

# RIDASCREEN<sup>®</sup> $\alpha_1$ -Antitrypsin

Art. Nr.: G09034



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Anwendungsbereich

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDASCREEN®  $\alpha_1$ -Antitrypsin ist ein Enzymimmunoassay zum quantitativen Nachweis von  $\alpha_1$ -Antitrypsin in Stuhlproben.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Proteine (Eiweißstoffe) sind wesentliche Bestandteile der Nahrung und des Körpers. Der Körper muss in der Lage sein Eiweiße zu verarbeiten d.h. sie je nach Bedarf auf- bzw. abzubauen.

Behilflich beim Abbau sind eiweißzersetzende Wirkstoffe (proteolytische Enzyme) wie Trypsin oder Chymotrypsin. Diese Enzyme können Nahrung verdauen, aber auch bakterielle oder entzündliche Infekte des Gastrointestinaltraktes bekämpfen. Damit die Wirkung dieser eiweißzersetzenden Stoffe aber auch gestoppt und gesundes Gewebe nicht zerstört wird, gibt es Inhibitoren, die diese Enzyme hemmen. Einer der wichtigsten Hemmstoffe ist das  $\alpha_1$ -Antitrypsin (auch  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor genannt), ein Glykoprotein mit einer Molekülgröße von 50 kDA. Das Protein stellt einen primären Inhibitor dar, der mit Serin-Proteasen wie z.B. PMN-Elastase, Trypsin, Chymotrypsin sowie mit aktiven entzündlichen Immunzellen reversible Komplexe bildet.

$\alpha_1$ -Antitrypsin besitzt dadurch auch eine wichtige regulatorische Wirkung bei Entzündungsprozessen und hemmt in erster Linie die in diesem Zusammenhang von Leukozyten freigesetzte Protease PMN-Elastase. Der Körper sendet PMN-Elastase aus, um die Entzündungsreaktionen zu bekämpfen. Damit die Wirkung von PMN-Elastase nur auf die Entzündung begrenzt bleibt, d.h. gesundes Gewebe nicht angegriffen wird, reguliert  $\alpha_1$ -Antitrypsin die Proteaseaktivität und kann so zur Beurteilung der Aktivität von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen herangezogen werden. Stark erhöhte Werte können z.B. bei Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa führen oder bei anderen Erkrankungen des Darmes, wie Polypen, Colon Carzinom, Divertikulitis, Zölliakie, oder stark ausgeprägten Nahrungsmittelallergien gefunden werden.  $\alpha_1$ -Antitrypsin kann auch als fäkaler Marker für einen intestinalen Eiweißverlust und eine erhöhte Schleimhautpermeabilität bei nicht intakter Darmschleimhaut genutzt werden.

Im Allgemeinen geht man davon aus, dass  $\alpha_1$ -Antitrypsin hauptsächlich in der Leber, aber auch in Darmzellen, synthetisiert und ohne tryptische Spaltung oder Resorption mit der Stuhlprobe ausgeschieden wird. Es unterliegt somit keinem intestinalen Abbau und ist deshalb als Stuhlmarker sehr gut geeignet.

### 3. Testprinzip

Im RIDASCREEN®  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Test werden spezifische Antikörper in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte ist ein spezifischer Antikörper gegen Epitope des humanen  $\alpha_1$ -Antitrypsin gebunden.

Eine Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe wird in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und darin inkubiert. Danach erfolgt ein Waschschriff und eine zweite Inkubation zusammen mit einem polyklonalen Anti- $\alpha_1$ -Antitrypsin-Antikörper, welcher mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Bei Anwesenheit von  $\alpha_1$ -Antitrypsin bildet sich ein Sandwich-Komplex aus dem immobilisierten Antikörper, dem  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Antigen und dem konjugierten Antikörper. Nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden in einem weiteren Waschschriff entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration des in der Probe vorhandenen  $\alpha_1$ -Antitrypsin.

### 4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen

<b>Plate</b>	96 Best.	Mikrotiterplatte; 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit polyklonalem Antikörper (aus Kaninchen) gegen humanes $\alpha_1$ -Antitrypsin
<b>Extract 10x</b>	100 ml	Extraktions- und Verdünnungspuffer (für Extraktion und primäre Stuhlverdünnung); Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung; enthält 0,1 % $\text{NaN}_3$ ; 10-fach Konzentrat
<b>Diluent   3</b>	100 ml	Probenverdünnungspuffer (zur Endverdünnung); Protein-gepufferte NaCl-Lösung; enthält 0,1 % $\text{NaN}_3$ ; gebrauchsfertig; rot gefärbt
<b>Wash 10x</b>	100 ml	Waschpuffer; Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung; enthält 0,1 % Thimerosal; 10-fach Konzentrat
<b>Calibrator</b>	1 ml	1 Kalibrator; enthält 0,1 % $\text{NaN}_3$ ; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe
<b>Control   +</b>	1 ml	1 Positivkontrolle; enthält 0,1 % $\text{NaN}_3$ ; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe
<b>Low control   +</b>	1 ml	1 Low-Positivkontrolle; enthält 0,1 % $\text{NaN}_3$ ; gebrauchsfertig; grüne Verschlusskappe

Conjugate	12 ml	Peroxidase-konjugierter; polyklonaler Antikörper (aus Kaninchen) gegen humanes $\alpha_1$ -Antitrypsin in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe
SeroSC	12 ml	Harnstoffperoxid / TMB; gebrauchsfertig
Stop	12 ml	Stopp-Reagenz; 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig

Gefahrstoffangabe gemäß Kennzeichnungspflicht. Weitere Details siehe Material Safety Data Sheets (MSDS) [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Der verdünnte Wasch- bzw. der Extraktionspuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C für 4 Wochen haltbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

### 6.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

### 6.2. Zubehör

- Probenröhrchen
- Einwegpipetten (Art. Nr.: Z 0001)
- Vortex Mixer (optional, siehe 9.4.)
- Mikropipette für 50 - 100  $\mu$ l und 1 ml Volumina
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300  $\mu$ l)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter mit einer 0,5 %-igen Hypochloritlösung

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Weitere Details siehe Material Safety Data Sheets (MSDS) [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Der Kalibrator, die Positivkontrolle und die Low-Positivkontrolle enthalten Bestandteile aus humanem Blut, welches auf HIV und Hepatitis getestet und für negativ befunden wurde. Dennoch sollten diese Komponenten, ebenso wie die Stuhlproben, als potentiell infektiös gemäß den nationalen Sicherheitsbestimmungen behandelt werden.

Der Waschpuffer enthält als Konservierungsmittel 0,1 % Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Kalibrator, Positivkontrolle, Low-Positivkontrolle, Extraktions- und Probenverdünnungspuffer enthalten 0,1 %  $\text{NaN}_3$ . Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Wasserstoffperoxid (TMB) kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben!

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden! Bei Hautkontakt mit Wasser spülen.

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden. VORSICHT: Um die Bildung giftiger Gase zu vermeiden, muss Flüssigabfall, der Stoppreagenz enthält, neutralisiert werden, bevor er in eine Hypochloritlösung gegeben wird.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften!

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

Das Untersuchungsmaterial ist bis zur Verarbeitung bei 2 - 8 °C zu lagern. Kann das Material nicht innerhalb von 3 Tagen im Test eingesetzt werden, wird eine Lagerung bei -20 °C oder kälter empfohlen. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden. Stuhlproben oder Rektalabstriche sollten nicht in Transportbehältern gesammelt werden, die Transport-medien mit Konservierungsstoffen, tierischen Seren, Metall-Ionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien enthalten, da Interferenzen mit dem RIDASCREEN®  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Test auftreten können.

## 9. Testdurchführung

### 9.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte **Plate** auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch sind die Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Beutel) und die Reagenzien wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind. Ein direkter Kontakt von Proben mit den Kitkomponenten ist zum Ausschluss von Kreuzkontamination zu vermeiden.

Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung sollte vermieden werden. Es wird empfohlen, die Mikrotiterplatte zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten abzudecken oder abzukleben.

Hinweis: Der Kalibrator und die Positivkontrolle müssen bei jedem Testlauf mitgeführt werden. Die Verwendung der Low-Positivkontrolle ist optional.

### 9.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates **Wash 10x** wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

### 9.3. Herstellung des Extraktionspuffers

1 Teil des Extraktionspuffers **Extract 10x** wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt (1:10). Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

### 9.4. Vorbereitung der Proben

#### 9.4.1. Probeneinwaage und -suspension

In ein gekennzeichnetes Teströhrchen werden 100 mg Stuhlprobe eingewogen und anschließend 5 ml verdünntem Extraktionspuffer dazupipettiert (1:50).

Alternativ können zwischen 80 - 130 mg eingewogen werden und in einem entsprechend verringerten bzw. erhöhten Volumen (siehe Tab.1) an verdünntem Extraktionspuffer suspendiert werden (zur Gewährleistung eines konstanten Verdünnungsverhältnisses).

Tab.1: Angaben zu den benötigten Mengen an verdünntem Extraktionspuffer abhängig von der jeweils eingewogenen Stuhlmenge

Einwaage [ mg ]	Volumen [ ml ]
80	4,00
85	4,25
90	4,50
95	4,75
100	5,00
105	5,25
110	5,50
115	5,75
120	6,00
125	6,25
130	6,50

Das Homogenisieren der Stuhlsuspension erfolgt unabhängig von der Einwaage-Methode durch gründliches Mischen auf einem Vortexer. Bei flüssigem Stuhl werden genau 100 µl in eine Pipette aufgesaugt und in genau 5 ml vorgelegtem verdünntem Extraktionspuffer suspendiert.

Im Anschluss muss das Homogenisat zur Sedimentation grober Stuhlpartikel für 10 Minuten bei mindestens 3000 g zentrifugiert werden.

#### 9.4.2. Manuelle Probenverdünnung

50 µl des geklärten Überstandes werden mit 950 µl verdünntem Extraktionspuffer verdünnt und gevortext (1:20). Danach erfolgt die Endverdünnung der Probe indem man 50 µl der ersten Verdünnung mit 950 µl RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent | 3** weiter verdünnt (1:20) und vortext. Diese Endverdünnung der Stuhlprobe wird anschließend im Test eingesetzt (siehe 9.5.).

### 9.4.3. Automatische Probenverdünnung

Erfolgt die Testdurchführung auf einem DSX-ELISA-Vollautomaten der Firma Dynex kann die Probe in folgenden Schritten verdünnt werden. Auch hier muss partikelfreier Überstand eingesetzt werden. Bei Verwendung anderer ELISA-Pipettierautomaten wenden Sie sich bitte an R-Biopharm.

Der ELISA-Automat pipettiert 25 µl des Überstandes in eine Deepwell-Platte. Diese wird mit 975 µl verdünntem Extraktionspuffer verdünnt (1:40). Es folgen zwei Misch-Zyklen.

In den Halterahmen der RIDASCREEN® α<sub>1</sub>-Antitrypsin Mikrotiterplatte **Plate** werden die benötigten Mikrotiterstreifen eingesetzt.

Aus der Deepwell-Platte werden jeweils 10 µl der Probenverdünnung in die RIDASCREEN®

α<sub>1</sub>-Antitrypsin Mikrotiterplatte **Plate** überführt und mit 90 µl RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent | 3** weiter verdünnt (1:10).

### 9.5. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen erfolgt die Zugabe von 100 µl Kalibrator **Calibrator** (in Doppelbestimmung), 100 µl Probenverdünnungspuffer **Diluent | 3** (= Negativ-Kontrolle) und 100 µl Positivkontrolle **Control | +** sowie 100 µl der zu untersuchenden Stuhlprobenendverdünnung in die jeweiligen Vertiefungen. Bei Bedarf kann eine Low-Positivkontrolle **Low control | +** mit 100 µl mitgeführt werden. Anschließend wird die Platte für 1 Stunde bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

### 9.6. Erster Waschschrift

Sorgfältiges Waschen ist wichtig zur Ermittlung korrekter Ergebnisse und sollte daher strikt nach Anleitung erfolgen. Das Inkubat in den Kavitäten sollte zunächst in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit zwecks Desinfektion entleert werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5-mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

Bei der Verwendung von Waschautomaten ist die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Mikrotiter-Plattentyp zu beachten. Ferner sollte eine nicht komplett partikelfreie Stuhlsuspension vor dem ersten Waschen manuell durch Ausschleudern aus den Kavitäten entfernt werden, um Verstopfungen der Waschnadeln zu vermeiden. Bei den Waschsritten muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden.



Nach dem letzten Waschschrift sollte die Platte gründlich auf saugfähigem, sauberem Papier oder Labortüchern ausgeschlagen werden, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen.

#### 9.7. Zweite Inkubation

Zugabe von 100 µl Konjugat **Conjugate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 1 Stunde bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

#### 9.8. Zweiter Waschschrift

Nach Ablauf der Zeit wird erneut 5-mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

#### 9.9. Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl Substrat **SeroSC** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Hinweis: Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Substrates verursachen.

### 10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung der Kalibrator (in Doppelbestimmung), sowie Positiv- und gegebenenfalls Low-Positivkontrolle mitzuführen, um Reagenzien-Stabilität und korrekte Testdurchführung sicherzustellen. Der Test ist korrekt verlaufen wenn die Kontrollen innerhalb der auf dem mitgelieferten chargenspezifischen Datenblatt vermerkten Sollbereiche liegen. Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm Distributeur.

## 11. Auswertung und Interpretation

### 11.1. Ein-Punkt-Quantifizierung nach dem 4-Parameter-logistic-log-Modell

Die Bestimmung der Konzentration von  $\alpha_1$ -Antitrypsin in  $\mu\text{g/g}$  Stuhl erfolgt beim RIDASCREEN<sup>®</sup>  $\alpha_1$ -Antitrypsin ELISA nach dem 4-Parameter-logistic-log-Modell (4PL).

Für die Ergebnisermittlung wird die Auswertesoftware RIDA<sup>®</sup> SOFT Win benötigt. Die RIDA<sup>®</sup> SOFT Win bzw. ein Update kann auf Anfrage von der R-Biopharm AG oder über Ihren lokalen R-Biopharm Distributeur bezogen werden.

Die für die 4PL-Berechnung benötigten Parameter (A - D) der Standardkurve sowie der Sollwert für Kalibrator, Positivkontrolle und Low-Positivkontrolle sind auf dem, dem Testkit beiliegenden, chargenspezifischen Datenblatt aufgeführt und müssen vor einer Messung jeweils mit den Werten in der Auswertesoftware abgeglichen werden.

Die R-Biopharm AG ermittelt in der Qualitäts-Endkontrolle unter optimalen Testbedingungen für jede Kitcharge die Standardkurve (inkl. der Parameter A - D) sowie jeweils einen Sollwert und einen erlaubten Bereich für die Standardabweichung von Kalibrator, Positivkontrolle und Low-Positivkontrolle. Der Kalibrator dient zur quantitativen Auswertung der Proben. Die Positivkontrolle und die Low-Positivkontrolle dienen der Labor-internen Testvalidierung.

Aus dem Mittelwert der Doppelbestimmung des Kalibrators und dessen Sollwert wird durch die RIDA<sup>®</sup> SOFT Win intern ein Korrekturfaktor F berechnet und mit den Extinktionen der Stuhlproben verrechnet. Innerhalb der Grenzen der Standardkurve ist eine sichere und zuverlässige Bewertung der Testergebnisse möglich.

Alternativ zur RIDA<sup>®</sup> SOFT Win kann eine andere Auswertesoftware, die das 4-Parameter-logistic-log-Modell zur Verfügung stellt, verwendet werden.

### 11.2. Testergebnis

Bis zu einem Messwert von  $< 400 \mu\text{g/g}$  Stuhl sind die Ergebnisse als negativ zu bewerten.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

## 12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN<sup>®</sup>  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Test weist Epitope von  $\alpha_1$ -Antitrypsin in Stuhlproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Extinktionswertes und der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die ermittelten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.

### 13. Leistungsmerkmale

#### 13.1. Testqualität

Der RIDASCREEN®  $\alpha_1$ -Antitrypsin ELISA wurde in einer Studie mit insgesamt 153 Stuhlproben bezüglich Sensitivität und Spezifität in einem externen Labor gegen den dort routinemäßig eingesetzten Immuno-chemiluminometrischen Assay ( $\alpha_1$ -Antitrypsin-ILMA) getestet. Aus der Untersuchung gingen die folgenden Werte hervor:

Sensitivität: 96,3%

Spezifität: 83,0%

#### 13.2. Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des RIDASCREEN®  $\alpha_1$ -Antitrypsin ELISA wurde anhand der Summe aus  $B_0$ -Wert und der 2-fachen Standardabweichung von  $B_0$  festgelegt. Der  $B_0$ -Wert selbst ist der Mittelwert der Mehrfachbestimmung (n=36) der Negativkontrolle (=Diluent | 3).

Somit ergibt sich eine Nachweisgrenze für  $\alpha_1$ -Antitrypsin von 30,8  $\mu\text{g/g}$  Stuhl.

#### 13.3. Linearität der Testergebnisse

Um die Linearität der Ergebnisse des RIDASCREEN®  $\alpha_1$ -Antitrypsin ELISA zu überprüfen, wurden serielle Verdünnungsreihen mehrerer  $\alpha_1$ -Antitrypsin-positiver und -negativer Stuhlproben hergestellt. Probeneinwaage und -suspension sowie der erste Verdünnungsschritt erfolgten analog zu den Angaben in dieser Anleitung (siehe Punkt 9.4.). Die seriellen Verdünnungsschritte wurden anschließend in RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer Diluent | 3 hergestellt. Die Extinktionen der einzelnen Verdünnungen wurden mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor auf die Ausgangskonzentrationen zurückgerechnet. Exemplarisch sind die Verdünnungsreihen einer  $\alpha_1$ -Antitrypsin-positiven Probe und einer als negativ bewerteten Probe in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Bestimmung der Linearität der Testergebnisse

	RIDASCREEN® $\alpha_1$ -Antitrypsin	
Verdünnung	pos. Probe [ $\mu\text{g/g}$ Stuhl]	neg. Probe [ $\mu\text{g/g}$ Stuhl]
1:12500	526	241
1:20000	484	235
1:25000	525	255
1:30000	518	252
MW	513	246
SD	19,8	9,4
VK %	3,9	4,8

#### 13.4. Präzision

Die Intra- und Inter-Assay-Reproduzierbarkeit des RIDASCREEN®  $\alpha_1$ -Antitrypsin ELISA wurde durch Mehrfachbestimmung an verschiedenen Tagen unter Einhaltung optimaler Bedingungen ermittelt. Die Tabellen 3 und 4 geben die Ergebnisse wieder.

Tab. 3: Intra-Assay-Reproduzierbarkeit (n=20)

Intra-Assay	RIDASCREEN® $\alpha_1$ -Antitrypsin	
	1. Konzentration [10 ng/ml]	2. Konzentration [30 ng/ml]
MW (OD)	0,404	1,081
SD	0,020	0,051
VK %	4,9	4,8

Tab. 4: Inter-Assay Reproduzierbarkeit (n=16)

Inter-Assay	RIDASCREEN® $\alpha_1$ -Antitrypsin	
	1. Konzentration [10 ng/ml]	2. Konzentration [30 ng/ml]
MW (OD)	0,409	1,080
SD	0,032	0,057
VK %	7,9	5,3

#### 14. Literatur

1. Arndt et al., 1993, *Crohn; Clin. Lab.* 11: 867-876
2. Stein, J., 1996, 3. *Post-graduertenkurs der DGVS*
3. Assessment of Crohn's disease activity and alpha 1-antitrypsin in faeces; Arndt B, Schürmann G, Betzler M, Herfarth C, Schmidt-Gayk H.; *Lancet.* 1992 Oct 24; 340(8826):1037.
4. Enteric protein loss in various gastrointestinal diseases determined by intestinal alpha 1-antitrypsin clearance; Karbach U, Ewe K.; *Z Gastroenterol.* 1989 Jul; 27(7):362-5.
5. Detection of increased permeability of the intestinal mucosa in chronic inflammatory bowel diseases; Karbach U.; *Z Gastroenterol Verh.* 1989 Jul; 24:40-4.
6. Alpha 1-antitrypsin excretion in stool in normal subjects and in patients with gastrointestinal disorders; Strygler B, Nicar MJ, Santangelo WC, Porter JL, Fordtran JS.; *Gastroenterology.* 1990 Nov; 99(5):1380-7.
7. Regulation of alpha1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells; Faust D, Raschke K, Hormann S, Milovic V, Stein J.; *Clin Exp Immunol.* 2002 May; 128(2):279-84.