	Standard 2	Kontrolle 2	P 4	P 8	P 12	P 16	P 20	P 24	P 28	P 32	P 36	P 40
F	Standard 2	Kontrolle 2	P 4	P 8	P 12	P 16	P 20	P 24	P 28	P 32	P 36	P 40
G	Standard 3	P1	P 5	P 9	P 13	P 17	P 21	P 25	P 29	P 33	P 37	P 41
H	Standard 3	P1	P 5	P 9	P 13	P 17	P 21	P 25	P 29	P 33	P 37	P 41

Allgemeine Hinweise

- Dieser Testkit und alle darin enthaltenen Komponenten dürfen nur zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt zur in vitro-Diagnostik verwendet werden.
- Alle Testkomponenten sollten immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Alle mitgelieferten Testkomponenten enthalten Thimerosal. Bitte alle Sicherheitsmaßnahmen ergreifen. Die Berührung mit der Haut sollte vermieden werden.
- Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und Karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut und den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- 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 Pipettierolumina 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.
- Nach dem Öffnen der Packung ist der Testkit mit Lagerung im Kühlschrank noch bis zum aufgedruckten Verfalldatum zu verwenden.
- Standards und Kontrollen wurden gegen den WHO-Standard CRM-470 kalibriert
- Die Stopplösung besteht aus H₂SO₄ und muß mit Vorsicht behandelt werden. Sie verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

Testprinzip

