

Arbeitsanleitung/Manual

# **$\alpha_1$ -Antitrypsin ELISA Kit**

Zur in vitro Bestimmung des  $\alpha_1$ -Antitrypsin in Stuhl

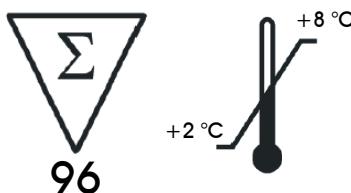
# **$\alpha_1$ -Antitrypsin ELISA Kit**

For the in vitro determination of  $\alpha_1$ -Antitrypsin in stool

Gültig ab/valid from 31.03.2011



K 6760



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.Immundiagnostik.com](http://www.Immundiagnostik.com)

## Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer  
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von  $\alpha_1$ -Antitrypsin in Stuhl geeignet. Nur zur in-vitro-Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Das  $\alpha_1$ -Antitrypsin stellt einen primären Inhibitor der Elastase von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) dar, welches bei inflammatorischen Prozessen freigesetzt wird um die proteolytische Aktivität der PMN-Elastase im Entzündungsbereich zu begrenzen. Des weiteren inhibiert es durch Komplexbildung unter anderem Proteinasen des Gerinnungssystems, Trypsin, Chymotrypsin etc. Das  $\alpha_1$ -Antitrypsin besitzt somit eine wichtige regulatorische bzw. antiinflammatorische Rolle.

Das  $\alpha_1$ -Antitrypsin ist ein lineares Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 52 kDa (394 Aminosäurereste), einem freien Cysteinrest und drei Kohlenhydratseitenketten. Es wird hauptsächlich in der Leber bzw. von intestinalen Makrophagen, Monozyten und Darmepithelzellen synthetisiert. Obwohl das  $\alpha_1$ -Antitrypsin den überwiegenden Anteil der Serinproteinase-inhibitoren im humanen Serum darstellt, gilt sein fäkaler Nachweis als Marker für den intestinalen Eiweißverlust und eine erhöhte Schleimhautpermeabilität, da es aufgrund seiner antiproteolytischen Aktivität nur einem geringen intestinalen Abbau unterliegt und nahezu unverändert im Stuhl ausgeschieden wird. Darüber hinaus wird die Bestimmung der fäkalen  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Konzentration zur Beurteilung der Aktivität chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen herangezogen. Neben der Messung der einfachen 24h- $\alpha_1$ -Antitrypsin-Ausscheidung in Stuhlproben hat sich auch die  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Clearance-Bestimmung (Quotient aus den  $\alpha_1$ -Antitrypsin-ELISA-Werten von Stuhl- und Serumproben) im klinischen Alltag durchgesetzt. So zeigte die Gruppe um J. S. Fordtran (Strygler et al. 1990), dass im Vergleich zur  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Clearance die alleinige Bestimmung der  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Stuhlkonzentration in 21% der Fälle ein falsch positives oder falsch negatives Ergebnis erbrachte.

Der von Immundiagnostik entwickelte  $\alpha_1$ -Antitrypsin-ELISA zeigte in einer Vergleichsstudie mit der bisher in der Routinediagnostik angewandten radialen Immundiffusion (RID) deutliche Vorteile bei der Analyse von Serum, Stuhl und Caco-2-Zellkulturüberständen (Faust et al. 2001):

- 1) Die im ELISA ermittelten α<sub>1</sub>-Antitrypsin-Konzentrationen lagen im Durchschnitt 30 % höher als die entsprechenden Werte der radialen Immundiffusion.
- 2) Das α<sub>1</sub>-Antitrypsin in den Zellkulturüberständen konnte nur mit dem ELISA-System nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass der α<sub>1</sub>-Antitrypsin-ELISA-Test wesentlich empfindlicher ist als andere gebräuchliche Methoden und dass er nicht nur **hepatische** sondern auch **enterale α<sub>1</sub>-Antitrypsin-Formen** erkennt. Der von uns entwickelte α<sub>1</sub>-Antitrypsin-ELISA stellt eine erfolgversprechende Alternative für die breite Routineanwendung dar. Besonders bei extrem hohen enteralen Eiweißverlusten ist er der radialen Immundiffusion deutlich überlegen. Die Kombination zweier spezifischer Antikörper in unserem α<sub>1</sub>-Antitrypsin-ELISA schließt die Möglichkeit falsch negativer Befunde weitgehend aus und gewährleistet damit eine zuverlässige Diagnostik.

## Indikationen

- Verdacht auf enteralen Eiweißverlust
- Morbus Crohn
- Nekrotisierende Enterokolitis
- Chronische mesenteriale Ischämie
- Virale, bakterielle, allergische, autoimmun-verursachte Entzündungen

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6760MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6760WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6760K	CONJ	Konjugat, (Schaf anti $\alpha$ -1-Antitrypsin, Peroxidase-markiert)	200 $\mu$ l
K 6760CAL	CAL	Kalibrator, gebrauchsfertig	1 vial
K 6760KO1	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 vial
K 6760KO2	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 vial
K 6760TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6760AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Die bei dem Test verwendete Kalibratorkurve wurde am WHO-Referenzpräparat CRM 470 kalibriert.

### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000  $\mu$ l
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrenchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

## 5. 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.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. **Die verdünnte Pufferlösung ist bei 2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Als **BLANK** (Leerwert) werden **100 µl** des vorbereiteten und 1:10 verdünnten Waschpuffer pipettiert.
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:100** in Waschpuffer verdünnt (100 µl CONJ + 9900 µl Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Der **CAL** (Kalibrator) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei 2-8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENVORBEREITUNG

### Stuhlprobenextraktion

Der **Waschpuffer** wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

1. Es wird ein Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 745 804)) verwendet, das 100 mg dosiert. In diesem Stuhlaufarbeitungssystem wird die Stuhlprobe in 5 ml Puffer suspendiert.

**Puffervolumen konstant: 5 ml**

**Verdünnungsfaktor konstant: 1:50**

2. Alternativ kann eine Stuhlprobe im Bereich von 80 - 120 mg eingewogen werden. Exakte Menge von jeder Probe notieren!

  - a. Jede einzelne Probe wird in 5 ml Puffer unabhängig von der eingewogenen Menge suspendiert.

**Puffervolumen konstant: 5 ml**

Der **Verdünnungsfaktor ändert sich** entsprechend der Einwaage. Er kann der folgenden Tabelle entnommen werden und muss bei der Auswertung berücksichtigt werden:

Einwaage [mg]	Verdünnungs- faktor
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
<b>100</b>	<b>50</b>

Einwaage [mg]	Verdünnungs- faktor
102	49.0
104	48.1
106	47.2
108	46.3
110	45.5
112	44.6
114	43.9
116	43.1
118	42.4
120	41.6

- b. **Die Puffermengen** für die einzelnen Proben variieren in Abhängigkeit von den Stuhleinwaagen (siehe Tabelle). Dabei bleibt der Verdünnungsfaktor konstant.

### Puffervolumen variabel

#### Verdünnungsfaktor konstant: 1:50

Somit kann der Verdünnungsfaktor für die Auswertung aller Proben einheitlich verwendet werden.

Einwaage [mg]	Puffervolumen [ml]
80	4.0
82	4.1
84	4.2
86	4.3
88	4.4
90	4.5
92	4.6
94	4.7
96	4.8
98	4.9
<b>100</b>	<b>5.0</b>

Einwaage [mg]	Puffervolumen [ml]
102	5.1
104	5.2
106	5.3
108	5.4
110	5.5
112	5.6
114	5.7
116	5.8
118	5.9
120	6.0

Anschließend wird die Stuhlprobe mit dem Puffer gut gemischt (z. B. Vortexer für mindestens 30 sec. je nach Stuhlkonsistenz).

Danach wird ca. 1 ml von der Suspension in ein verschließbares Einweggefäß (z. B. von Eppendorf) überführt und für 5 Minuten bei 13000 rpm ( $\geq 13000$  g) zentrifugiert.

**Die Stuhlsuspension ist nicht haltbar.** Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen.

## Probenverdünnung

### Stuhlproben

Der Überstand nach der Zentrifugation wird **1:500 mit Waschpuffer** verdünnt.

Zum Beispiel:

**40 µl** Überstand + **960 µl** Waschpuffer, mischen (**Verdünnung I**) (1:25)

**50 µl** Verdünnung I + **950 µl** Waschpuffer, mischen (**Verdünnung II**) (1:20)

**100 µl** der **Verdünnung II** werden im Test eingesetzt.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte polyklonale Antikörper, die humanes  **$\alpha$ -1-Antitrypsin** erkennen, verwendet.

Kalibrator, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf  $\alpha$ -1-Antitrypsin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen polyklonalen Kaninchen anti- $\alpha$ -1-Antitrypsin Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das  $\alpha$ -1-Antitrypsin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat, ein Peroxidase-markierter Schaf anti- $\alpha$ -1-Antitrypsin Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes  $\alpha$ -1-Antitrypsin – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem  $\alpha$ -1-Antitrypsin-Gehalt direkt proportional. Anhand eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Mustereichkurve lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

## Pipettierschema

1. Im Test dürfen nur **Reagenzien und Proben** verwendet werden, die **Raumtemperatur** (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen
2. **Positionen für BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE** (Leewert / Kalibrator / Kontrollen / Probe) in Doppelbestimmung im Protokollblatt **markieren**
3. Die **benötigten Mikrotiterstreifen** aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden
4. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschnitt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5. **100 µl für BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE** (Leewert / Kalibrator / Kontrollen / Probe) in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren
6. Streifen abdecken und **1 Stunde bei Raumtemperatur** (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
7. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschnitt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8. **100 µl CONJ** (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren

9. Streifen abdecken und **1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C)** unter Schütteln inkubieren
10. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen**. Nach dem letzten Waschschnitt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11. **100 µl SUB (Substrat)** in alle Vertiefungen pipettieren
12. **10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln** inkubieren\*
13. **50 µl STOP (Stopplösung)** in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
14. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden

\*Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

## 8. ERGEBNISSE

Für die Auswertung der Messwerte verwenden Sie bitte ein 4-parametrisches Logit-Log Model unter Verwendung der Angaben zu dem Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators (CAL), welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind.

Abhängig von der verwendeten Software kann der Kalibrationskurvenverlauf sowohl durch die Parameter A, B, C und D als auch durch die Wertepaare aus Konzentration und optischer Dichte der Standards beschrieben werden.

**Achtung:** Die Parameterwerte müssen genau eingegeben werden, da selbst geringe Abweichungen der Zahlenwerte zu massiven Störungen der Auswertung führen können.

Nach jeder Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

### Stuhlproben:

Die ermittelte α-1-Antitrypsin Konzentration der Stuhlprobe wird wie im folgenden Beispiel berechnet:

Einwaage:                    80 mg (1ml Stuhl = 1g) = 0,08 ml

Verdünnungsstufe I:        5ml / 0,08ml = 62,5

Verdünnungsstufe II:       500

Verdünnungsfaktor:        62,5 x 500 = 31250

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **31250** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln. **Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.**

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

**Stuhlproben** mit hohen  $\alpha$ -1-Antitrypsin Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit Waschpuffer stärker verdünnt und nochmals analysiert.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen einer oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

### Erwartete Ergebnisse

#### Normwerte

Cut off-Wert für Gesunde (Stuhl):  $< 26,8 \text{ mg/dl}$

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Präzision und Reproduzierbarkeit

#### Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Meßserie wurde geprüft. Eine Normalprobe und eine pathologische Probe wurden 20 mal in einem  $\alpha$ -1-Antitrypsin ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 20

Probe	$\alpha$ -1-Antitrypsin Mittelwert [mg/dl]	Intra-Assay Vk [%]
1	15.2	4.5
2	42.4	13.1

## Inter-Assay-Variation

Es wurde die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen geprüft. Eine Normalprobe und eine pathologische Probe wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im  $\alpha_1$ -Antitrypsin ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 20

Probe	$\alpha_1$ -Antitrypsin Mittelwert [mg/dl]	Inter-Assay V <sub>k</sub> [%]
1	16.15	9.8
2	54.46	14.8

## Wiederfindung

Verschiedene  $\alpha_1$ -Antitrypsin Proben wurden mit unterschiedlichen Spikes gemessen.

Wiederfindung n=4

Probe [ $\mu$ g/l]	Spike [ $\mu$ g/l]	$\alpha_1$ -Antitrypsin erwartet [ $\mu$ g/l]	$\alpha_1$ -Antitrypsin Gemessen [ $\mu$ g/l]
6.3	1.65	7.95	7.2
6.3	5	11.3	11.4
6.3	15	21.3	20.9
6.3	45	51.3	46.7
5.6	1.65	7.3	7.0
5.6	5	10.6	10.9
5.6	15	20.6	17.5
5.6	45	50.6	46.7

## Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als  $B_0 + 2 \text{ SD}$  festgelegt. Gemessen wurde 20 mal der Standard Null.

n= 20

Probe	$\alpha_1$ -Antitrypsin Mittelwert [OD]	Standardab- weichung	Nachweis- grenze [mg/dl]
1	0.117	0.015	1.8

## Linearität

Zwei Proben mit bekannter  $\alpha_1$ -Antitrypsin Konzentration wurden seriell verdünnt und vermessen. Gegenübergestellt sind die erwartete (berechnete) und die gemessene  $\alpha_1$ -Antitrypsin Konzentration.

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [mg/dl]	Gemessen [mg/dl]
A	1:12500	48	48.88
	1:25000	24.5	23.25
	1:50000	12.3	11.9
	1:100000	6.1	6
B	1:12500	158.4	158.4
	1:25000	79.3	99
	1:50000	39.6	33
	1:100000	19.8	22.1

## Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen im Stuhl gefunden.

Es wurde keine Kreuzreaktivität mit Alpha-1-Antitrypsin im Mausserum gefunden.

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur in vitro Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. 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 ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden.  $H_2SO_4$  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.

## 13. 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.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien sollte vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- 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 Pipettievolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG 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 Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

## 15. LITERATUR

1. Arndt et al., 1993, Crohn; Klin. Lab. **11**: 867-876
2. Stein, J., 1996, 3. Post-graduiertenkurs der DGVS
3. Arndt et al., 1992, The Lancet, Vol **340**: OCT, 24
4. Karbach et al., 1989, Gastroenterol. **27**: 362
5. Strygler B et al., 1990, Gastroenterol. **99**(5):1380-7
6. Faust D et al., 2001, Gastroenterol. **39**(9):769-74
7. Faust D et al., 2002, Clin Exp Immunol. **128**(2):279-84

### **Verwendete Symbole:**



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für &lt;n&gt; Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Nur für Forschungszwecke

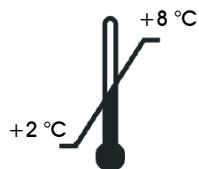
# $\alpha_1$ -Antitrypsin ELISA KIT

For the in vitro determination of  $\alpha_1$ -Antitrypsin in stool

Valid from 31.03.2011



K 6760



## 1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of  $\alpha_1$ -Antitrypsin in stool. It is for in vitro diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

The  $\alpha_1$ -antitrypsin acts as a primary inhibitor of elastase from polymorph nuclear neutrophilic granulocytes (PMN) and is released during inflammatory processes in order to reduce the proteolytic activity of the PMN-elastase in the inflammation region. In addition, it inhibits via complex formation a series of serine proteinases, like blood-clotting proteinases, trypsin, chymotrypsin, etc. Thus, the  $\alpha_1$ -antitrypsin plays an important regulatory as well as anti-inflammatory role.

The  $\alpha_1$ -antitrypsin is a linear glycoprotein with a molecular weight of ca. 52 kDa (394 amino acid residues), a free cysteine residue and three carbohydrate side chains. It is predominantly synthesized in the liver but also by intestinal macrophages, monocytes and epithelial cells. Although  $\alpha_1$ -antitrypsin is the main serine proteinase inhibitor in human plasma, the proof of fecal  $\alpha_1$ -antitrypsin has become an important marker for intestinal protein loss and permeability, as it is able to resist degradation in the gut due to its anti-proteolytic activity. It will therefore stay intact and it is possible to detect it in the faeces using an immunoassay. Moreover, the measurement of fecal  $\alpha_1$ -antitrypsin-concentration is used to evaluate and monitor chronic inflammatory intestinal diseases. In the clinical routine, the  $\alpha_1$ -antitrypsin-clearance (ratio of the  $\alpha_1$ -antitrypsin-ELISA-values of stool and serum samples) has been established along with the sole determination of the 24h- $\alpha_1$ -antitrypsin-secretion in stool. Thus, the group of J. S. Fordtran (Strygler et al. 1990) reports, that the sole determination of the  $\alpha_1$ -antitrypsin-concentration in stool yielded false positive or false negative results in 21% of the patients compared to the  $\alpha_1$ -antitrypsin-clearance-measurements.

In a comparative study with the radial immunodiffusion (RID), routinely used in the clinical diagnostics, the  $\alpha_1$ -antitrypsin-ELISA developed by Immundiagnostik demonstrated significant advantages in the analysis of serum, stool and Caco-2-cell culture supernatants (Faust et al. 2001):

- 1) The  $\alpha_1$ -antitrypsin-concentrations obtained by the ELISA were on average about 30 % higher than the corresponding values from the radial immunodiffusion measurements.

- 2) Only the ELISA-system detected  $\alpha_1$ -antitrypsin in the cell culture supernatants.

The results clearly demonstrate that our  $\alpha_1$ -antitrypsin-ELISA-test is more sensitive than other routinely used methods and that it **recognizes the hepatic as well as the enteral  $\alpha_1$ -antitrypsin form**. This newly developed test represents a promising alternative to the use of current clinical routine methods. It is superior to the radial immundiffusion especially in cases with extremely high protein loss through the gut. The combination of two specific antibodies eliminates to a large extent the possibility of false negative results guaranteeing reliable diagnoses. This newly developed test is a non-invasive, simple test for the detection of protein loss through the gut.

## Indications

- Enteric protein loss and intestinal permeability
- Morbus Crohn
- Necrotic enterocolitis
- Viral, bacterial or allergic inflammation

### 3. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 6760MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6760WB	WASHBUF	ELISA wash concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6760K	CONJ	Conjugate, (sheep anti $\alpha$ -1-antitrypsin, peroxidase-labelled)	200 $\mu$ l
K 6760CAL	CAL	Calibrator, ready-to-use	1 vial
K 6760KO1	CTRL	Control, ready-to-use	1 vial
K 6760KO2	CTRL	Control, ready-to-use	1 vial
K 6760TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 6760AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

The used calibrator was calibrated on the WHO reference material CRM 470.

### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000  $\mu$ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm  
(reference wave length 620 or 690 nm)

## 5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C using a water bath before dilution. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- Use **100 µl of diluted wash buffer as a BLANK.** Pipette into the respective well.
- The **CAL** (calibrator) and the **CTRL** (controls) are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label.
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1: 100** in wash buffer (100 µl CONJ + 9900 µl wash buffer). The undiluted conjugate is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C.**

## 6. SAMPLE PREPARATION

### Extraction of the stool sample

The **wash buffer** is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

1. We recommend the use of a stool sample preparation kit for dosing 100 mg of stool sample (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; cat # 745804). The stool sample has to be suspended in 5 ml buffer.

**Constant buffer volume: 5 ml**

**Constant dilution factor: 1:50**

2. Alternatively, stool samples can be manually weighted within the range of 80 – 120 mg. Please note the exact sample amount!
  - a. Add **5 ml** buffer to the stool sample not depending on the sample amount.

**Constant buffer volume: 5 ml**

**The dilution factor varies** depending on the sample amount which has to be considered in the subsequent calculations as shown below:

Weight [mg]	Dilution factor
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
<b>100</b>	<b>50</b>

Weight [mg]	Dilution factor
102	49.0
104	48.1
106	47.2
108	46.3
110	45.5
112	44.6
114	43.9
116	43.1
118	42.4
120	41.6

b. The buffer volume for the individual samples varies depending on the sample amount (see table). The dilution factor remains constant.

#### Variable buffer volume

#### Constant dilution factor: 1:50

Therefore, the same dilution factor can be used for all samples in the subsequent evaluation of the results.

Weight [mg]	Buffer Volume [ml]
80	4.0
82	4.1
84	4.2
86	4.3
88	4.4
90	4.5
92	4.6
94	4.7
96	4.8
98	4.9
<b>100</b>	<b>5.0</b>

Weight [mg]	Buffer Volume [ml]
102	5.1
104	5.2
106	5.3
108	5.4
110	5.5
112	5.6
114	5.7
116	5.8
118	5.9
<b>120</b>	<b>6.0</b>

Afterwards, mix stool sample and buffer; vortex for at least 30 sec. depending on the stool consistency.

Transfer approx. 1 ml stool suspension to an Eppendorf-tube and centrifuge for 5 minutes at 13000 rpm ( $\geq 13000$  g).

**The supernatant is not stable and can not be stored.** We recommend to weight fresh sample amount for a new assay, if the analysis should be repeated.

## Dilution of samples

### Stool samples

The supernatant is centrifuged at 13.000 rpm for 2 min. and diluted **1:500 in wash buffer**.

For example:

**40 µl** supernatant + **960 µl** wash buffer, mix well (**dilution I**) (1:25)

**50 µl** of this dilution I + **950 µl** wash buffer, mix well (**dilution II**) (1:20)

For analysis, pipette **100 µl** of the supernatant of **dilution step II** per well.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### Principle of the test

The assay utilizes the "sandwich" technique with two selected polyclonal antibodies that bind to human  $\alpha$ -1-antitrypsin.

Calibrator, controls and prediluted samples which are assayed for human  $\alpha$ -1-antitrypsin are added into the wells of a micro plate coated with a high affine polyclonal anti-human  $\alpha$ -1-antitrypsin antibody. During the first incubation step,  $\alpha$ -1-antitrypsin is bound by the immobilized antibody. Then a peroxidase-conjugated polyclonal anti-human  $\alpha$ -1-antitrypsin antibody is added into each microtiter well and a "sandwich" of capture antibody - human  $\alpha$ -1-antitrypsin – peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of  $\alpha$ -1-antitrypsin. Samples are quantified by referring their optical density to a Lot-dependant master calibration curve and the use of a Calibrator that is run with each test.

## Test procedure

1. Prior to use in the assay allow all **reagents and samples** to come to **room temperature** (18-26 °C) and mix well
2. Mark the **positions of BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE** (Blank / Calibrator / Controls/ Sample) in duplicate on a protocol sheet
3. **Take microtiter strips** out of the kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
4. Wash each well **5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer** into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
5. Add **100 µl of BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE** (Blank / Calibrator / Controls / Sample) in duplicate into respective well
6. Cover the plate tightly and incubate for **1 hour at room temperature** (18-26°C) on a horizontal mixer
7. Discard the contents of each well. Wash **5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer** into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
8. Add **100 µl CONJ** (conjugate) into each well
9. Cover the plate tightly and incubate for **1 hour at room temperature** (18-26°C) on a horizontal mixer

10. Discard the contents of each well. Wash **5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer** into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
11. Add **100 µl of SUB** (substrate) into each well
12. Incubate for **10 - 20 minutes at room temperature (18-26°C)** in the dark\*
13. Add **50 µl of STOP** (stop solution) into each well, mix thoroughly
14. Determine **absorption** immediately with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference

\*The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend to observe the colour change and to stop the reaction upon good differentiation.

## 8. RESULTS

For result evaluation, please use a four parametric logit-log model based on the standard curve of the respective kit lot and the Calibrator value (CAL). All essential information on the standard curve is provided on the QC data sheet of the respective product lot.

The calibration curve can be expressed either by the concentration of each standard with its corresponding optical density or by the four parameters A, B, C and D. In both cases the optical density of the calibrator (CAL) is essential.

Depending on your evaluation software program, either the one or the other kind of data described above should be entered.

**Caution:** Please make sure that all parameters and values are transferred accurately into your software as minor deviations can cause severe errors during evaluation.

The plausibility of replicate values should always be examined after automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the replicate values should be done manually by the operator.

### Stool samples

To obtain the  $\alpha$ -1-antitrypsin concentration in stool samples, use the corresponding dilution factor according to the sample preparation:

For the  $\alpha$ -1-Antitrypsin concentration of fecal samples, calculate as described in the following example:

weight:                    80 mg (1ml stool = 1g) = 0,08 ml

dilution step 1:            5ml / 0,08ml = 62,5

dilution step 2:            500

dilution factor:            62,5 x500 = 31250

Multiply the result with **31250** to get the real concentration. **The dilution factor dependents on the weight of the faeces.**

## 9. LIMITATIONS

**Stool samples** with  $\alpha$ -1-antitrypsin concentration greater than the highest standard value should be further diluted with wash buffer and re-assayed.

## 10. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

### Expected values

Cut off-value for healthy people (Stool): < 26,8 mg/dl

The cut off-value should be used as a guideline only. It is recommended that each laboratory establishes its own cut off-value for its patient population.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Precision and reproducibility

#### Intra-Assay-Variation

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik  $\alpha$ -1-Antitrypsin ELISA test was calculated from 20 replicate determinations on each one of two samples.

Intra-Assay CV n= 20

Sample	$\alpha$ -1-Antitrypsin mean value [mg/dl]	Intra-Assay CV [%]
1	15,2	4,5
2	42,2	13,1

## Inter-Assay-Variation

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik  $\alpha_1$ -Antitrypsin ELISA test was calculated from data on 2 samples obtained in 20 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of three months.

Inter-Assay CV n= 20

Sample	$\alpha_1$ -Antitrypsin mean value [mg/dl]	Inter-Assay CV [%]
1	16,15	9,8
2	54,46	14,8

## Recovery

Two samples were spiked with different  $\alpha_1$ -antitrypsin calibrator amounts and measured with the assay.

Recovery n=4

Sample [ $\mu$ g/l]	Spike [ $\mu$ g/l]	$\alpha_1$ -Antitrypsin expected [ $\mu$ g/l]	$\alpha_1$ -Antitrypsin measured [ $\mu$ g/l]
6.3	1.65	7.95	7.2
6.3	5	11.3	11.4
6.3	15	21.3	20.9
6.3	45	51.3	46.7
5.6	1.65	7.3	7.0
5.6	5	10.6	10.9
5.6	15	20.6	17.5
5.6	45	50.6	46.7

## Sensitivity

The sensitivity limit was set as  $B_0 + 2 \text{ SD}$ . The Zero-standard was measured 20 times.

n=20

Sample	$\alpha_1$ -Antitrypsin mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [mg/dl]
1	0,117	0,015	1,8

## Linearity

Two patient serum samples were diluted with wash buffer. The results are shown below:

n= 2

Sample	Dilution	Expected [mg/dl]	Measured [mg/dl]
A	1:12500	48	48.88
	1:25000	24.5	23.25
	1:50000	12.3	11.9
	1:100000	6.1	6
B	1:12500	158.4	158.4
	1:25000	79.3	99
	1:50000	39.6	33
	1:100000	19.8	22.1

## Cross reactivity

No cross reactivity with other plasma proteins in stool was observed.

No cross reactivity with alpha-1-antitrypsin in mouse serum was observed.

## 12. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulphuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

## 13. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

## 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for in vitro diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

## 15. REFERENCES

1. Arndt et al., 1993, Crohn; Klin. Lab. **11**: 867-876
2. Stein, J., 1996, 3. Post-graduiertenkurs der DGVS
3. Arndt et al., 1992, The Lancet, Vol **340**: OCT, 24
4. Karbach et al., 1989, Gastroenterol. **27**: 362
5. Strygler B et al., 1990, Gastroenterol. **99**(5):1380-7
6. Faust D et al., 2001, Gastroenterol. **39**(9):769-74
7. Faust D et al., 2002, Clin Exp Immunol. **128**(2):279-84

### Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for &lt;n&gt; tests



Manufacturer



Use by



Lot number



For research use only