

Arbeitsanleitung/Manual

α_1 -Antitrypsin ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung des α_1 -Antitrypsin in Serum und Stuhl

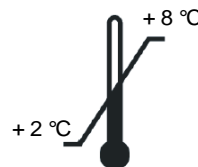
α_1 -Antitrypsin ELISA Kit

For the in vitro determination of α_1 -Antitrypsin in serum and stool

Gültig ab/valid from 27.09.2005



K 6750



Immundiagnostik AG, Wiesenstr. 4, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von α_1 -Antitrypsin in Serum und Stuhl geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Das α_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 Proteinase des Gerinnungssystems, Trypsin, Chymotrypsin etc. Das α_1 -Antitrypsin besitzt somit eine wichtige regulatorische bzw. antiinflammatorische Rolle.

Das α_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 α_1 -Antitrypsin den überwiegenden Anteil der Serinproteinaseinhibitoren 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 α_1 -Antitrypsin-Konzentration zur Beurteilung der Aktivität chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen herangezogen. Neben der Messung der einfachen 24h- α_1 -Antitrypsin-Ausscheidung in Stuhlproben hat sich auch die α_1 -Antitrypsin-Clearance-Bestimmung (Quotient aus den α_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 α_1 -Antitrypsin-Clearance die alleinige Bestimmung der α_1 -Antitrypsin-Stuhlkonzentration in 21% der Fälle ein falsch positives oder falsch negatives Ergebnis erbrachte.

Der von Immundiagnostik entwickelte α_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_1 -Antitrypsin-Konzentrationen lagen im Durchschnitt 30 % höher als die entsprechenden Werte der radialen Immundiffusion.
- 2) Das α_1 -Antitrypsin in den Zellkulturüberständen konnte nur mit dem ELISA-System nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass der α_1 -Antitrypsin-ELISA-Test wesentlich empfindlicher ist als andere gebräuchliche Methoden und dass er nicht nur **hepatische** sondern auch **enterale α_1 -Antitrypsin-Formen** erkennt. Der von uns entwickelte α_1 -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_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, autoimmun-verursachte Entzündungen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6750MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6750WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6750K	CONJ	Konjugat, (Schaf anti α -1-Antitrypsin, Peroxidase-markiert), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6750ST	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 3.3; 10; 30; 90 μ g/l)	5 vials
K 6750KO	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 vial
K 6750TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6750AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

DIE BEI DEM TEST VERWENDETEN STANDARDS WURDEN 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 μ l
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (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 μ l** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), 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 °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.
- Die **Standards und 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]	Verdünnungsfaktor
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
100	50

Einwaage [mg]	Verdünnungsfaktor
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
100	5.0

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 (= 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 **1:250** mit Waschpuffer (WASHBUF) verdünnt.

Zum Beispiel:

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

100 μ l Verdünnung I + **900 μ l** Waschpuffer, mischen (**Verdünnung II**) (**1:10**)

100 μ l der **Verdünnung II** werden im Test eingesetzt.

Plasma/Serum Proben

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. Wir empfehlen alle Proben in Doppelbestimmungen zu analysieren.

Serum- und Plasmaproben werden bei Normalpatienten 1:250.000 vorverdünnt. Patienten (Morbus Crohn etc.) mit hohen α -1-Antitrypsin Konzentrationen werden **1:250.000** und **1:1.000.000** vorverdünnt im Assay eingesetzt. **Zur Berechnung der α 1-Antitrypsin-Konzentration muss der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.**

1:1.000.000 Verdünnung

zum Beispiel:

10 μ l Serum/Plasma + 990 μ l Waschpuffer (**1:100**), mischen;
aus dieser Verdünnung (1:100)

10 μ l + 990 μ l Waschpuffer (**1:10.000**), mischen;
aus dieser Verdünnung (1:10.000) wiederum
10 μ l + 990 μ l Waschpuffer (**1:1.000.000**)

1:250.000 Verdünnung

zum Beispiel:

10 μ l Serum/Plasma + 990 μ l Waschpuffer (**1:100**), mischen;
aus dieser Verdünnung (1:100)
10 μ l + 990 μ l Waschpuffer (**1:10.000**), mischen;
aus dieser Verdünnung (1:10.000) wiederum
40 μ l + 960 μ l Waschpuffer (**1: 250.000**)

100 μ l der letzten **Verdünnung** werden im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

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

Standards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf α -1-Antitrypsin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen polyklonalen Kaninchen anti- α -1-Antitrypsin Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das α -1-Antitrypsin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat, ein zweiter Peroxidase-markierter Schaf anti- α -1-Antitrypsin Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes α -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 α -1-Antitrypsin-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve - Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

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

Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
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

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. 0.01).

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

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 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: 250

Verdünnungsfaktor: 62,5 x 250 = 15 625

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **15 625** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln. **Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.**

Serumproben:

Die ermittelte Serumkonzentration wird mit **1:250.000** bzw. **1.000.000** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

Clearance-Quotient:

Die Berechnung des α -1-Antitrypsin Quotienten erfolgt mittels der nachfolgenden Formel:

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

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

F = Mittlere fäkale Konzentration von α -1-Antitrypsin über 3 Tage: aus der Eichkurve abgelesen und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert (Einheit: $\mu\text{g/l}$, bzw. mg/dl)

S = mittlere Serum-Konzentration von α -1-Antitrypsin über 3 Tage: aus der Eichkurve abgelesen und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert (Einheit: $\mu\text{g/l}$, bzw. mg/dl)

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

Serum/Plasma mit hohen α -1-Antitrypsin Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit Waschpuffer stärker verdünnt und nochmals analysiert.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

Wir empfehlen die 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:

Intestinale α -1-Antitrypsin-Clearance : < 27,5 ml/Tag (n = 76)

α -1-Antitrypsin-Konzentration (Stuhl): 16,1 \pm 10,7 mg/dl

α -1-Antitrypsin-Konzentration Erwachsene (Serum): 90 - 180 mg/dl*

*(L. Thomas; 5. Auflage Labor und Diagnose)

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 α -1-Antitrypsin ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 20

Probe	α -1-Antitrypsin Mittelwert [$\mu\text{g/l}$]	Intra-Assay Vk [%]
1	12.19	4.5
2	33.92	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 α -1-Antitrypsin ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 20

Probe	α -1-Antitrypsin Mittelwert [$\mu\text{g/l}$]	Inter-Assay Vk [%]
1	12.92	9.8
2	43.57	14.8

Wiederfindung

Verschiedene α -1-Antitrypsin Proben wurden mit unterschiedlichen Spikes gemessen.

Wiederfindung n=4

Probe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	α -1-Antitrypsin erwartet [$\mu\text{g/l}$]	α -1-Antitrypsin Gemessen [$\mu\text{g/l}$]
1.65	6.3	7.95	7.2
5	6.3	11.3	11.4
15	6.3	21.3	20.9
45	6.3	51.3	46.7
1.65	5.6	7.3	7.0
5	5.6	10.6	10.9
15	5.6	20.6	17.5
45	5.6	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	α -1-Antitrypsin Mittelwert [OD]	Standardab- weichung	Nachweis- grenze [$\mu\text{g/l}$]
1	0.117	0.015	1.5

Linearität

Zwei Proben mit bekannter α -1-Antitrypsin Konzentration wurden seriell verdünnt und vermessen. Gegenübergestellt sind die erwartete (berechnete) und die gemessene α -1-Antitrypsin Konzentration.

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Gemessen [$\mu\text{g/l}$]
A	unverdünnt	39.1	39.1
	1:2	19.6	18.6
	1:4	9.8	9.5
	1:8	4.9	4.8
B	unverdünnt	126.7	126.7
	1:2	63.4	79.2
	1:4	31.7	26.4
	1:8	15.8	17.7

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 befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (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 beigelegten 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 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, 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

α_1 -Antitrypsin ELISA KIT

For the in vitro determination of α_1 -Antitrypsin in serum and stool

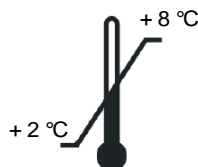
Valid from 27 September 2005



K 6750



96



1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of α_1 -Antitrypsin in serum, plasma and stool. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

The α_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 α_1 -antitrypsin plays an important regulatory as well as anti-inflammatory role.

The α_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 α_1 -antitrypsin is the main serine proteinase inhibitor in human plasma, the proof of fecal α_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 α_1 -antitrypsin-concentration is used to evaluate and monitor chronic inflammatory intestinal diseases. In the clinical routine, the α_1 -antitrypsin-clearance (ratio of the α_1 -antitrypsin-ELISA-values of stool and serum samples) has been established along with the sole determination of the 24h- α_1 -antitrypsin-secretion in stool. Thus, the group of J. S. Fordtran (Strygler et al. 1990) reports, that the sole determination of the α_1 -antitrypsin-concentration in stool yielded false positive or false negative results in 21% of the patients compared to the α_1 -antitrypsin-clearance-measurements.

In a comparative study with the radial immunodiffusion (RID), routinely used in the clinical diagnostics, the α_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 α_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 α_1 -antitrypsin in the cell culture supernatants.

The results clearly demonstrate that our α_1 -antitrypsin-ELISA-test is more sensitive than other routinely used methods and that it **recognizes the hepatic as well as the enteral α_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 immunodiffusion 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 6750MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6750WB	WASHBUF	ELISA wash concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6750K	CONJ	Conjugate, (sheep anti α -1-antitrypsin, peroxidase-labelled), ready-to-use	1 x 15 ml
K 6750ST	STD	Calibrators, ready-to-use (0; 3.3; 10; 30; 90 μ g/l)	5 vials
K 6750KO	CTRL	Control, ready-to-use	1 vial
K 6750TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 6750AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 7 ml

The used standards have been 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 μ 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 the assay more than one time, make sure that the reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare just the appropriate amount necessary for the 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 μ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals have to be redissolved at room temperature or 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**.
- The **standards** (STD) and the **control** (CTRL) are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label.
- 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
100	50

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
100	5.0

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
120	6.0

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 (= 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

After thawing, the supernatant is centrifuged at 13.000 rpm for 2 min. and diluted **1:250** in wash buffer.

For example:

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

100 μ l of this dilution I + **900 μ l** wash buffer, mix well (**dilution II**) (**1:10**)

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

Serum/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. We recommend duplicate analyses for each sample.

Normal samples are diluted **1:250,000**.

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 α -1-antitrypsin concentration.

1:1.000,000 dilution

For example:

Add **10 μ l** serum to **990 μ l** wash buffer, mix well (dilution I).

Add **10 μ l** of this dilution 1 to **990 μ l** wash buffer, mix well (dilution II).

Add **10 μ l** of dilution 2 to **990 μ l** wash buffer = 1:1,000,000

1:250,000 dilution

For example:

Add **10 μ l** serum to **990 μ l** wash buffer, mix well (dilution I).

Add **10 μ l** of this dilution 1 to **990 μ l** wash buffer, mix well (dilution II).

Add **40 μ l** of dilution 2 to **960 μ l** wash buffer = 1:250,000

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the “sandwich” technique with two selected polyclonal antibodies that bind to human α -1-antitrypsin.

Standards, controls and prediluted samples which are assayed for human α -1-antitrypsin are added into the wells of a micro plate coated with a high affine polyclonal anti-human α -1-antitrypsin antibody. During the first incubation step, α -1-antitrypsin is bound by the immobilized antibody. Then a peroxidase-conjugated polyclonal anti-human α -1-antitrypsin antibody is added into each microtiter well and a “sandwich” of capture antibody - human α -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 α -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. α -1-Antitrypsin present in the samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

<p>Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well</p>
<p>Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Control) on a protocol sheet</p>
<p>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</p>
<p>Wash each well 5 times by dispensing 250 μl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper</p>
<p>Add 100 μl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well</p>
<p>Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer</p>
<p>Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 μl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper</p>
<p>Add 100 μl CONJ (conjugate) into each well</p>
<p>Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer</p>

Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 μ l of diluted WASHBUF (wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper

Add 100 μ l of SUB (substrate) into each well

Incubate for 10 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark*

Add 50 μ l of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly

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

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 calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

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 logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Stool samples

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

For the α -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: 250

dilution factor: 62,5 x 250 = 15625

Multiply the result with **15 625** to get the real concentration. The dilution factor depends on the weight of the faeces.

Serum/plasma samples

For the calculation of the α -1-antitrypsin concentration in **plasma/serum** the result has to be multiplied by **250,000** or **1,000,000**.

Clearance:

Use the following formula to calculate the clearance:

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

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

F = mean faeces α -1-antitrypsin concentration from 3 days, calculated from the standard curve and multiplied by the dilution factor ($\mu\text{g/l}$ or mg/dl)

S = mean serum α -1-Antitrypsin concentration from 3 days (mg/dl), calculated from the standard curve and multiplied by the dilution factor ($\mu\text{g/l}$ or mg/dl)

9. LIMITATIONS

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

Serum/plasma samples with α -1-antitrypsin levels greater than the highest standard value, should be further diluted with wash buffer and re-assayed.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

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

α -1-Antitrypsin-Clearance :	< 27,5 ml/day (n = 76)
α -1-Antitrypsin concentration (faeces):	16,1 \pm 10,7 mg/dl
α -1-Antitrypsin concentration (serum):	90 - 180 mg/dl*

*(L. Thomas 5. Auflage; Labor und Diagnose)

These normal ranges should be used as a guideline only. It is recommended that each laboratory establishes an own expected range for its patient population.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay-Variation

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

Intra-Assay CV n= 20

Sample	α -1-Antitrypsin mean value [μ g/l]	Intra-Assay CV [%]
1	12,19	4,5
2	33,92	13,1

Inter-Assay-Variation

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik α -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	α -1-Antitrypsin mean value [μ g/l]	Inter-Assay CV [%]
1	12,92	9,8
2	43,57	14,8

Recovery

Two samples were spiked with different α -1-antitrypsin calibrator amounts and measured with the assay.

Recovery n=4

Probe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	α -1-Antitrypsin expected [$\mu\text{g/l}$]	α -1-Antitrypsin measured [$\mu\text{g/l}$]
1.65	6.3	7.95	7.2
5	6.3	11.3	11.4
15	6.3	21.3	20.9
45	6.3	51.3	46.7
1.65	5.6	7.3	7.0
5	5.6	10.6	10.9
15	5.6	20.6	17.5
45	5.6	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	α_1 -Antitrypsin mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [$\mu\text{g/l}$]
1	0,117	0,015	1,5

Linearity

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

n= 2

Sample	Dilution	Expected [$\mu\text{g/l}$]	Measured [$\mu\text{g/l}$]
A	undiluted	39.1	39.1
	1:2	19.6	18.6
	1:4	9.8	9.5
	1:8	4.9	4.8
B	undiluted	126.7	126.7
	1:2	63.4	79.2
	1:4	31.7	26.4
	1:8	15.8	17.7

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