

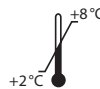
# $\alpha_1$ -Antitrypsin Clearance ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von  
 $\alpha_1$ -Antitrypsin in Serum, Plasma und Stuhl*

*For the in vitro determination of  
 $\alpha_1$ -antitrypsin in serum, plasma and stool*

Gültig ab / Valid from 2015-08-03

**REF** K 6752



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

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

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>3</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>4</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>5</b>
<i>Lagerung</i>	5
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<i>Probenverdünnung</i>	7
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>8</b>
<i>Testprinzip</i>	8
<i>Pipettierschema</i>	8
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>9</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>11</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>11</b>
<i>Referenzwerte</i>	11
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>11</b>
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Spezifität</i>	12
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	12
<i>Spike-Wiederfindung</i>	12
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	13
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>13</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>14</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>14</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>15</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

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

## 2. EINLEITUNG

Der enterale Eiweißverlust ist eine ernstzunehmende Folge verschiedener systemischer oder lokaler gastrointestinaler Erkrankungen. Diese führen durch Beeinträchtigung der Darmschleimhautintegrität (z. B. durch Allergien, Entzündungen, bösartige Veränderungen) oder durch Lymphstauung im Bereich des Darmes zu einem vermehrten Übertritt von Plasmaproteinen in das Darmlumen. In der Folge kann es zu einer Hypoproteinämie begleitet von Ödemen kommen. Die Diagnose wird durch den Ausschluss anderer Proteinverlustquellen und den Nachweis erhöhter  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Konzentrationen im Stuhl gesichert.

Im Serum macht  $\alpha_1$ -Antitrypsin den Großteil der Serinproteasen-Inhibitoren aus und schützt das Gewebe bei Entzündungsreaktionen vor Schäden durch Proteasen. Es wird hauptsächlich von der Leber synthetisiert, zu einem kleinen Teil aber auch von intestinalen Makrophagen, Monozyten und Darmepithelzellen. Da  $\alpha_1$ -Antitrypsin relativ resistent gegen Abbau durch Verdauungsenzyme ist, wird es fast unverändert im Stuhl ausgeschieden. Der Nachweis von  $\alpha_1$ -Antitrypsin ist daher ein anerkannter Marker für den intestinalen Eiweißverlust und erhöhte Schleimhautpermeabilität.

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, 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 (Strygler et al. 1990).

Der von Immundiagnostik entwickelte  $\alpha_1$ -Antitrypsin-ELISA übertrifft bei der Analyse von Serum, Stuhl und Zellkulturüberständen die bisher angewandte Radialen Immundiffusion (RID) deutlich. Im direkten Vergleich waren die im ELISA ermittelten  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Werte im Durchschnitt 30% höher als die entsprechenden Werte der RID. Zellkulturüberstände einer Darmzelllinie waren im RID negativ, ebenso die Stuhlproben von mehreren Patienten mit lymphatischer Obstruktion. Der ELISA konnte in allen diesen Proben  $\alpha_1$ -Antitrypsin nachweisen, zum Teil sogar in sehr hoher Konzentration (Faust et al. 2001).

Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass der  $\alpha_1$ -Antitrypsin-ELISA wesentlich sensibler ist als andere gebräuchliche Methoden und dass er nicht nur hepatische, son-

dern auch enterale  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Formen erkennen kann. Besonders bei extrem hohen enteralen Eiweißverlusten ist er der radialen Immundiffusion deutlich überlegen. Die Kombination von zwei spezifischen Antikörpern in unserem  $\alpha_1$ -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 oder autoimmun-verursachte Darmentzündungen

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6752	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6752	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6752	CONJ	Konjugat, (Ziege-anti- $\alpha_1$ -Antitrypsin, Peroxidase-markiert)	200 $\mu$ l
K 6752	STD	Standards, lyophilisiert* (0; 3.3; 10; 30; 90 $\mu$ g/l)	2 x 5 vials
K 6752	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 6752	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 6752	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6752	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6752	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x	2 x 100 ml
K 6752	SAMPLEBUF	Probenpuffer, gebrauchsfertig	2 x 70 ml

\* Die verwendeten Standards wurden am WHO-Referenzpräparat CRM 470 kalibriert.

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000  $\mu$ l
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

\* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln  $> 0,2 \mu\text{m}$ ) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von  $0,055 \mu\text{S/cm}$  bei  $25^\circ\text{C}$  ( $\geq 18,2 \text{M}\Omega\text{cm}$ ).

#### 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits 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 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100  $\mu$ l** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  auf. Der **WASHBUF** kann bei **2–8  $^\circ\text{C}$**  bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8  $^\circ\text{C}$  einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat *IDK Extract*<sup>®</sup>** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml *IDK Extract*<sup>®</sup> + 150 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  auf. Das ***IDK Extract*<sup>®</sup>** kann bei **2–8  $^\circ\text{C}$**  bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt wer-

den. Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) ist bei **2–8 °C drei Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- **Die lyophilisierten STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards und Kontrollen werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können 4 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat (1:101 verdünntes CONJ) ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### Lagerung

#### Stuhlproben

Die Probenstabilität ist wie folgt:

**Rohstuhl:** über Nacht bei Raumtemperatur, 3 Tage bei 2–8 °C oder mindestens 4 Wochen bei -20 °C

**Stuhlextrakt:** 9 Tage bei Raumtemperatur, 2–8 °C oder -20 °C, maximal 3 Einfrier-/Auftauzyklen

#### Serum- und Plasmaproben

Frisch abgenommenes Blut sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden. Es kann entweder am gleichen Tag im Test eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test sollten die Proben gut gemischt werden.

### Stuhlprobenextraktion

Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

## Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

### **Stuhlröhrchen - Anwendung**

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

#### **SAS mit 1,5 ml Puffer:**

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	1,5 ml
Verdünnungsfaktor:	1:100

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer *IDK Extract®* **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (orangefarbenes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstecken in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) Das Röhrchen solange mischen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres „Einweichen“ (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.



**Verdünnung I**                      **1:100***Probenverdünnung***Stuhlproben**

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:250 mit Waschpuffer** weiterverdünnt. Zum Beispiel:

- **20  $\mu$ l** Verdünnung I + **980  $\mu$ l** Waschpuffer (mischen) = **Verdünnung II** (1:50)
- **200  $\mu$ l** Verdünnung II + **800  $\mu$ l** Waschpuffer (mischen) = **Verdünnung III** (1:5)
- **Endverdünnung: 1:25 000**

**100  $\mu$ l** der **Verdünnung III** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

**Plasma- und Serumproben**

Serum- und Plasmaproben werden bei Normalpatienten **1:40 000** verdünnt. Patientenproben (Morbus Crohn etc.) mit hohen  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Konzentrationen werden **1:250 000** und **1:1 000 000** verdünnt im Assay eingesetzt. Zur Berechnung der  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Konzentration muss der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

**1:40 000 Verdünnung**

zum Beispiel:

- **10  $\mu$ l** Serum/Plasma + **990  $\mu$ l** SAMPLEBUF (Probenpuffer), mischen = **Verdünnung Ia** (1:100)
- **100  $\mu$ l** Verdünnung Ia + **900  $\mu$ l** SAMPLEBUF (Probenpuffer), mischen = **Verdünnung IIa** (1:10)
- **25  $\mu$ l** Verdünnung IIa + **975  $\mu$ l** SAMPLEBUF (Probenpuffer), mischen = **Verdünnung IIIa** (1:40).  
Diese entspricht nun einer **Gesamtverdünnung von 1:40 000**.

**1:250 000 Verdünnung**

zum Beispiel:

- **10  $\mu$ l** Serum/Plasma + **990  $\mu$ l** SAMPLEBUF (Probenpuffer), mischen = **Verdünnung Ib** (1:100)
- **10  $\mu$ l** Verdünnung Ia + **990  $\mu$ l** SAMPLEBUF (Probenpuffer), mischen = **Verdünnung IIb** (1:100)
- **20  $\mu$ l** Verdünnung IIa + **480  $\mu$ l** SAMPLEBUF (Probenpuffer), mischen = **Verdünnung IIIb** (1:25).  
Diese entspricht nun einer **Gesamtverdünnung von 1:250 000**.

**100  $\mu$ l** der jeweils letzten Verdünnung (IIIa/IIIb) 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.

Standards, Kontrollen und verdünnte Proben, die auf  $\alpha_1$ -Antitrypsin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen polyklonalen 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 peroxidasemarkierter 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 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 einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### Pipettierschema

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Die benötigten **Mikrotiterstreifen** aus dem Kit nehmen, nicht verwendete können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Die Positionen für STD (Standard) SAMPLE (Probe) CTRL (Kontrollen) im **Protokollblatt** markieren.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen <b>5x mit je 250 <math>\mu</math>l Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	<b>100 <math>\mu</math>l STD</b> (Standard), <b>SAMPLE</b> (Probe) und <b>CTRL</b> (Kontrollen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.

3.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30°C) unter <b>Schütteln</b> inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 <math>\mu</math>l Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	<b>100 <math>\mu</math>l Konjugat</b> in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30°C) unter <b>Schütteln</b> inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 <math>\mu</math>l Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	<b>100 <math>\mu</math>l SUB</b> (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	<b>10–20 Minuten</b> bei Raumtemperatur (15–30°C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren*.
10.	<b>100 <math>\mu</math>l STOP</b> (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
11.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> 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

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

### 1. 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. 0,001).

## 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

## 3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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.

### Stuhlproben

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit dem Verdünnungsfaktor **25 000** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

### Serum- und Plasmaproben

Die ermittelte  $\alpha_1$ -Antitrypsin Konzentration wird mit **40 000** bzw. **250 000** und jeweils **zusätzlich mit dem Faktor 3** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

### Clearance-Quotient

Die Berechnung des  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Quotienten erfolgt mittels der nachfolgenden Formel:

$$\text{Quotient (ml/Tag)} = (V * F) / S$$

V = Stuhlvolumen (ml/Tag) im Mittel über 3 Tage (1 ml Stuhl = 1 g)

F = Mittlere fäkale Konzentration von  $\alpha_1$ -Antitrypsin über 3 Tage, aus der Kalibrierkurve abgelesen und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert (Einheit:  $\mu\text{g/l}$ , bzw.  $\text{mg/dl}$ )

S = mittlere Serum-Konzentration von  $\alpha_1$ -Antitrypsin über 3 Tage, aus der Kalibrierkurve abgelesen und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert (Einheit:  $\mu\text{g/l}$ , bzw.  $\text{mg/dl}$ )

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*höchste Konzentration der Standardkurve  $\times$  anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*Nachweisgrenze  $\times$  anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

### Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie von augenscheinlich Gesunden (n = 76) wurde folgender Referenzbereich ermittelt:

**Cut-off-Wert für Gesunde (Stuhl):** < 26,8 mg/dl

**Intestinale  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Clearance:** < 27,5 ml/Tag

**$\alpha_1$ -Antitrypsin-Konzentration Erwachsene (Serum und Plasma): 90–180 mg/dl\***

\* L. Thomas; 5. Auflage, Labor und Diagnose

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 + 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 1,8 mg/dl.

### Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen im Stuhl gefunden.

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

### Präzision und Reproduzierbarkeit

#### Intra-Assay (n = 20)

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.

Probe	$\alpha_1$ -Antitrypsin [mg/dl]	VK [%]
1	15,2	4,5
2	42,4	13,1

#### Inter-Assay (n = 14)

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.

Probe	$\alpha_1$ -Antitrypsin [mg/dl]	VK [%]
1	16,15	9,8
2	54,46	14,8

### Spike-Wiederfindung

Verschiedene  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Proben wurden mit unterschiedlichen Spikes gemessen (n = 4).

Probe	Ungespikte Probe [ $\mu\text{g/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{g/l}$ ]	$\alpha_1$ -Antitrypsin erwartet [ $\mu\text{g/l}$ ]	$\alpha_1$ -Antitrypsin gemessen [ $\mu\text{g/l}$ ]
A	6,3	1,65	7,95	7,2
		5,0	11,3	11,4
		15,0	21,3	20,9
		45,0	51,3	46,7

Probe	Ungespikete Probe [ $\mu\text{g/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{g/l}$ ]	$\alpha_1$ -Antitrypsin erwartet [ $\mu\text{g/l}$ ]	$\alpha_1$ -Antitrypsin gemessen [ $\mu\text{g/l}$ ]
B	5,6	1,65	7,3	7,0
		5,0	10,6	10,9
		15,0	20,6	17,5
		45,0	50,6	46,7

### Wiederfindung in der Verdünnung

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	$\alpha_1$ -Antitrypsin erwartet [ $\text{mg/dl}$ ]	$\alpha_1$ -Antitrypsin gemessen [ $\text{mg/dl}$ ]
A	1:12500	48,0	48,88
	1:25000	24,5	23,25
	1:50000	12,3	11,9
	1:100000	6,1	6,0
B	1:12500	158,4	158,4
	1:25000	79,3	99,0
	1:50000	39,6	33,0
	1:100000	19,8	22,1

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet 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 zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. 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 benutzt 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 Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen 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.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigegeführten Arbeitsanleitung durchzuführen.

### 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.



- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina 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, zurückzusenden.









## 15. LITERATUR

1. Amarri, S. et al., 2006. Changes of gut microbiota and immune markers during the complementary feeding period in healthy breast-fed infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **42**(5), pp.488–95.
2. Faust, D et al., 2001. Determination of alpha1-proteinase inhibitor by a new enzyme linked immunosorbant assay in feces, serum and an enterocyte-like cell line. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, **39**(9), pp.769–74.
3. Faust, D. et al., 2002. Regulation of alpha1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells. *Clinical and experimental immunology*, **128**(2), pp.279–84.
4. Hsu, P.-I. et al., 2010. Diagnosis of gastric malignancy using gastric juice alpha1-antitrypsin. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, **19**(2), pp.405–11.
5. Lamprecht, M. et al., 2012. Probiotic supplementation affects markers of intestinal barrier, oxidation, and inflammation in trained men; a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, **9**(1), p.45.
6. Muss, C., Schütz, B. & Kirkamm, R., 2002. Alpha1-Antitrypsin - ein objektiver Verlaufsparemeter bei entzündlichen Darmerkrankungen. *Ärztzeitschrift für Naturheilverfahren*, **43**(4).
7. Oswari, H. et al., 2013. Comparison of stool microbiota compositions, stool alpha1-antitrypsin and calprotectin concentrations, and diarrhoeal morbidity of Indonesian infants fed breast milk or probiotic/prebiotic-supplemented formula. *Journal of paediatrics and child health*, Epub ahead of print.
8. Quint, J.K. et al., 2011. SERPINA1 11478G>A variant, serum  $\alpha_1$ -antitrypsin, exacerbation frequency and FEV1 decline in COPD. *Thorax*, **66**(5), pp.418–24.
9. Ragab, H.M. et al., 2009. Clinical utility of serum TNF alpha and alpha-1 anti-trypp-

sin in predicting the stage and progression of lung cancer. *International Journal of Integrative Biology*, **7**(1), pp.45–52.

10. Roeckel, N. et al., 2009. High frequency of LMAN1 abnormalities in colorectal tumors with microsatellite instability. *Cancer research*, **69**(1), pp.292–9.
11. Strygler, B. et al., 1990.  $\alpha_1$ -Antitrypsin Excretion in Stool in Normal Subjects and in Patients With Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology*, **99**(5), pp.1380–1387.
12. Török, E. et al., 2011. Primary human hepatocytes on biodegradable poly(l-lactic acid) matrices: a promising model for improving transplantation efficiency with tissue engineering. *Liver transplantation*, **17**(2), pp.104–14.

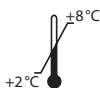
### Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis

# $\alpha_1$ -Antitrypsin Clearance ELISA

*For the in vitro determination of  
 $\alpha_1$ -antitrypsin in serum, plasma and stool*

Valid from 2015-08-03



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

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)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>19</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>20</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>20</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>21</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>22</b>
<i>Storage</i>	22
<i>Extraction of the stool samples</i>	22
<i>Dilution of samples</i>	23
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>24</b>
<i>Principle of the test</i>	24
<i>Test procedure</i>	25
<b>8. RESULTS</b>	<b>26</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>27</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>27</b>
<i>Reference range</i>	28
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>28</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	28
<i>Analytical Sensitivity</i>	28
<i>Spiking Recovery</i>	29
<i>Dilution recovery</i>	29
<i>Specificity</i>	29
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>30</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>30</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>30</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>31</b>

## 1. INTENDED USE

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

## 2. INTRODUCTION

Intestinal protein loss is a serious consequence of various systemic or local gastro-intestinal diseases (e.g. allergies, chronic inflammation, malignancies). These pathologies damage the mucosal integrity and/or cause lymphostasis, thereby leading to an increased transfer of plasma proteins into the bowel lumen. Subsequently, hypoproteinemia accompanied with edema may develop. This condition is diagnosed by exclusion of other sources of protein loss and by proof of an elevated  $\alpha_1$ -antitrypsin concentration in stool.

In serum,  $\alpha_1$ -antitrypsin represents the majority of serine protease inhibitors and protects tissues from protease damages during inflammation. The protein is synthesized primarily in the liver but also to a small extent in intestinal macrophages, monocytes, and intestinal epithelial cells. Since  $\alpha_1$ -antitrypsin is relatively resistant against enzymatic digestion, the secreted amount in stool reflects the internal concentration of the protein. An elevated  $\alpha_1$ -antitrypsin stool concentration is therefore a widely recognized marker for intestinal protein loss and for an increased mucosal permeability.

In 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 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 measurement (Strygler et al. 1990).

The analytical quality of Immundiagnostik's  $\alpha_1$ -antitrypsin ELISA surpasses by far the conventional radial immunodiffusion (RID) technique in the determination of serum, stool and tissue culture supernatants. In direct comparison, the concentrations measured with the ELISA were approximately 30% above the corresponding RID levels. Cell culture supernatants of an intestinal cell line as well as fecal samples of lymphostasis patients yielded negative results with RID. Our ELISA could detect  $\alpha_1$ -antitrypsin in all of these samples, in some of them even in very high concentrations.

These results clearly prove that the  $\alpha_1$ -antitrypsin ELISA is far more sensitive than the conventional method and that it recognizes not only hepatic but also enteral  $\alpha_1$ -antitrypsin. The discrepancy of both methods and hence the superiority of the ELISA to RID is especially striking in the analysis of extremely high enteral protein losses. The combination of two specific antibodies in our  $\alpha_1$ -antitrypsin ELISA widely exclu-

des the possibility of false negative results thereby enabling a reliable diagnostics of enteral protein loss.

### Indications

- Suspected enteric protein loss
- Crohn's disease
- Necrotic enterocolitis
- Chronic mesenterial ischemia
- Viral, bacterial, allergic, or autoimmune-induced gastrointestinal inflammation

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6752	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6752	WASHBUF	ELISA wash concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6752	CONJ	Conjugate, (goat-anti- $\alpha_1$ -antitrypsin, peroxidase-labeled)	200 $\mu$ l
K 6752	STD	Standards, lyophilised (0; 3.3; 10; 30; 90 $\mu$ g/l)*	2 x 5 vials
K 6752	CTRL	Control, lyophilised	2 x 1 vial
K 6752	CTRL	Control, lyophilised	2 x 1 vial
K 6752	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 6752	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml
K 6752	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract</i> ® 2.5x	2 x 100 ml
K 6752	SAMPLEBUF	Sample buffer, ready to use	2 x 70 ml

\* The used standards have been calibrated on the WHO reference material CRM 470.

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

## 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water\*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000  $\mu$ l tips

- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

\* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2  $\mu\text{m}$ ) with an electrical conductivity of 0.055  $\mu\text{S}/\text{cm}$  at 25 °C ( $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ ).

## 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100  $\mu\text{l}$**  should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate IDK Extract®** has to be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals must be redissolved at 37 °C in a water bath. The **IDK Extract®** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract®*) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for three months**.
- The **lyophilized standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the standards and controls have to be reconstituted with **500  $\mu\text{l}$  of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to

ensure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls can be stored at 2–8 °C for four weeks.**

- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (100  $\mu$ l CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until expiry date stated on the label. **Conjugate (1:101 diluted CONJ) is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *Storage*

#### **Stool samples**

The **sample stability** is as follows:

**Raw stool:** over night at room temperature (15–30 °C), 3 days at 2–8 °C or at least 4 weeks at -20 °C

**Stool extracts:** 9 days at room temperature, 2–8 °C or -20 °C, maximum 3 freeze-thaw cycles

#### **Serum and plasma samples**

Fresh collected blood should be centrifuged within one hour. Store samples at -20 °C if not assayed on the same day. Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying.

### *Extraction of the stool samples*

**Extraction buffer** (1:2.5 diluted *IDK Extract*®) is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

#### **Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)**

##### ***Stool sample tube – Instructions for use***

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample used and the volume of the buffer.

##### ***SAS with 1.5 ml extraction buffer:***

Applied amount of stool: 15 mg

Buffer Volume: 1.5 ml



Dilution Factor: 1:100

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty sample tube** with **1.5 ml** of ready to use *IDK Extract*<sup>®</sup> extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (orange part of cap) to open. Insert the orange dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

**Dilution I: 1:100**

### *Dilution of samples*

#### **Stool samples**

The supernatant of the **sample** preparation procedure (dilution I) is further diluted **1:250 in wash buffer**. For example:

**20 µl** supernatant (dilution I) + **980 µl** wash buffer, mix well = **dilution II** (1:50)

**200 µl** dilution II + **800 µl** wash buffer, mix well = **dilution III** (1:5)

This results in a **final dilution of 1:25 000**.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution III** per well.

### Serum and plasma samples

Normal samples are diluted **1:40 000**. Samples from patients with Morbus Crohn etc. are diluted **1:250 000** and **1:1 000 000**. Use the corresponding dilution factor to calculate the  $\alpha_1$ -antitrypsin concentration.

#### 1:40 000 dilution

For example:

- **10  $\mu$ l** serum + **990  $\mu$ l** SAMPLEBUF (sample buffer), mix well  
= **1:100 (dilution Ia)**
- **100  $\mu$ l** dilution Ia + **900  $\mu$ l** SAMPLEBUF (sample buffer), mix well  
= **1:10 (dilution IIa)**
- **25  $\mu$ l** dilution IIa + **975  $\mu$ l** SAMPLEBUF (sample buffer), mix well  
= **1:40 (dilution IIIa)**.

This results in a final dilution of **1:40 000**.

#### 1:250000 dilution

For example:

- **10  $\mu$ l** serum + **990  $\mu$ l** SAMPLEBUF (sample buffer), mix well  
= **1:100 (dilution Ib)**
- **10  $\mu$ l** dilution Ib + **990  $\mu$ l** SAMPLEBUF (sample buffer), mix well  
= **1:10 (dilution IIb)**
- **20  $\mu$ l** dilution IIb + **480  $\mu$ l** SAMPLEBUF (sample buffer), mix well  
= **1:40 (dilution IIIb)**.

This results in a final dilution of **1:250 000**.

For analysis, pipet **100  $\mu$ l** of the final dilution step (IIIa/IIIb) 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.

Standards, 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. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard.  $\alpha_1$ -antitrypsin present in the samples is determined directly from this curve.

### Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips covered at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

Mark the positions of STD (Standard) SAMPLE (Sample) CTRL (Controls) on a **protocol sheet**.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash each well <b>5 times</b> by dispensing <b>250 <math>\mu</math>l wash buffer</b> into each well. After the final washing step, remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add <b>100 <math>\mu</math>l of STD</b> (standard), <b>SAMPLE</b> (sample) and <b>CTRL</b> (controls) into respective well.
3.	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .
4.	Discard the contents of each well. Wash each well <b>5 times</b> by dispensing <b>250 <math>\mu</math>l wash buffer</b> into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add <b>100 <math>\mu</math>l conjugate</b> into each well.
6.	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .
7.	Discard the contents of each well. Wash each well <b>5 times</b> by dispensing <b>250 <math>\mu</math>l wash buffer</b> into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add <b>100 <math>\mu</math>l of SUB</b> (substrate) into each well.
9.	Incubate for <b>10–20 minutes</b> at room temperature (15–30 °C) <b>in the dark*</b> .

10.	Add <b>100 <math>\mu</math>l of STOP</b> (stop solution) into each well, mix thoroughly.
11.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> against 620 nm as a reference.

\* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

## 8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4 parameter algorithm".

### 1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

### 2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

### 3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

### Stool samples

Multiply the obtained results by the dilution factor of 25 000 to get the real concentration.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

### Serum and plasma samples

For the calculation of the  $\alpha_1$ -antitrypsin concentration in serum and plasma samples, the result must be multiplied by **40 000 or 250 000** and **additionally by a factor of**

**3** for each sample.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

### Clearance

Use the following formula to calculate the clearance:

$$\text{Clearance (ml/day)} = (V * F) / S$$

V = volume of faeces in ml/day, mean value from 3 days (1 ml stool=1 g)

F = mean faeces  $\alpha_1$ -antitrypsin concentration from 3 days, calculated from the standard curve and multiplied by the dilution factor ( $\mu\text{g/l}$  or  $\text{mg/dl}$ )

S = mean serum  $\alpha_1$ -antitrypsin concentration from 3 days ( $\text{mg/dl}$ ), calculated from the standard curve and multiplied by the dilution factor ( $\mu\text{g/l}$  or  $\text{mg/dl}$ )

## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

*highest concentration of the standard curve  $\times$  sample dilution factor to be used*

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

*detection limit  $\times$  sample dilution factor to be used*

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed 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.

### Reference range

Based on Immundiagnostik studies of stool samples of apparently healthy persons (n = 76) the following reference range was estimated

<b>cut off value:</b>	<b>&lt; 26,8 mg/day</b>
<b><math>\alpha_1</math>-Antitrypsin-Clearance:</b>	<b>&lt; 27,5 ml/day</b>
<b><math>\alpha_1</math>-Antitrypsin concentration (serum and plasma):</b>	<b>90–180 mg/dl*</b>

\*L. Thomas 5. Auflage; Labor und Diagnose

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Precision and reproducibility

#### Intra-Assay (n = 20)

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.

Sample	$\alpha_1$ -antitrypsin [mg/dl]	CV [%]
1	15.2	4.5
2	42.2	13.1

#### Inter-Assay (n = 20)

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.

Sample	$\alpha_1$ -antitrypsin [mg/dl]	CV [%]
1	16.15	9.8
2	54.46	14.8

### Analytical Sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. The detection limit was set as  $B_0 + 2 \text{ SD}$  and estimated to be 1.8 mg/dl.

### Spiking Recovery

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

Sample	Unspiked Sample [ $\mu\text{g/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{g/l}$ ]	$\alpha_1$ -antitrypsin expected [ $\mu\text{g/l}$ ]	$\alpha_1$ -antitrypsin measured [ $\mu\text{g/l}$ ]
A	6.3	1.65	7.95	7.2
		5.0	11.3	11.4
		15.0	21.3	20.9
		45.0	51.3	46.7
B	5.6	1.65	7.3	7.0
		5.0	10.6	10.9
		15.0	20.6	17.5
		45.0	50.6	46.7

### Dilution recovery

Two patient serum samples were diluted with wash buffer. The results are shown below ( $n = 2$ ):

Sample	Dilution	$\alpha_1$ -antitrypsin expected [mg/dl]	$\alpha_1$ -antitrypsin measured [mg/dl]
A	1:12500	48.0	48.88
	1:25000	24.5	23.25
	1:50000	12.3	11.9
	1:100000	6.1	6.0
B	1:12500	158.4	158.4
	1:25000	79.3	99.0
	1:50000	39.6	33.0
	1:100000	19.8	22.1

### Specificity

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

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were 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.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

## 13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on 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.
- Do not mix plugs and caps from different 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.
- 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.









## 15. REFERENCES

1. Amarri, S. et al., 2006. Changes of gut microbiota and immune markers during the complementary feeding period in healthy breast-fed infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **42**(5), pp.488–95.
2. Faust, D et al., 2001. Determination of alpha1-proteinase inhibitor by a new enzyme linked immunosorbant assay in feces, serum and an enterocyte-like cell line. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, **39**(9), pp.769–74.
3. Faust, D. et al., 2002. Regulation of alpha1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells. *Clinical and experimental immunology*, **128**(2), pp.279–84.
4. Hsu, P.-I. et al., 2010. Diagnosis of gastric malignancy using gastric juice alpha1-antitrypsin. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, **19**(2), pp.405–11.
5. Lamprecht, M. et al., 2012. Probiotic supplementation affects markers of intestinal barrier, oxidation, and inflammation in trained men; a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, **9**(1), p.45.
6. Muss, C., Schütz, B. & Kirkamm, R., 2002. Alpha1-Antitrypsin - ein objektiver Verlaufsparemeter bei entzündlichen Darmerkrankungen. *Ärztzeitschrift für Naturheilverfahren*, 43(4).
7. Oswari, H. et al., 2013. Comparison of stool microbiota compositions, stool alpha1-antitrypsin and calprotectin concentrations, and diarrhoeal morbidity of Indonesian infants fed breast milk or probiotic/prebiotic-supplemented formula. *Journal of paediatrics and child health*, Epub ahead of print.
8. Quint, J.K. et al., 2011. SERPINA1 11478G>A variant, serum  $\alpha_1$ -antitrypsin, exacerbation frequency and FEV1 decline in COPD. *Thorax*, **66**(5), pp.418–24.
9. Ragab, H.M. et al., 2009. Clinical utility of serum TNF alpha and alpha-1 anti-tryptin in predicting the stage and progression of lung cancer. *International Journal of*

*Integrative Biology*, **7**(1), pp.45–52.

10. Roeckel, N. et al., 2009. High frequency of LMAN1 abnormalities in colorectal tumors with microsatellite instability. *Cancer research*, **69**(1), pp.292–9.
11. Strygler, B. et al., 1990.  $\alpha_1$ -Antitrypsin Excretion in Stool in Normal Subjects and in Patients With Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology*, **99**(5), pp.1380–1387.
12. Török, E. et al., 2011. Primary human hepatocytes on biodegradable poly(l-lactic acid) matrices: a promising model for improving transplantation efficiency with tissue engineering. *Liver transplantation*, **17**(2), pp.104–14.

**Used symbols:**

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by