

Bestimmung der pankreatischen Amylase im Stuhl

mittels eines Immunochemoluminometrischen Nachweisverfahrens (ILMA).

Testansatz

1 Kugel
50 µl Standards, Kontrollen und Proben laut Pipettierschema pipettieren
200 µl Assaypuffer
den Testansatz für mindestens 2 h bei Raumtemperatur Stunden inkubieren
Waschen mit 2 * 4 ml (z.B. mit dem Immunowasher von Berthold)
200 µl Tracer in alle Plasikröhrchen (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	5
Konzentration [µg/g]:	0	45	186	745	3000	11964

Die Konzentrationsangabe der Standards sind Nominalwerte, und beziehen sich auf die Verdünnung der Proben (1/10). Damit kann die Konzentration auf ein 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:	→	27 -90 µg/g
Kontrolle 2:	→	320 - 640 µg/g

Einführung

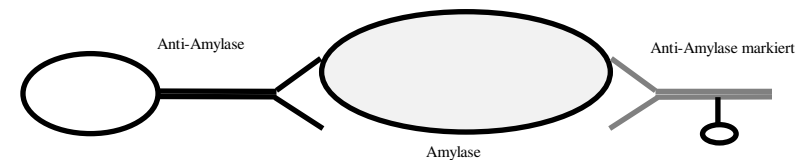
Da viele Krankheiten mit einer exokrinen Pankreasinsuffizienz assoziiert sind (z.B. zystische Fibrose, Alkoholabusus, Unfalltrauma, Fibrosis, u.v.a.), ist deren frühzeitige Erkennung sinnvoll. Die pankreatische Amylase ist ein Enzym des Pankreas, das in den Verdauungstrakt abgegeben wird und die Darmpassage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

Vorteile

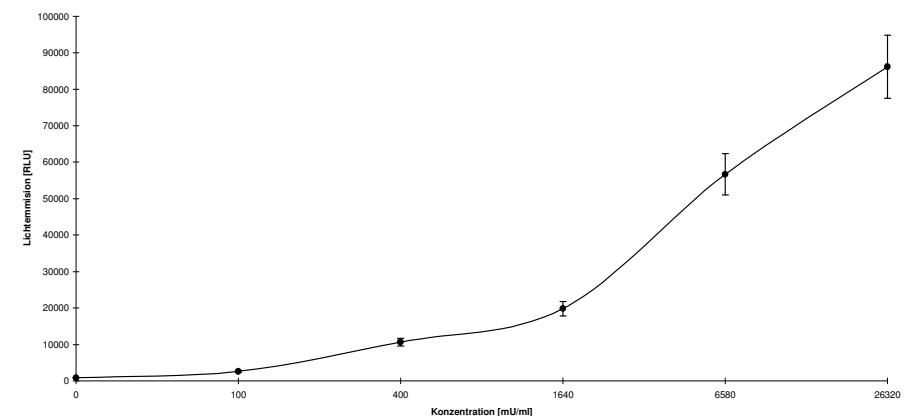
- Eine Substitutionstherapie hat keinen Einfluß auf das Testergebnis, da der Test auf hochspezifischen monoklonalen Antikörpern beruht, die nur die humane pankreatische Amylase erkennen.
- Es werden keine störenden Vorstufen (Prä- und Pro-) der Amylase gebildet.
- Der Pankreas scheidet hohe Mengen Amylase aus (5-6 % der Gesamtsekretion), so daß eine Schädigung früh erkannt werden kann.
- Die Amylase 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 zusätzliche Belastungen ausgesetzt ist..

Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode

Proben, Kontrollen und Standards werden zusammen mit dem spezifischen Antiserum (Anti-Amylase) an die Polystyrolkugel gebunden ist inkubiert. Dabei bindet sich Amylase an die Kugel. Nicht gebundene Proteine werden mit dem anschließenden Waschschrift entfernt. Der Tracer besteht aus einem monoklonalen mit Akridiniumester markierten Antikörper (Anti-Amylase). 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:	Maus-Anti-human-Amylase
2. Antikörper	Maus-Anti-human-Amylase
Probenmaterial:	Stuhl 1/10 in PPGNE
Probenvolumen	50 µl
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	0,35 µg/ml
Spezifität (Kreuzreaktivität)	keine Kreuzreaktion mit Schweine-Amylase und Speichel-Amylase, keine Störung durch Inhibitoren.
Intraassayvarianz:	CV : 5,6 - 6,7 %
Interassayvarianz:	CV : 6,21 - 9,9 %
Recovery:	88 - 106 %
Meßbereich:	10 - 23000 µg/g
Normbereich	> 364 µg/g
High dose hook:	kein High dose hook bis 32 U/g
Klinische Sensitivität	70 % (chronische Pankreatitis)
Klinische Spezifität	91 % (chronische Pankreatitis)

Zusammensetzung der Testkits

Menge	Artikel
gebrauchsfertig 100 Stk	100 Kugeln (die mit monoklonalen Antikörpern beschichtet sind. In einem proteinhaltigen Lagerungspuffer)
gebrauchsfertig 6 * 400 µl	6 Standards (wäßriger Lösung mit Natriumazid).
Gebrauchsfertig 2 * 400 µl	Kontrollen Level 1 und 2 (in wäßriger Lösung mit Natriumazid.)
gebrauchsfertig 21 ml	Tracer (Akridiniumester markierter monoklonaler Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Natriumazid)
gebrauchsfertig 21 ml	Assaypuffer (Phosphatpuffer mit Natriumazid und Proteinzusatz pH 7,4)
in 470 ml warmen 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 Saarstedt)
- Probenständer und Ständer für Saarsredt-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	
1	Verdünnungsmedium: Der gesamte Inhalt des Probenverdünnungskonzentrats wird mit 470 ml heißem entionisiertem Wasser aufgefüllt 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 Stuhl racks eindeutig beschriften. Verwendete Gefäße: Der Testansatz erfolgt in Plastikröhrchen (12*75) in speziellen Ständern

Pipettierschema (für manuelles Pipettieren oder Pipettieren mit einem Probenverteilssystem)

Stuhl rack-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 Pipettier volumina 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.