

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung M2PK im Stuhl	Dokument: SA-KL-M2PK Version: E Seite: 1/7
--	---	--

Änderungshinweis	<ul style="list-style-type: none"> - Rekonstitution der Standards und der Kontrolle - Testdurchführung, ein Inkubationsschritt entfällt
------------------	---

Inhaltsverzeichnis

1. Zweck.....	2
1.1. Analyt.....	2
1.2. Indikation.....	2
2. Prinzip des Analysenverfahrens.....	2
3. Untersuchungsmaterial, Lagerung	2
3.1. Probenmaterial.....	2
3.2. Lagerung.....	2
3.3. Ausschlusskriterien	2
4. Benötigte Geräte, Hilfsmittel und Materialien	2
5. Durchführung	3
5.1. Probenvorbereitung.....	3
5.2. Testablauf	4
5.3. Berechnung.....	5
6. Interne Qualitätskontrolle	5
6.1. Kontrolle.....	5
6.2. Freigabe und Dokumentation der Ergebnisse.....	5
6.3. Maßnahmen bei Abweichung.....	5
7. Beurteilung und Grenzen des Verfahrens	6
7.1. Angabe von Präzision und Richtigkeit.....	6
7.2. Angabe von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenzen	6
7.3. Angabe von Linearität und Spezifikation	6
7.4. Angaben zur Methodvalidierung	6
8. Ergebnisse und Befundbericht	6
8.1. Angabe des Ergebnisses (inkl. Einheiten).....	6
8.2. Referenzbereiche.....	6
9. Hinweise und Störungen	6
10. Referenzen, Literatur	7
11. Anlagen.....	7

	erstellt	geprüft	freigegeben
Datum	23.03.17	27.03.17	28.03.17
Unterschrift			
Name	S. Hirschel	Dr. T. Drogies	S. Arnoldt
Abteilung		Laborarzt	QMB

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung M2PK im Stuhl	Dokument: SA-KL-M2PK Version: E Seite: 2/7
--	---	--

1. Zweck

1.1. Analyt

Analyt

Tumor M2-Pyruvatkinase im Stuhl

EDV-Kürzel

M2PKS

1.2. Indikation

- Tumor M2-PK ist ein Isoenzym der Pyruvatkinase, welches in hoher Konzentration bei verschiedenen Tumoren des Menschen auftritt,
- Tumor M2-PK ist ein Enzym des Tumorstoffwechsels
- Nachweis gastrointestinaler Tumore, Adenome, Polypen oder Karzinome

2. Prinzip des Analysenverfahrens

Die Bestimmung des Tumor M2-PK erfolgt über einen Sandwich – ELISA mit zwei monoklonalen Antikörpern

3. Untersuchungsmaterial, Lagerung

3.1. Probenmaterial

humaner Stuhl

möglichst frisch, sollte innerhalb 48 h im Labor eintreffen

Die Stuhlextrakte können bei 4 – 8°C einen Tag und bei – 20°C bis zu 4 Wochen aufbewahrt werden.

3.2. Lagerung

bei 4°C - 8°C

bei -20°C

1 Tag

bis zu 1 Jahr

3.3. Ausschlusskriterien

Keine Angabe

4. Benötigte Geräte, Hilfsmittel und Materialien

Geräte:

- Reader für ELISA (PM-SE-359)

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung M2PK im Stuhl	Dokument: SA-KL-M2PK Version: E Seite: 3/7
--	---	--

Hilfsmittel:

- Pipetten, Mehrkanalpipette
- saugfähiges Papier
- Vortexer

Reagenzien

Stuhlextraktionskit – Master Quick-Prep (ScheBo)

Stuhlaufbereitungsröhrchen mit Extraktionspuffer gebrauchsfertig

- Lagerung im Kühlschrank bei 4°C – 8°C
→ vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen, Haltbarkeit ist der jeweiligen Packung zu entnehmen

Tumor M2-PK™ Stuhltest (ScheBo)

- Lagerung im Kühlschrank bei 4°C – 8°C
→ vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen, Haltbarkeit ist der jeweiligen Packung zu entnehmen

- anti Tumor M2-PK-Biotin-POD-Streptavidinkomplex gebrauchsfertig, lichtempfindlich
- TMB-Substratlösung gebrauchsfertig, lichtempfindlich
- Stopplösung gebrauchsfertig

- Waschpuffer 5-fach konzentriert,
→ Waschpuffer (100 ml) mit 400 ml entionisierten Wasser verdünnen,
Waschpuffer verdünnt 6 Monate bei 4°C – 8°C haltbar

- beschichtete Mikrotiterstreifen
→ nach Anbruch im Kühlschrank im Folienbeutel mit Trockenmittel gut verschlossen aufbewahren

- Halterung für einzelne Streifen

Standards 1-4, Positiv Kontrolle lyophilisiert
→ Standards und Kontrolle mit je 700 µl Waschpuffer auflösen,
bei 4°C – 8°C 6 Wochen, bei -20°C 12 Wochen haltbar

5. Durchführung

5.1. Probenvorbereitung

- Bestimmung erfolgt in der Regel einmal wöchentlich, möglichst wenn Streifen voll ausgenutzt werden
- Arbeitsplatzliste **STHL** drucken und Untersuchungsaufträge durchnummerieren
- Sortieren und Nummerieren der Stühle an Hand der Arbeitsplatzliste

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung M2PK im Stuhl	Dokument: SA-KL-M2PK Version: E Seite: 4/7
--	---	--

- **Stuhlaufbereitung**

- Aufbereitungsröhrchen an Hand der Arbeitsplatzliste beschriften
- weiße Dosierspitze nach links drehen und herausziehen
- Spitze mit bohrenden Bewegungen ca. 1 cm in Stuhl tauchen
WICHTIG: Alle Kerben der Dosierspitze müssen mit Stuhl gefüllt sein.
- Dosierspitze durch den roten Einsatz zurück in das Röhrchen stecken und nach rechts verschrauben
- gut mischen auf Vortexer
- 10 min. extrahieren bei Raumtemperatur
- erneut mischen
WICHTIG: Stuhl aus allen Kerben muss in die Lösung gehen
- roten Konuseinsatz zum Öffnen des Röhrchens nach links drehen, bis zum „Knacken“ nach hinten drücken und mit der weißen Spitze aus dem Röhrchen ziehen
- suspendierte Stuhlpartikel absetzen lassen

5.2. Testablauf

- benötigte Mikrotiterstreifen in der Halterung befestigen
- aufbereitete Stuhlproben unverdünnt einsetzen

Erste Inkubation:

- **50 µl** Blank (Waschpuffer), Standards 1 - 4, positive Kontrolle und aufbereitete Patientenstuhlproben in entsprechende Näpfe pipettieren

Pipettierschema:

	Mikrotiterstreifen 1	Mikrotiterstreifen 2	Mikrotiterstreifen 3
A	Blank (Waschpuffer)	Probe 3	Probe 11
B	Standard 1	Probe 4
C	Standard 2	Probe 5
D	Standard 3	Probe 6
E	Standard 4	Probe 7
F	positive Kontrolle	Probe 8
G	Probe 1	Probe 9
H	Probe 2	Probe 10

- 60 min. bei Raumtemperatur inkubieren

Waschen:

- Abschütten der Inkubationslösung und 3 mal mit jeweils **250 µl** Waschpuffer waschen
- bei jedem Waschschrift mind. 1-2 Minuten einwirken lassen
- verbleibende Reste auf saugfähigen Papier abklopfen

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung M2PK im Stuhl	Dokument: SA-KL-M2PK Version: E Seite: 5/7
--	---	--

Zweite Inkubation:

- jeweils **50 µl** des anti Tumor M2-PK-Biotin-POD-Streptavidinkomplexes in die Vertiefungen pipettieren
- 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren

Waschen:

- Abschütten der Lösung und 3 mal mit jeweils **250 µl** Waschpuffer waschen
- bei jedem Waschschrift mind. 1-2 Minuten einwirken lassen
- verbleibende Reste auf saugfähigen Papier abklopfen

Farbreaktion:

- **100 µl** der gut gemischten Substratlösung in die Vertiefungen pipettieren
 - 15 min. bei Raumtemperatur **abgedunkelt** inkubieren
- **100 µl** Stopplösung (vorher gut mischen) in jede Vertiefung pipettieren und gut mischen
 - Messung am Reader für ELISA bei 450 nm, innerhalb von 5 - 30 Minuten nach dem Abstoppen
 → [genaue Durchführung siehe Prüfmittelanweisung PA-SE-359](#)

5.3. Berechnung

erfolgt automatisch am Reader für ELISA (lineare Regression mit log-log Skalierung)

6. Interne Qualitätskontrolle

6.1. Kontrolle

Kontrolle wird bei jedem Ansatz mitgeführt

- Positiv Kontrolle (lyophilisiert) in der Packung enthalten
 → Kontrolle mit je 700 µl Waschpuffer auflösen, bei 4°C – 8°C 6 Wochen,
 bei -20°C 12 Wochen haltbar

6.2. Freigabe und Dokumentation der Ergebnisse

Nach Prüfung der Kontrolle erfolgt die Dokumentation der Ergebnisse auf der Arbeitsplatzliste und die manuelle Eingabe in die Labor-EDV (von 2. Mitarbeiter gegenlesen lassen). Die Ergebnisse von stark flüssigen Stühlen sind mit einem Freitext zu versehen.

6.3. Maßnahmen bei Abweichung

Kontrolle der Kitkomponenten visuell auf Kontamination oder Undichtigkeit.
 Neuer Testansatz ggf. mit neuem Reagenzkit.

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung M2PK im Stuhl	Dokument: SA-KL-M2PK Version: E Seite: 6/7
--	---	--

7. Beurteilung und Grenzen des Verfahrens

7.1. Angabe von Präzision und Richtigkeit

Siehe Packungsbeilage des Reagenzherstellers bzw. Unterlagen der Qualitätskontrolle.

7.2. Angabe von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenzen

Messbereich: 1 - 20 U/ml

7.3. Angabe von Linearität und Spezifikation

Siehe Packungsbeilage des Reagenzherstellers

7.4. Angaben zur Methodvalidierung

Siehe Packungsbeilage „Präzision“, Unterlagen der Qualitätskontrolle sowie Vergleichsmessungen

8. Ergebnisse und Befundbericht

8.1. Angabe des Ergebnisses (inkl. Einheiten)

M2-PK im Stuhl = U/ml

Werte unterhalb des Messbereichs werden als < 1 U/ml angegeben
 Werte oberhalb des Messbereichs werden als > 20 U/ml angegeben

8.2. Referenzbereiche

Cut-off: < 4 U/ml $\hat{=}$ negativ

9. Hinweise und Störungen

- Stark flüssige Stühle können zu falsch normalen Werten führen.
- Entzündungen können zu erhöhten Werten führen
- gründliches Durchmischen der Reagenzien ohne Schaumbildung.
- Mikrotiterstreifen im Folienbeutel mit Trockensubstanz aufbewahren
- Eine Kontamination des Wassers ist zu vermeiden.
- Nach dem Waschen verbleibende Wasserrückstände sind gründlich zu entfernen.

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung M2PK im Stuhl	Dokument: SA-KL-M2PK Version: E Seite: 7/7
--	---	--

10. Referenzen, Literatur

L. Thomas „Labor und Diagnose“ 8. Auflage 2012 S. 777 ff.

T. Arndt, A. M. Gessner „Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik“ 1.Band

11. Anlagen

Packungsbeilagen