

Testansatz

1 Kugel
40 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	2,5	10	40	160

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:	→	7,8-12,2 µg/g
Kontrolle 2:	→	28 - 52 µg/g

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

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 Praeankerosen. 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 Präankerosen zu entdecken. Der vorgestellte Assay bietet einen Schritt in diese Richtung.

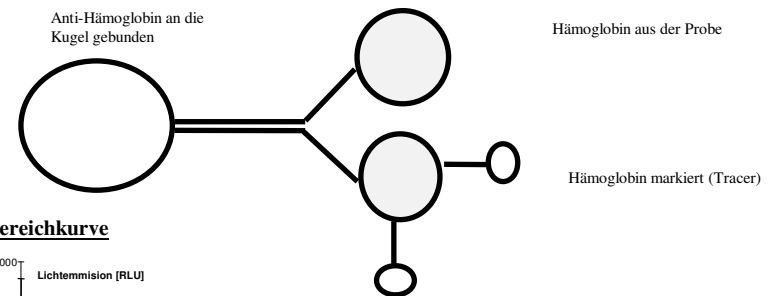
Vorteile

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.

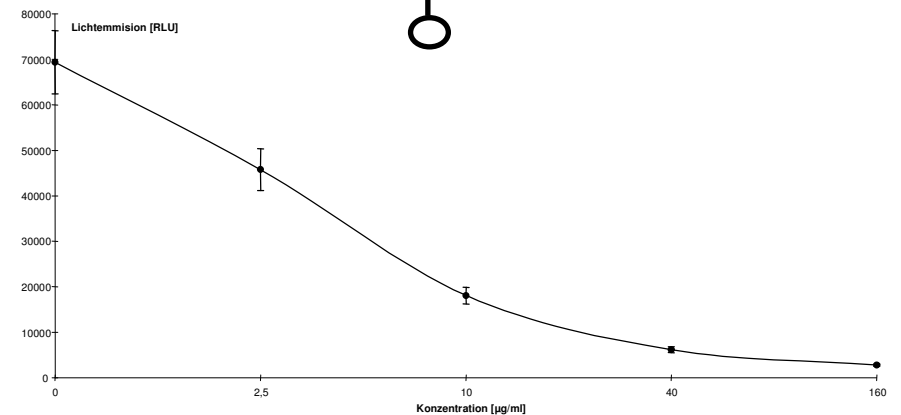
- Immunologische Methoden werden von allen namhaften Instituten in Amerika als Screeningparameter empfohlen.
- Dieser Assay besticht durch seine hohe Spezifität.

Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode

Proben, Kontrollen, Standards und Tracer (markiertes Hämoglobin) werden zusammen mit dem Antikörper (Anti-Hämoglobin), der an die Polystyrenkugel 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-Hämoglobin
Tracer	Human-Hämoglobin mit Akridiniumester markiert
Probenmaterial:	Stuhl 1/10 in PPGNE
Probenvolumen	40 µl
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	2,2 µg/g
Meßbereich:	2,5 – 160 µg/g
Normbereich	< 16 µg/g
High dose hook:	kein High dose hook bis 1000 µg/g
Recovery :	> 102,9 %
Linearität (r= Korrelationskoeffizient):	r ² > 0,982
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	7,0 µg/g
Intraassayvarianz:	< 11,7 %
Interassayvarianz:	< 18,2%
Cut-Off	16 µg/g
Klinische Sensitivität	96 % (Kolonkarzinom)
Klinische Spezifität	98 % (Kolonkarzinom)

Zusammensetzung der Testkits

Menge	Artikel
gebrauchsfertig 100 Stk	100 Kugeln (mit polyklonalen Antikörpern beschichtet in einem proteinhaltigen Lagerungspuffer)
gebrauchsfertig 5 x 400 µl	5 Standards (in wäßriger Lösung mit Natriumazid.)
Gebrauchsfertig 2 x 400 µl	Kontrollen Level 1 und 2 (in wäßriger Lösung mit Natriumazid.)
gebrauchsfertig 21 ml	Tracer (Akridiniumester markiertes Antigen in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Natriumazid)
in 470 ml warmem, 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 Saarestedt)
- Probenständer und Ständer für Saarestedt-Röhrchen.
- Meßzylinder (500 ml)
- 40 µl Pipette
- Multipipette mit 5 ml und 50 ml Aufsatz
- Luminometer
- Automatisches Waschgerät oder Handwaschgerät oder Wasserstrahlpumpe zum Absaugen der Lösung

Methodendurchführung

Vorbereitungen für die Methodendurchführung	
1	Verdünnungsmedium: 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.
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 Stuhltracks eindeutig beschriften. Verwendete Gefäße: 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	40 µl
3, 4	Standard 1	40 µl
5, 6	Standard 2	40 µl
7, 8	Standard 3	40 µl
9, 10	Standard 4	40 µl
11, 12	Kontrolle I	40 µl
13, 14	Kontrolle II	40 µl
15, 16	Proben	40 µl
alle 25 Proben	Kontrolle I, II	40 µl
am Ende der Serie	Kontrolle I, II	40 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.
- 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.
- Nicht verwendete Testkits müssen nach den Sicherheitsvorschriften zur Beseitigung von Testseren und Testantigene entsorgt werden.