

Testansatz

1 Kugel
50 µl Standards, Kontrollen und Proben laut Pipettierschema pipettieren
200 µl Assaypuffer
den Testansatz für mindestens <b>10 h</b> Stunden im Kühlschrank inkubieren
Waschen mit 2 * 4 ml (z.B. mit dem Immunowasher von Berthold)
200 µl Tracer in alle Plastikröhrchen (12*75) pipettieren
den Testansatz mindestens <b>6 h</b> bei Raumtemperatur 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	5
<b>Konzentration [µg/g]:</b>	<b>0</b>	<b>0,31</b>	<b>0,63</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	<b>40</b>

Die Konzentrationsangaben der Standards sind Nominalwerte, und beziehen sich auf die Verdünnung der Proben (1/10). Damit kann die Konzentration auf µg Hämoglobin-Haptoglobin 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:

<b>Kontrolle 1:</b>	<b>→</b>	<b>0,2 - 1,0 µg/g</b>
<b>Kontrolle 2:</b>	<b>→</b>	<b>1,5 - 3,0 µg/g</b>

**Bestimmung des Hämoglobin Haptoglobin-Komplexes im Stuhl mittels eines Immunochemoluminometrischen Nachweisverfahrens (ILMA).**



Einführung

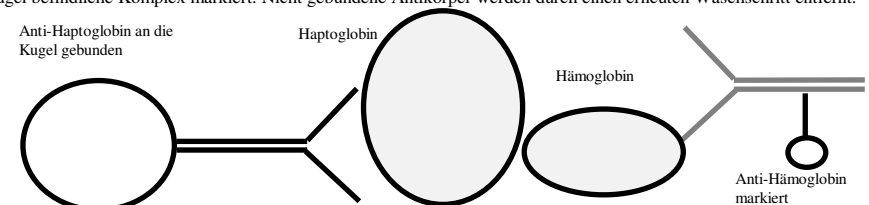
Das Kolonkarzinom ist weltweit die dritthäufigste Krebsart mit 600.000 neu diagnostizierten Fällen. Er entwickelt sich aus makroskopisch sichtbaren und lange Jahre bestehenden Praekanzerosen. Während Patienten mit kolorektalen Tumoren fortgeschrittenen Stadiums eine sehr schlechte Prognose haben, können 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

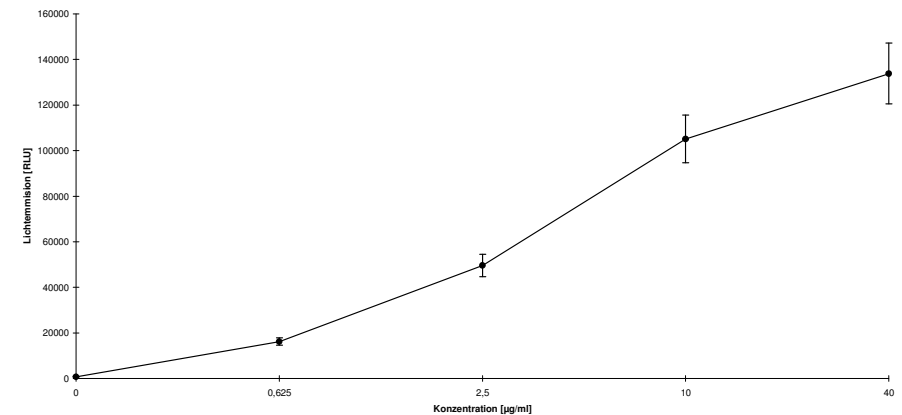
Der Komplex aus Hämoglobin und Haptoglobin ist im Stuhl weniger stark dem bakteriellen Abbau unterworfen, so daß ein Erkennen von rechtzeitigen Karzinomen und Adenomen wahrscheinlicher wird. Dieser Test erkennt deutlich mehr Adenome als ein immunologischer Test der für nur für Hämoglobin spezifisch ist.

Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode

Proben, Kontrollen und Standards werden zusammen mit dem spezifischen Antiserum (Anti-Haptoglobin) an die Polystyrolkugel gebunden ist inkubiert. Dabei bindet sich der Komplex aus Hämoglobin und Haptoglobin an die Kugel. Nicht gebundene Proteine werden mit dem anschließenden Waschschrift entfernt. Der Tracer besteht aus einem monoklonalen mit Akridiniumester markierten Antikörper (Anti-Hämoglobin). Durch diesen Inkubationsschritt wird der an der Kugel befindliche Komplex markiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch einen erneuten Waschschrift entfernt.



Mustereichkurve



**Assay Parameter**

1. Antikörper an der Kugel:	Rabbit-Anti-human-Haptoglobin
2. Antikörper	Maus-Anti-human-Hämoglobin
Probenmaterial:	Stuhl 1/10 in PPGNE
Probenvolumen	50 µl
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	0,03 µg/g
Intraassayvarianz:	CV : 6,8 - 9,0 %
Interassayvarianz:	CV : 14,7 - 17,0 %
Recovery:	88 - 106 %
Meßbereich:	0,03 - 50 µg/g
<b>Normbereich</b>	<b>&lt; 2,0 µg/g</b>
High dose hook:	kein High dose hook bis 100 µg/g
Cut-Off	2,0 µg/g
Klinische Sensitivität	77 % (Kolonkarzinom)
Klinische Spezifität	95 % (Kolonkarzinom)

**Zusammensetzung der Testkits**

Menge	Artikel
Gebrauchsfertig 100 Stk	<b>100 Kugeln</b> (mit Antikörpern beschichtet. In einem proteinhaltigen Lagerungspuffer)
Gebrauchsfertig 6 x 400 µl	<b>5 Standards</b> (in wäßriger Lösung mit Natriumazid.)
Gebrauchsfertig 2 x 400 µl	<b>Kontrollen Level 1 und 2</b> (in wäßriger Lösung mit Natriumazid.)
Gebrauchsfertig 21 ml	<b>Tracer</b> (Akridiniumester markierter monoklonaler Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Natriumazid)
Gebrauchsfertig 21 ml	<b>Assaypuffer</b> (Phosphatpuffer mit Natriumazid und Proteinzusatz pH 7,4)
in 470 ml heißem entionisiertem Wasser lösen.	<b>Konzentrat für den Probenverdünnungspuffer</b> (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 Saardstedt)
- Probenständer und Ständer für Saardstedt-Röhrchen.
- Meßzylinder (500 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	
<b>1</b>	<b>Verdünnungsmedium:</b> 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.
<b>2</b>	<b>Kit-Komponenten und Probenmaterial auftauen:</b> Die schonendste Möglichkeit besteht darin, den Kit, bzw. die Proben einen Tag vor Gebrauch vom Gefrierfach in den Kühlschrank zu stellen.
<b>3</b>	<b>Vorbereitung der Stuhlproben:</b> 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
<b>4</b>	<b>Kugeln vor Gebrauch mit entionisiertem Wasser waschen.</b>
<b>5</b>	Die für den Testansatz benötigten Stuhltracks eindeutig beschriften. <b>Verwendete Gefäße:</b> 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	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	Standard 5	50 µl
13, 14	Kontrolle I	50 µl
15, 16	Kontrolle II	50 µl
17, 18	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.
- 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.