

**Zusammensetzung der Testkits**

Menge		Artikel
gebrauchsfertig	1 Stk	<b>Mikrofilterplatte</b> (Mit polyklonalen Antikörpern beschichtet)
gebrauchsfertig	4 x 1 ml	<b>Standards</b> (in wäßriger Lösung mit Thimerosal).
gebrauchsfertig	2 x 1 ml	<b>Kontrollen</b> (in wäßriger Lösung mit Thimerosal).
gebrauchsfertig	1 x 150 µl	<b>Antikörper-Konzentrat</b> (Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Thimerosal)
gebrauchsfertig	1 x 150 µl	<b>Konjugat-Konzentrat</b> (HRP-markierter Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Thimerosal)
gebrauchsfertig	2 x 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)
in 500 ml entionisiertem Wasser lösen.	35ml	<b>Konzentrat für den Probenverdünnungspuffer</b> (Phosphatpuffer mit Natriumazid und Proteinzusatz pH 7,4)

**Vorsichtsmaßnahmen**

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H2SO4). H2SO4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H2SO4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

**Technische Merkmale**

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien sollte vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Im Falle von nicht optimalen Ergebnissen wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

**Allgemeine Hinweise**

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Maier analytik GmbH 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, der Firma Maier Analytik GmbH, zurück zu senden.

**Bestimmung von Trypsin im Stuhl mittels eines ELISAs.**



**Nur zur "in vitro Diagnostik"**

Da viele Krankheiten mit einer exokrinen Pankreasinsuffizienz assoziiert sind (z.B. zystische Fibrose, Alkoholabusus, Unfalltrauma, Fibrosis, u.v.a.), ist deren frühzeitige Erkennung sinnvoll. Das Trypsin ist ein Enzym des Pankreas, das in den Verdauungstrakt abgegeben wird und die Darmpassage unbeschadet übersteht. Dadurch spiegelt das Trypsin im Stuhl die exokrine Pankreasfunktion wider.

**Vorteile**

- Eine Substitutionstherapie hat keinen Einfluß auf das Testergebnis, da der Test auf hochspezifischen Antikörpern beruht, die nur die humane Trypsin erkennen.
- Das Trypsin ist auch über 3 Tage bei Raumtemperatur im Stuhl stabil. Damit kann der Transport der Proben ohne größeren Aufwand mit der Post erfolgen.
- Die Diagnostik ist nicht invasiv, so daß der Patient keinen zusätzlichen Belastungen ausgesetzt ist..

**Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode**

Proben, Kontrollen, Standards werden in eine mit Antikörper gegen Trypsin beschichtete Platte gegeben. Nach einem Inkubationsschritt und einem Waschschrirt wird ein Antikörper (Anti-Trypsin) zugegeben. Nach einem Inkubationsschritt und einem Waschschrirt wird ein zweiter Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiert ist (Konjugat) hinzugegeben. Nach einem Inkubations- und Waschschrirt 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.

**Assay Parameter**

Antikörper an der Platte:	Rabbit-Anti-human-Trypsin
Antikörper	Maus – Anti -Trypsin
Konjugat	Rabbit Anti-Maus IGG HRP markiert
Probenmaterial:	Stuhl 1/375 in Probenverdünnungspuffer
Probenvolumen	100 µl
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	5,95 ng/g
Durchschnittliche Recovery :	89,4 – 125 %
Linearität (r= Korrelationskoeffizient):	r=0,985 %
Intraassayvarianz:	< 10,4 %
Interassayvarianz:	< 15,3 %
Meßbereich:	100 – 6000 ng/g
Spezifität	95 %
<b>Normbereich</b>	<b>&lt; 1000 ng/g</b>

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

**Verwendete Geräte und Materialien**

- |   |   |
|---|---|
| Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)   | Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen |
| Meßzylinder (500 ml)  | 10µl und 100 µl Präzisionspipette       |
| Multipette mit Aufsatz  | Vortex-Mixer                            |
| Entrifuge 3000 x g  | Folie zum Abkleben der Platte           |
| Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm). |   |

Vorbereitungen für die Methodendurchführung						
<b>1</b>	<b>Alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18-26 °C)bringen.</b>					
<b>2</b>	<b>Probenverdünnungspuffer:</b> 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.					
<b>3</b>	<b>Waschpuffer:</b> Der gesamte Inhalt des Waschpufferkonzentrat wird in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt					
<b>4</b>	<b>Vorbereitung der Stuhlproben:</b> Stuhlproben werden eingewogen und <b>1/375</b> (Gewicht zu Volumen) mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt (Zu 4mg Stuhl werden 1,5 ml Puffer zugegeben).Die Proben werden so lange gemischt bis die Lösung homogen ist. Die Röhrchen werden 15 min bei 3000 g zentrifugiert.					
<b>5</b>	<b>Verdünnen des Konjugats (1/100)</b>					
	Anzahl der Streifen	Antikörper bzw. Konjugat	Konjugatpuffer	Anzahl der Streifen	Antikörper bzw. Konjugat	Konjugat-puffer
	1	10 µl	1 ml	7	70 µl	7 ml
	2	20 µl	2 ml	8	80 µl	8 ml
	3	30 µl	3 ml	9	90 µl	9 ml
	4	40 µl	4 ml	10	100 µl	10 ml
	5	50 µl	5 ml	11	110 µl	11 ml
	6	60 µl	6 ml	12	120 µl	12 ml

**Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien**

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.
- Reagenzien mit einem Volumen kleiner als 200 µl sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** und **Probenpufferkonzentrat** müssen vor Gebrauch in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (35 ml bzw. 30 ml Konzentrat + 500 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentrate kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Die Pufferkonzentrate können bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnten Pufferlösungen sind bei 2-8 °C einen Monat in geschlossenen Gefäßen haltbar.
- Die **Standards und Kontrollen** sind bei -20 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil und können bis zu 2-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.
- Die **Mikrotiterplatte** ist in verschlossenem Plastikbeutel 30 Tage bei Raumtemperatur und bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- **Alle anderen Testreagenzien** sind bei 2-8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

**Probenmaterial und Probenhaltbarkeit**

Die Stuhlproben werden vor der Bestimmung extrahiert und verdünnt. Die Haltbarkeit der verdünnten Proben (1/375) beträgt 2 Tage bei 4 °C oder 12 Monate in tiefgefrorenem Zustand. Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen bzw. zu verdünnen.

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

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen.

**100 µl** Standards, Kontrollen und Proben laut Pipettierschema in die Vertiefungen pipetieren.

den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren

Waschen mit 3 \* 250 µl Waschpuffer

**100 µl** verdünnter Antikörper in alle Vertiefungen

den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren

Waschen mit 3 \* 250 µl Waschpuffer

**100 µl** verdünntes 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 bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge 620nm messen.

**Standards**

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

Standard	1	2	3	4
<b>Konzentration [ng/g]</b>	<b>94</b>	<b>375</b>	<b>1500</b>	<b>6000</b>

Die Konzentrationsangaben der Standards sind Nominalwerte und beziehen sich auf die Verdünnung der Proben (1/375). Damit kann die Konzentration pro Gramm Stuhl ermittelt werden. Bei der Verwendung anderer Verdünnungen muß die reale Standardkonzentration angenommen werden.

**Auswertung:**

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die Punkt zu Punkt Auswertung :

**Punkt-zu-Punkt-Auswertung**

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

**4-Parameter-Funktion** Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

**Gewichtete Spline-Funktion** Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

**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.

<b>Kontrolle 1:</b>	→	<b>375 ± 95 ng/g</b>
<b>Kontrolle 2:</b>	→	<b>1500 ± 400 ng/g</b>