

**Zusammensetzung der Testkits**

Menge		Artikel
gebrauchsfertig	12 x 8 Vertiefungen	<b>Mikrotiterplatte</b> (Mit polyklonalen Antikörpern beschichtet)
gebrauchsfertig	1 x 1 ml	<b>Kalibrator</b> (in wäßriger Lösung mit Thimerosal.)
gebrauchsfertig	2 x 1 ml	<b>Kontrollen</b> (in wäßriger Lösung mit Thimerosal.)
gebrauchsfertig	15 ml	<b>Konjugat</b> (HRP markierter Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Thimerosal)
gebrauchsfertig	15 ml	<b>Assaypuffer</b> (Phosphatpuffer mit Thimerosal und Proteinzusatz pH 7,4)
gebrauchsfertig	12 ml	<b>Substrat</b> (TMB)
gebrauchsfertig	15 ml	<b>Stopplösung</b> (0,5 M Schwefelsäure)
in 500 ml entionisiertem Wasser lösen.	30 ml	<b>Konzentrat für den Waschpuffer</b> (Phosphatpuffer mit Thimerosal und Detergenz pH 7,4)
in 500 ml entionisiertem Wasser lösen.	30 ml	<b>Konzentrat für den Probenverdünnungspuffer</b> (Phosphatpuffer mit Natriumazid und Proteinzusatz pH 7,4)

**Vorsichtsmaßnahmen**

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H2SO4). H2SO4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H2SO4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

**Technische Merkmale**

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien sollte vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Im Falle von nicht optimalen Ergebnissen wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

**Allgemeine Hinweise**

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Maier analytik GmbH 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 Firma Maier Analytik GmbH, zurück zu senden.

**Bestimmung von  $\alpha_1$ -Antitrypsin im Stuhl mittels eines ELISAs.**

Nur zur "in vitro Diagnostik"

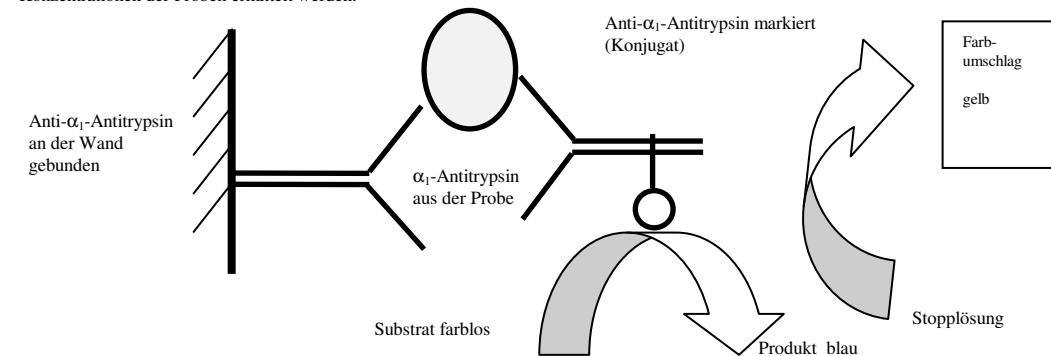


**Einführung**

$\alpha_1$ -Antitrypsin ist ein ca. 50 kDa großes Akutphaseprotein, das in der Leber synthetisiert wird. Es dient der Inhibition von Serinproteasen. Durch diese antiproteolytische Eigenschaften unterliegt  $\alpha_1$ -Antitrypsin nur einer geringen intestinalen Degradation und wird nahezu unverändert im Stuhl ausgeschieden. Entzündliche Darmerkrankungen wie z.B. Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa führen zu einer Destruktion des Darmepithels. Das Auftreten von  $\alpha_1$ -Antitrypsin in Fäzes deutet auf eine mit Blutungen in das Darmlumen verbundene Entzündungsreaktion hin.

**Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode**

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte polyklonale Antikörper, die humanes Alpha-1-Antitrypsin erkennen, verwendet. Standards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf Alpha-1-Antitrypsin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen polyklonalen Kaninchen anti- $\alpha_1$ -Antitrypsin Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das  $\alpha_1$ -Antitrypsin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat, ein Peroxidase-markierter Schaf anti- $\alpha_1$ -Antitrypsin Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes  $\alpha_1$ -Antitrypsin - Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.



**Assay Parameter**

1. Antikörper an der Platte:	Rabbit-Anti-human- $\alpha_1$ -Antitrypsin
Konjugat	Anti- $\alpha_1$ -Antitrypsin mit HRP markiert
Probenmaterial:	Stuhl 1/2000 in Probenverdünnungspuffer
Probenvolumen	10 $\mu$ l
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	4,8 mg/dl
Recovery :	101-108 %
Linearität ( $r=$ Korrelationskoeffizient):	$r = 0,89$
Kreuzreaktivität	Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen im Stuhl gefunden.
Intraassayvarianz:	< 6,1 %
Interassayvarianz:	< 10 %
Meßbereich:	10 - 200 mg/dl
<b>Normbereich</b> Cut off-Wert für Gesunde (Stuhl):	<b>&lt; 60 mg/dl</b>

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren

**Verwendete Geräte und Materialien**

Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)	Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen
Meßzylinder (500 ml)	10µl und 100 µl Präzisionspipette
Multipette mit Aufsatz	Vortex-Mixer
Entrifuge 3000 x g	Folie zum Abkleben der Platte
Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)	

Vorbereitungen für die Methodendurchführung	
<b>1</b>	<b>Alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18-26 °C)bringen.</b>
<b>2</b>	<b>Probenverdünnungspuffer:</b> Das Röhrchen mit dem Probenverdünnungspufferkonzentrat wird in einem Wasserbad so lange erhitzt bis die Lösung klar ist. Danach wird der gesamte Inhalt in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt.
<b>3</b>	<b>Waschpuffer:</b> Der gesamte Inhalt des Waschpufferkonzentrat wird in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt
<b>4</b>	<b>Vorbereitung der Stuhlproben:</b> Stuhlproben werden eingewogen und <b>1/50</b> (Gewicht zu Volumen) mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt (Zu 0,1 g Stuhl werden 5 ml Puffer zugegeben).Die Proben werden so lange gemischt bis die Lösung homogen ist. Die Röhrchen werden 15 min bei 3000 g zentrifugiert.
<b>5</b>	<b>Verdünnen der extrahierten Proben (1/40; Endverdünnung: 1/2000) :</b> 10 µl des klaren Überstandes wird in 390 µl des Probenverdünnungspuffers gelöst.

**Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien**

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem Volumen kleiner als 100 µl sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** und **Probenpufferkonzentrat** müssen vor Gebrauch in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (35 ml bzw. 30 ml Konzentrat + 500 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentrate kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Die Pufferkonzentrate können bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnten Pufferlösungen sind bei 2-8 °C einen Monat in geschlossenen Gefäßen haltbar.
- Die **Standards und Kontrollen** sind bei < -15 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. In aufgetautem Zustand sind die Standards und Kontrollen 5 Tage bei 2-8 °C stabil
- Die **Mikrotiterplatte** ist in verschlossenem Plastikbeutel 30 Tage bei Raumtemperatur und bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- **Alle anderen Testreagenzien** sind bei 2-8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

**Probenmaterial und Probenhaltbarkeit**

Die Stuhlproben werden vor der Bestimmung extrahiert und verdünnt. Die Haltbarkeit der verdünnten Proben beträgt 5 Tage bei 2-8 °C oder 12 Monate in tiefgefrorenem Zustand.

**Testansatz: alle Reaktionen sollten im Dunkeln stattfinden**

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen.  
**100 µl Standards, Kontrollen (keinen Assaypuffer zugeben !!!!)**

10 µl Proben laut Pipettierschema in Platte  
 100 µl Assaypuffer (schwarzer Deckel) in jede Vertiefung

den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren

Waschen mit 3 \* 250 µl Waschpuffer

100 µl Konjugat (roter Deckel) in alle Vertiefungen

den Testansatz **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren

Waschen mit 3 \* 250 µl Waschpuffer

100 µl Substrat (blauer Deckel) in alle Vertiefungen

den Testansatz **30 min** bei Raumtemperatur inkubieren

100 µl Stopplösung (gelber Deckel) in alle Vertiefungen

Die Färbung bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge 620nm messen

**Standards**

Für die Auswertung der Messwerte verwendet man ein 4-parametrisches Logit-Log-Model. Es müssen die Angaben zum Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators angegeben werden. Diese sind auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden.

Je nach verwendeter Software finden die Parameter A,B,C und D oder die Optische Dichte bezogen auf die Konzentration Verwendung.

**Validierung** 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.

<b>Kontrolle 1:</b>	<b>→</b>	<b>30,0 – 70,0 mg/dl</b>
<b>Kontrolle 2:</b>	<b>→</b>	<b>60,0 – 140,0 mg/dl</b>