

# IDK<sup>®</sup> $\alpha_1$ -Antitrypsin ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von  $\alpha_1$ -Antitrypsin in Stuhl*

*For the in vitro determination of  $\alpha_1$ -antitrypsin in stool*

Gültig ab / Valid from 2022-02-22

**REF** K 6760

$\Sigma$   
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](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 REAGENZEN</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>7</b>
<i>Testprinzip</i>	7
<i>Pipettierschema</i>	7
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>9</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>9</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>10</b>
<i>Referenzwerte</i>	10
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	11
<i>Analytische Spezifität</i>	11
<i>Linearität</i>	12
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>13</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>13</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>14</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>14</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von  $\alpha_1$ -Antitrypsin in 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 AG entwickelte IDK®  $\alpha_1$ -Antitrypsin-ELISA übertrifft bei der Analyse von Serum, Stuhl und Zellkulturüberständen die bisher angewandte radiale 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 IDK®  $\alpha_1$ -Antitrypsin-ELISA wesentlich sensitiver ist als andere gebräuchliche Methoden und dass er nicht nur hepatische, sondern auch enterale  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Formen erkennen kann. Besonders bei ex-

trem hohen enteralen Eiweißverlusten ist er der radialen Immundiffusion deutlich überlegen. Die Kombination von zwei spezifischen Antikörpern in unserem IDK®  $\alpha_1$ -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 6760	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6760	CONJ	Konjugatkonzentrat, (Ziege-anti- $\alpha_1$ -Antitrypsin, Peroxidase-markiert)	1 x 200 $\mu$ l
K 6760	CAL	Kalibrator, lyophilisiert*	2 x 1 vial
K 6760	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6760	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®, 2,5 x	2 x 100 ml

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

\* Der für den Test verwendete Kalibrator wurden am WHO-Referenzpräparat CRM 470 kalibriert.

## 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1 000  $\mu\text{l}$
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- 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  $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$  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 auf dem Etikett angegeben 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 100  $\mu\text{l}$**  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 des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  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.
- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  auf. Das *IDK Extract®* kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract®*) ist **4 Monate bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Der **lyophilisierte Kalibrator** (CAL) und die **lyophilisierten Kontrollen** (CTRL) sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. CAL und CTRL werden mit je **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Rekonstituierter Kalibrator und Kontrollen können 4 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden.**
- Als **BLANK** (Leerwert) werden 100 µl des vorbereiteten Waschpuffers pipettiert.
- **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 gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### Lagerung

Die Probenstabilität ist wie folgt:

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

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

### Stuhlprobenextraktion

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

### Stuhlaufbereitungssystem (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** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) **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 Stuhlrohrchens (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 **1:250 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)
- Dies entspricht nun einer **Gesamtverdünnung von 1:25 000**.

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

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von  $\alpha_1$ -Antitrypsin in Stuhl.

Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik. Es werden zwei ausgewählte Antikörper, die humanes  $\alpha_1$ -Antitrypsin erkennen, verwendet.

Kalibrator, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf  $\alpha_1$ -Antitrypsin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen anti-human  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das  $\alpha_1$ -Antitrypsin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat, ein peroxidase-markierter Ziege-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 eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Musterkalibrierkurve 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 Kalibrator/Kontrollen/Leerwert/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 <b>vor Gebrauch 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.
2.	<b>100 <math>\mu</math>l Kalibrator/ Kontrollen/Leerwert/verdünnte Proben</b> in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter 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> (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren..
6.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter 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 Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	<b>10–20 min**</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
10.	<b>100 <math>\mu</math>l Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung 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.

\* 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

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

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

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

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.

## 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 Kalibrationskurve*  $\times$  *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*LoB*  $\times$  *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

LoB 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

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

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

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Genauigkeit – Präzision

#### Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 35

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	11,97	5,4
2	32,36	9,1

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

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	13,36	9,6
2	41,99	11,9

### Analytische Sensitivität

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

Leerwert (*limit of blank*, LoB)

0,359  $\mu$ g/l

### Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 5 Stuhlproben wurden dafür mit bekannten  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Konzentrationen versetzt und gemessen.

Probe [µg/l]	Spike [µg/l]	Erwartet [µg/l]	Gemessen [µg/l]	Wiederfindung [%]
6,67	15,00	21,67	20,37	93,98
	5,00	11,67	11,48	98,39
	1,65	8,32	7,39	88,77
7,87	45,00	52,87	45,06	85,24
	15,00	22,87	21,49	94,00
	5,00	12,87	11,67	90,68
	1,65	9,52	7,25	76,14
5,95	45,00	50,95	44,69	87,71
	15,00	20,95	18,42	87,90
	5,00	10,95	10,35	94,49
	1,65	7,60	6,72	88,38
< LoB	22,50	22,50	23,56	104,72
< LoB	22,50	22,50	22,64	100,63

### Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration	Gefundene Konzentration [µg/l]	Fazit
slgA	600 µg/l	0,23	< LoB
Albumin	800 µg/l	0,63	0,08 %
PMN Elastase	40 µg/l	0,39	0,98 %
Pankreatische Amylase	28 333 mU/l	0,26	< LoB
Chymotrypsin	1 000 µg/l	0,34	< LoB

### Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung von 5 Stuhlproben nachgewiesen.

Für  $\alpha_1$ -Antitrypsin in Stuhl wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 3,76 bis 54,38  $\mu\text{g/l}$  nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als  $\pm 20\%$ . Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ermittelt:

Probe	Verdünnung	Erwartet [ $\mu\text{g/l}$ ]	Gemessen [ $\mu\text{g/l}$ ]	Wiederfindung [%]
A	1:25 000	40,59	40,59	100,00
	1:50 000	20,29	15,64	77,05
	1:100 000	10,15	7,67	75,56
	1:200 000	5,07	4,45	87,77
B	1:25 000	30,08	30,08	100,00
	1:50 000	15,04	13,01	86,50
	1:100 000	7,52	6,30	83,75
	1:200 000	3,76	3,26	86,69
C	1:25 000	28,67	28,67	100,00
	1:50 000	14,49	14,34	101,04
	1:100 000	7,33	7,17	102,28
	1:200 000	3,83	3,58	106,86
D	1:25 000	23,12	23,12	100,00
	1:50 000	11,56	12,66	109,48
	1:100 000	5,78	7,11	122,99
E	1:25 000	54,38	54,38	100,00
	1:50 000	27,19	22,63	83,21
	1:100 000	13,60	11,20	82,39
	1:200 000	6,80	5,52	81,20

## 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 beigefügten 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® und IDK Extract® sind Marken der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina 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-tryptsin in predicting the stage and progression of lung cancer. *International Journal of Integrative Biology*, **7**(1), pp.45–52.
10. Roedel, 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:**

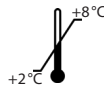
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

# **IDK<sup>®</sup> $\alpha_1$ -antitrypsin ELISA**

*For the in vitro determination of  $\alpha_1$ -antitrypsin in stool*

Valid from 2022-02-22

**REF** K 6760



**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](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>23</b>
<i>Principle of the test</i>	23
<i>Test procedure</i>	24
<b>8. RESULTS</b>	<b>25</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>26</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>26</b>
<i>Reference range</i>	26
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>26</b>
<i>Accuracy – Precision</i>	26
<i>Analytical specificity</i>	27
<i>Accuracy – Trueness</i>	27
<i>Analytical sensitivity</i>	28
<i>Linearity</i>	28
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>29</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

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of  $\alpha_1$ -antitrypsin in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Intestinal protein loss is a serious consequence of various systemic or local gastrointestinal 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 synthesised 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 recognised 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 the IDK®  $\alpha_1$ -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 IDK®  $\alpha_1$ -antitrypsin ELISA is far more sensitive than the conventional method and that it recognises 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 IDK®  $\alpha_1$ -antitrypsin ELISA widely excludes 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 mesenteric ischemia
- Viral, bacterial, allergic, or autoimmune-induced gastrointestinal inflammation

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6760	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 6760	CONJ	Conjugate concentrate, (goat-anti $\alpha_1$ -antitrypsin, peroxidase-labelled)	1 x 200 $\mu$ l
K 6760	CAL	Calibrator, lyophilised*	2 x 1 vial
K 6760	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6760	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
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
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract® 2.5x</i>	2 x 100 ml

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

\* The used calibrator has been calibrated on the WHO reference material CRM 470.

## 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water\*
- Calibrated precision pipettors and 10–1 000  $\mu$ l single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- 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  $\mu\text{m}$ ) 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 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. 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 ultrapure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to 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 4 months**.
- Use **100  $\mu\text{l}$**  of **wash buffer** (diluted WASHBUF) as **BLANK**. Pipette into the respective well.
- The **lyophilised calibrator (CAL)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the CAL and CTRL have to be reconstituted with **500  $\mu\text{l}$**  of **ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Reconstituted calibrator 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 + 10ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the 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) when stored at **2–8 °C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *Storage*

The **sample stability** is as follows:

**Raw stool:** 3 days 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

### *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 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:

- 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.





by the immobilised antibody. Then a peroxidase-conjugated polyclonal anti-human  $\alpha_1$ -antitrypsin antibody is added into each microtiter well and a “sandwich” of capture antibody - human  $\alpha_1$ -antitrypsin – peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of  $\alpha_1$ -antitrypsin. Samples are quantified by referring their optical density to a Lot-dependent master calibration curve and the use of a calibrator that is run with each test.

### Test procedure

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

Mark the positions of calibrator/controls/blank/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 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.	<b>Before use</b> , wash the wells <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each <b>100 µl calibrator/controls/blank/diluted samples</b> into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30°C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
4.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add <b>100 µl conjugate</b> (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30°C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
7.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.

8.	Add <b>100 <math>\mu</math>l substrate</b> (SUB) into each well.
9.	Incubate for <b>10–20 min**</b> at room temperature (15–30 °C) in the <b>dark</b> .
10.	Add <b>100 <math>\mu</math>l stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.
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.

\* 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

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

The calibration curve can be expressed either by the concentration of each standard with its corresponding optical density or by the four parameters A,B,C and D. In both cases the optical density of the calibrator (CAL) is essential. Depending on your evaluation software program, either the one or the other kind of data described above should be entered.

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

The plausibility of 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.

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 25 000** 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 calibration curve*  $\times$  *sample dilution factor to be used*

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

*LoB*  $\times$  *sample dilution factor to be used*

LoB 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 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 AG studies of stool samples of apparently healthy persons (n = 76), a **cut-off value of < 26,8 mg/dl** was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n = 35**

The repeatability was assessed with 2 stool samples under **constant** parameters (same operator, instrument, day and kit lot).

Sample	Mean value [ $\mu\text{g/l}$ ]	CV [%]
1	11.97	5.4
2	32.36	9.1

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

The reproducibility was assessed with 2 stool samples under **varying** parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [ $\mu\text{g/l}$ ]	CV [%]
1	13.36	9.6
2	41.99	11.9

### Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to calprotectin. There was no cross-reactivity observed.

Substance tested	Concentration added	Concentration obtained [ $\text{ng/ml}$ ]	Conclusion
slgA	600 $\mu\text{g/l}$	0.23	< LoB
Albumin	800 $\mu\text{g/l}$	0.63	0.08 %
PMN elastase	40 $\mu\text{g/l}$	0.39	0.98 %
Pankreatic amylase	28 333 mU/l	0.26	< LoB
Chymotrypsin	1 000 $\mu\text{g/l}$	0.34	< LoB

### Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore,  $\alpha_1$ -antitrypsin spikes with known concentrations were added to 2 different stool samples.

Sample [ $\mu\text{g/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{g/l}$ ]	Expected [ $\mu\text{g/l}$ ]	Obtained [ $\mu\text{g/l}$ ]	Recovery [%]
6.67	15.00	21.67	20.37	93.98
	5.00	11.67	11.48	98.39
	1.65	8.32	7.39	88.77

Sample [ $\mu\text{g/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{g/l}$ ]	Expected [ $\mu\text{g/l}$ ]	Obtained [ $\mu\text{g/l}$ ]	Recovery [%]
7.87	45.00	52.87	45.06	85.24
	15.00	22.87	21.49	94.00
	5.00	12.87	11.67	90.68
	1.65	9.52	7.25	76.14
5.95	45.00	50.95	44.69	87.71
	15.00	20.95	18.42	87.90
	5.00	10.95	10.35	94.49
	1.65	7.60	6.72	88.38
< LoB	22.50	22.50	23.56	104.72
< LoB	22.50	22.50	22.64	100.63

### *Analytical sensitivity*

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

Limit of blank, LoB

0.359  $\mu\text{g/l}$

### *Linearity*

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP06-A with a serial dilution of 5 different stool samples.

For  $\alpha_1$ -antitrypsin in stool, the method has been demonstrated to be linear from 3.76 to 54.38  $\mu\text{g/l}$ , showing a non-linear behaviour of less than  $\pm 20\%$  in this interval. The following values have been determined without considering possibly used sample dilution factors:

Sample	Dilution	Expected [ $\mu\text{g/l}$ ]	Obtained [ $\mu\text{g/l}$ ]	Recovery [%]
A	1:25 000	40.59	40.59	100.00
	1:50 000	20.29	15.64	77.05
	1:100 000	10.15	7.67	75.56
	1:200 000	5.07	4.45	87.77

Sample	Dilution	Expected [ $\mu\text{g/l}$ ]	Obtained [ $\mu\text{g/l}$ ]	Recovery [%]
B	1:25 000	30.08	30.08	100.00
	1:50 000	15.04	13.01	86.50
	1:100 000	7.52	6.30	83.75
	1:200 000	3.76	3.26	86.69
C	1:25 000	28.67	28.67	100.00
	1:50 000	14.49	14.34	101.04
	1:100 000	7.33	7.17	102.28
	1:200 000	3.83	3.58	106.86
D	1:25 000	23.12	23.12	100.00
	1:50 000	11.56	12.66	109.48
	1:100 000	5.78	7.11	122.99
E	1:25 000	54.38	54.38	100.00
	1:50 000	27.19	22.63	83.21
	1:100 000	13.60	11.20	82.39
	1:200 000	6.80	5.52	81.20

## 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 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 analysed 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 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®* and *IDK Extract®* are trademarks 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 sent to Immunodiagnostik 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-trypsin 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
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant