

**Testansatz: alle Reaktionen sollten im Dunkeln stattfinden**

100 µl Probe, Standards und Kontrollen.

den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren

Waschen mit 3 \* 250 µl Waschpuffer

100 µl Konjugat 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 innerhalb von **5 Minuten** bei 450 nm messen.

**Standards**

Für die Auswertung der Messwerte verwendet man ein 4-parametrisches Logit-Log-Modell. Es müssen die Angaben zum Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators angegeben werden.

Diese sind auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden.

Je nach verwendeter Software finden die Parameter A,B,C und D oder die Optische Dichte bezogen auf die Konzentration Verwendung.

**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.

Die mitbestimmten Kontrollen sollten im folgenden Vertrauensbereich liegen:

<b>Kontrolle 1:</b>	<b>→</b>	<b>2,0 ± 1 µg/g</b>
<b>Kontrolle 2:</b>	<b>→</b>	<b>8,0 ± 4,0 µg/g</b>

**Bestimmung von Hämoglobin-Haptoglobin im Stuhl mittels eines ELISAs.**

**Nur zu "Forschungszwecken"**

**Einführung**

Das Kolonkarzinom ist weltweit die dritthäufigste Krebsart mit 600.000 neu diagnostizierten Fällen. Es 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**

Der Komplex aus Hämoglobin und Haptoglobin ist im Stuhl weniger stark dem bakteriellen Abbau unterworfen, so dass ein Erkennen von rechtsseitigen Karzinomen und Adenomen wahrscheinlicher wird.

Dieser Test erkennt deutlich mehr Adenome als ein immunologischer Test, der nur für Hämoglobin spezifisch ist.

**Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode**

Proben, Kontrollen, Standards werden in eine mit Antikörper gegen Haptoglobin beschichtete Platte gegeben. Nach einem Inkubationsschritt und einem Waschschrift wird ein zweiter Antikörper (Anti-Hämoglobin), 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.

**Methodendurchführung**

<b>Vorbereitungen für die Methodendurchführung</b>						
<b>1</b>	<b>Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.</b>					
<b>2</b>	<b>Waschpuffer:</b> Der gesamte Inhalt des Waschpufferkonzentrates wird in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt					
<b>3</b>	<b>Vorbereitung der Stuhlproben:</b> Stuhlproben werden mit dem Stuhlentnahmeröhrchen der Firma Frost Diagnosika und deren Extraktionspuffer aufbereitet. (siehe Packungsbeilage der Röhrchen) Wir erhalten eine Probenverdünnung von 1/50. Die Proben werden so lange gemischt bis die Lösung homogen ist. Die Röhrchen werden 15 min bei 3000 g zentrifugiert. 100 µl des klaren Überstandes werden im Test eingesetzt.					
<b>4</b>	<b>Verdünnen des Konjugats (1/100):.</b>					
	<b>Verdünnen des Konjugats (1/50):.</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Konjugat-puffer</b>	<b>Anzahl der Streifen</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Konjugat-puffer</b>
	<b>1</b>	<b>10 µl</b>	<b>1 ml</b>	<b>7</b>	<b>70 µl</b>	<b>7 ml</b>
	<b>2</b>	<b>20 µl</b>	<b>2 ml</b>	<b>8</b>	<b>80 µl</b>	<b>8 ml</b>
	<b>3</b>	<b>30 µl</b>	<b>3 ml</b>	<b>9</b>	<b>90 µl</b>	<b>9 ml</b>
	<b>4</b>	<b>40 µl</b>	<b>4 ml</b>	<b>10</b>	<b>100 µl</b>	<b>10 ml</b>
	<b>5</b>	<b>50 µl</b>	<b>5 ml</b>	<b>11</b>	<b>110 µl</b>	<b>11 ml</b>
	<b>6</b>	<b>60 µl</b>	<b>6 ml</b>	<b>12</b>	<b>120 µl</b>	<b>12 ml</b>

**Assay Parameter**

1. Antikörper an der Platte:	Rabbit-Anti-human-Haptoglobin
Konjugat	Maus Anti-Hämoglobin mit HRP markiert
Probenmaterial:	Stuhl 1/50 in Probenverdünnungspuffer
Probenvolumen	100 µl
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	0,16 ng/ml
Recovery :	>97 %
Linearität (r= Korrelationskoeffizient):	r = 0,987
Intraassayvarianz:	< 7,5 %
Interassayvarianz:	< 9,8 %
Meßbereich:	0,5 - 32 ng/ml
<b>Normbereich</b>	<b>&lt;2,0 µg/g</b>

**Zusammensetzung der Testkits**

Menge		Artikel
gebrauchsfertig	1 Stk	<b>Mikrotiterplatte</b> (Mit polyklonalen Antikörpern beschichtet)
gebrauchsfertig	1x1000 µl	<b>1 Kalibrator</b> (in wäßriger Lösung mit Thimerosal).
gebrauchsfertig	2x1000 µl	<b>Kontrollen</b> (in wäßriger Lösung mit Thimerosal).
gebrauchsfertig	150 µl	<b>Konjugat-Konzentrat</b> (HRP markierter Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Thimerosal)
gebrauchsfertig	15 ml	<b>Konjugat-Puffer</b> (Phosphatpuffer mit Thimerosal und Proteinzusatz)
gebrauchsfertig	12 ml	<b>Substrat</b> (TMB)
gebrauchsfertig	12 ml	<b>Stopplösung</b> (0,5 M Schwefelsäure)
in 500 ml entionisiertem Wasser lösen.	30 ml	<b>Konzentrat für den Waschpuffer</b> (Phosphatpuffer mit Thimerosal und Detergenz pH 7,4)

**Aufbewahrung der Testkomponenten**

Standards und Kontrollen werden bei -20 °C gelagert.

Die restlichen Reagenzien werden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

**Probenmaterial und Probenhaltbarkeit**

Die Stuhlproben werden vor der Bestimmung extrahiert und verdünnt.

Die Haltbarkeit der Proben beträgt 3 Tage bei 4 °C oder 12 Monate in tiefgefrorenem Zustand (- 20 °C).

**Verwendete Geräte und Materialien**

- Meßzylinder (500 ml), Waage,
- 100 µl Pipette, Zentrifuge
- Multipette mit 5 ml Aufsatz
- Vortex-Mixer
- Platereader

**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 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 ist 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.
- Die Stopplösung besteht aus H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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.
- Für den Fall, dass der Kit beschädigt ist und Reagenzien ausgelaufen sind, sollten alle Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden, die bei einem Umgang mit infektiösem, kanzerogenem und reizendem Material nötig sind.
- Bei der Entsorgung von nicht verwendeten Testkomponenten sollte die für klinische Laboratorien gültigen Richtlinien beachtet werden