

IDK[®] Präalbumin ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von Präalbumin (Transthyretin)
in Serum, Plasma, Urin und Stuhl*

IDK[®] prealbumin ELISA

*For the in vitro determination of prealbumin (transthyretin)
in serum, plasma, urine and stool*

Gültig ab / Valid from 2022-03-22

REF K 6331

Σ
96

+2°C
+8°C

IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Serum- / Plasmaproben</i>	5
<i>Stuhlproben</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	7
<i>Testprinzip</i>	7
<i>Pipettierschema</i>	7
8. ERGEBNISSE	9
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	10
<i>Referenzwerte</i>	10
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Spezifität</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	13
<i>Allgemeine Literatur</i>	13
<i>Literatur mit dem IDK® Präalbumin (Transthyretin) ELISA</i>	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Präalbumin/Transthyretin aus Serum, Plasma, Urin und Stuhl geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Präalbumin (Transthyretin) ist ein in der Leber, dem Gehirn und der Retina gebildetes Transportprotein. Es transportiert Thyroxin (T_4) und Retinolbindeprotein durch Serum und Cerebrospinalflüssigkeit. Seine Bezeichnungen stammen von seiner Funktion (**transports thyroxin and retinol**) sowie der Tatsache, dass es in Elektrophoresegelelen vor Albumin (*prealbumin*) läuft.

Präalbumin/Transthyretin ist ein 55 kDa großes Homotetramer. Jedes Monomer ist 127 Aminosäuren lang und reich an beta-Faltblatt-Strukturen. Zwei Monomere lagern sich zu einem Dimer, zwei Dimere bilden dann das fertige Homotetramer, das über insgesamt zwei Thyroxinbindestellen verfügt.

Transthyretin wird bei Entzündungsreaktionen reduziert und ist somit ein Anti-Akute-Phase-Protein. Eine Mutation im Transthyretinogen kann zu einem chronisch niedrigen Transthyretinspiegel im Blut führen, welcher zu Amyloidose führen kann. Da Transthyretin von allen Proteinen den höchsten Anteil essentieller Aminosäuren sowie eine kurze biologische Halbwertszeit von 1–2 Tagen hat, kann es zur Diagnose von Proteinmangelzuständen und Lebersynthesestörungen herangezogen werden.

Indikationen

- Amyloidose
- Proteinmangelzustände
- Lebersynthesestörungen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6331	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6331	CONJ	Konjugatkonzentrat (Kaninchen-anti-Präalbumin), peroxidasemarkiert	1 x 50 µl
K 6331	CONJBUF	Konjugatverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6331	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	4 x 5 vials
K 6331	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6331	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6331	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- 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 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben 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 µl** sollten vor Gebrauch kurz an-zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100ml WASH-BUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:500** in **Konjugatverdünnungspuffer (CONJBUF)** verdünnt (20 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Das **CONJ** ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:500 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Serum- / Plasmaproben

Probenlagerung

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.

Probenverdünnung

Serum- und Plasmaproben werden bei Normalpatienten 1:20 000 vorverdünnt im Assay eingesetzt. Die Verdünnung kann in drei Schritten durchgeführt werden. Zum Beispiel:

- **50 µl** Serum/Plasma + **950 µl** Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF), mischen = **1:20 (Verdünnung I)**
- **100 µl** Verdünnung I + **900 µl** SAMPLEBUF, mischen = **1:10 (Verdünnung II)**
- **10 µl** Verdünnung II + **990 µl** SAMPLEBUF = **1:100 (Verdünnung III)**.
Dies entspricht nun einer **Gesamtverdünnung von 1:20 000**.

100 µl der **Verdünnung III** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

Anmerkung: Wir empfehlen, die optimale Probenverdünnung (1:10 000–1:30 000) im Voraus zu ermitteln.

Stuhlproben

Stuhlprobenextraktion

Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) wird als **Probenextraktionspuffer** verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlprobenaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

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

SAS mit 1,5 ml Probenextraktionspuffer:

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 Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml Probenextraktionspuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) **befüllen**. **Wichtig:** Probenextraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen 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 so lange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. **Wichtig:** 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 im Probenextraktionspuffer 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 Stuhlprobenröhrchens (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

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:20 mit Waschpuffer** weiterverdünnt. Zum Beispiel:

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

Dies entspricht einer **Gesamtverdünnung von 1:2 000**.

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

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik mit zwei ausgewählten Antikörpern, die humanes Präalbumin (Transthyretin) erkennen.

Standards, Kontrollen und Proben, die Präalbumin (Transthyretin) enthalten, werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, deren Vertiefungen mit polyklonalen anti-humanen Präalbumin (Transthyretin)-Antikörpern beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Präalbumin (Transthyretin) aus der Probe vom an die Platte gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Es folgt die Zugabe von Konjugat (peroxidasemarkierter Antikörper) und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes Präalbumin (Transthyretin) – Peroxidasekonjugat. 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 Präalbumin (Transthyretin)-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.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8°C gelagert werden.

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 vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** 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 ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 2 000** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Serum-/Plasmaproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 20 000** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

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

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können 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 × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Zwei Seren wurden 1:10 000 bzw. 1:20 000 verdünnt und gemessen.

Intra-Assay (n = 24)

Probe	Präalbumin [$\mu\text{g/ml}$]	VK [%]
1	196,6	3,8
2	117,8	3,0

Inter-Assay (n = 14)

Probe	Präalbumin [$\mu\text{g/ml}$]	VK [%]
1	193,0	6,5
2	117,3	4,6

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,933 ng/ml.

Spezifität

Wie durch Rocket-Immunelektrophorese nachgewiesen, kreuzreagiert der Antikörper mit einem dem Präalbumin äquivalenten Protein von Katze, Rind, Hund, Ziege, Pferd, Schaf und Schwein. Dagegen tritt mit einem dem Präalbumin äquivalenten Protein von Meerschweinchen, Maus und Ratte keine Kreuzreaktivität auf.

- < 0,1% mit sIgA
- < 0,1% mit β -2-M
- < 0,1% mit humanem Albumin

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 gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

Achtung: Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- 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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

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 auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der 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 dem 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.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- IDK® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- 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













Allgemeine Literatur

1. Schmidt PN, Blirup-Jensen S, Svendsen PJ, Wandall JH. Characterization and quantification of plasma proteins excreted in faeces from healthy humans. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 1995 Feb;55(1):35–45.
2. Devoto G, Gallo F, Marchello C, Racchi O, Garbarini R, Bonassi S, et al. Prealbumin serum concentrations as a useful tool in the assessment of malnutrition in hospitalized patients. Clinical chemistry. 2006 Dec;52(12):2281–5.
3. Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Accuracy and limitations of the diagnosis of malnutrition in dialysis patients. Seminars in dialysis. 2012 Jul;25(4):423–7.

Literatur mit dem IDK® Präalbumin (Transthyretin) ELISA

4. Aeberli I, Biebinger R, Lehmann R, L'allemand D, Spinass GA, Zimmermann MB. Serum retinol-binding protein 4 concentration and its ratio to serum retinol are associated with obesity and metabolic syndrome components in children. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2007 Nov 1;92(11):4359–65.
5. Yılmaz D, Sönmez F, Karakaş S, Yavaşcan Ö, Aksu N, Ömürlü İK, et al. Evaluation of Nutritional Status in Children during Predialysis, or Treated By Peritoneal Dialysis or Hemodialysis. Journal of Tropical Pediatrics. 2016;fmv094.
6. Wang D, Liang H, Mao X, Liu W, Li M, Qiu S. Changes of transthyretin and clusterin after androgen ablation therapy and correlation with prostate cancer malignancy. Translational oncology. 2012 Apr;5(2):124–32.

Verwendete Symbole:

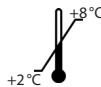
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

IDK[®] prealbumin ELISA

*For the in vitro determination of prealbumin (transthyretin)
in serum, plasma, urine and stool*

Valid from 2022-03-22

REF K 6331



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
<i>Serum / plasma samples</i>	19
<i>Stool samples</i>	20
7. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Test procedure</i>	22
8. RESULTS	23
9. LIMITATIONS	24
10. QUALITY CONTROL	24
<i>Reference range</i>	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Analytical Sensitivity</i>	25
<i>Specificity</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	27
<i>General literature</i>	27
<i>Literature using the IDK® prealbumin (transthyretin) ELISA</i>	27

1. INTENDED USE

This assay is an ELISA intended for the quantitative determination of prealbumin (transthyretin) in serum, plasma, urine and stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Prealbumin (transthyretin) is a transport protein secreted in the liver, brain and retina. It transports thyroxine (T₄) and retinol binding protein in serum and cerebrospinal fluid. Its names are derived from its function (**transports thyroxine and retinol**) and the fact that it runs in front of albumin (*prealbumin*) in electrophoresis gels.

Prealbumin (transthyretin) is a 55 kDa homotetramer with a dimer of dimers quaternary structure. Each monomer is a 127-residue polypeptide rich in beta sheets. Association of two monomers forms a dimer, two dimers produce the homotetrameric structure and create the two thyroxine binding sites per tetramer.

Transthyretin is reduced in inflammatory reactions and is therefore a negative acute-phase protein. A mutation in the transthyretin gene can result in a chronically lowered transthyretin level in the blood, leading to amyloidosis. As transthyretin is the protein with the highest proportion of essential amino acids and has a rather short biological half-life of 1–2 days, it can be used for the diagnosis of malnourishment and disturbances of the metabolic pathways in the liver.

Indications

- Amyloidosis
- Malnourishment
- Disturbances of the metabolic pathways in the liver

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6331	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
K 6331	CONJ	Conjugate concentrate (rabbit-anti-prealbumin), peroxidase-labelled	1 x 50 µl
K 6331	CONJBUF	Conjugate dilution buffer, ready-to-use	1 x 15 ml
K 6331	STD	Standards, lyophilised (see specification for concentrations)	4 x 5 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6331	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6331	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6331	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	2 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ 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 µl** 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 ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redis-

solved at room temperature or in a water bath at 37°C. 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 1 month**.

- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **are not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:500** in **conjugate dilution buffer (CONJBUF)** (20 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The **CONJ** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:500 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) when stored at **2–8°C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Serum / plasma samples

Sample storage

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.

Sample dilution

Standard serum and plasma samples are diluted 1:20 000 before being assayed. The dilution can be performed in three steps, e. g.:

- **50 µl** sample + **950 µl** sample dilution buffer (SAMPLEBUF), mix well
= **1:20 (dilution I)**
- **100 µl** dilution I + **900 µl** sample dilution buffer, mix well
= **1:10 (dilution II)**
- **10 µl** dilution II + **990 µl** sample dilution buffer, mix well
= **1:100 (dilution III)**.

This results in a **final dilution of 1:20 000**.

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

Note: We recommend the determination of the optimal sample dilution (1:10 000–1:30 000) in a preliminary experiment.

Stool samples

Extraction of the stool samples

Wash buffer (1:10 diluted WASHBUF) 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 sample 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:

- 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.
- Fill the **empty stool sample tube** with 1.5 ml **sample extraction buffer** (1:10 diluted WASHBUF) before using it with the sample. **Important:** Allow the sample extraction buffer to reach room temperature.
- Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow 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.
- Vortex 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 sample extraction buffer for ~ 10 minutes improves the result.
- Allow the 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

Sample dilution

The suspension of the sample preparation procedure (dilution I) is diluted **1:20 in wash buffer**. For example:

- **50 µl** supernatant (dilution I) + **950 µl** wash buffer, mix well
= **1:20 (dilution II)**

This results in a **final dilution of 1:2 000**.

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of human prealbumin (transthyretin) in serum, plasma, urine and stool.

Standards, controls and samples containing human prealbumin (transthyretin) are added to the wells of a microplate coated with polyclonal anti-human prealbumin antibodies. The antibodies immobilised on the walls of the microtiter wells capture prealbumin in the samples during the first incubation step. After washing away the unbound components, a peroxidase-conjugated anti-prealbumin detection antibody is added to each well. During a second incubation, the detection antibody is bound to the captured prealbumin. A sandwich of capture antibody – human prealbumin – peroxidase conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the prealbumin concentration of the sample. 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. Prealbumin (transthyretin), 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.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

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.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 h at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 h at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.

11.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. 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.
-----	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour 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.

Serum / plasma samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 20 000** to get the actual concentrations.

Stool samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 2 000** to get the actual concentrations.

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

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher 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 × sample dilution factor to be used

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

Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG 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 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

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Two sera were diluted 1:10 000 or 1:20 000 and measured using the assay.

Intra-Assay (n = 24)

Sample	Prealbumin [$\mu\text{g/ml}$]	CV [%]
1	196.6	3.8
2	117.8	3.0

Inter-Assay (n = 14)

Sample	Prealbumin [$\mu\text{g/ml}$]	CV [%]
1	193.0	6.5
2	117.3	4.6

Analytical Sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

The zero standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 0.933 ng/ml.

Specificity

As determined by rocket immunoelectrophoresis, the antibody cross-reacts with the protein equivalent to prealbumin in cat, dog, goat, horse, sheep and swine and shows no cross-reaction with its equivalent in guinea pig, mouse and rat.

- < 0,1% with sIgA
- < 0,1% with β -2-M
- < 0,1% with human Albumin

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 or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still should 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 analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated 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.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to 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.
- IDK® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- 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 Immunodiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES













General literature

1. Schmidt PN, Blirup-Jensen S, Svendsen PJ, Wandall JH. Characterization and quantification of plasma proteins excreted in faeces from healthy humans. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1995 Feb;55(1):35–45.
2. Devoto G, Gallo F, Marchello C, Racchi O, Garbarini R, Bonassi S, et al. Prealbumin serum concentrations as a useful tool in the assessment of malnutrition in hospitalized patients. *Clinical chemistry*. 2006 Dec;52(12):2281–5.
3. Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Accuracy and limitations of the diagnosis of malnutrition in dialysis patients. *Seminars in dialysis*. 2012 Jul;25(4):423–7.

Literature using the IDK® prealbumin (transthyretin) ELISA

4. Aeberli I, Biebinger R, Lehmann R, L'allemand D, Spinaz GA, Zimmermann MB. Serum retinol-binding protein 4 concentration and its ratio to serum retinol are associated with obesity and metabolic syndrome components in children. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007 Nov 1;92(11):4359–65.
5. Yılmaz D, Sönmez F, Karakaş S, Yavaşcan Ö, Aksu N, Ömürlü İK, et al. Evaluation of Nutritional Status in Children during Predialysis, or Treated By Peritoneal Dialysis or Hemodialysis. *Journal of Tropical Pediatrics*. 2016;fmv094.
6. Wang D, Liang H, Mao X, Liu W, Li M, Qiu S. Changes of transthyretin and clusterin after androgen ablation therapy and correlation with prostate cancer malignancy. *Translational oncology*. 2012 Apr;5(2):124–32.

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
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant