



## Instructions for Use

# $\alpha$ 1-Antitrypsin ELISA

IVD



REF EIA-5299

$\Sigma$  96



**DRG**

**DRG Instruments GmbH**, Germany  
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:

**DRG**

**DRG International, Inc.**, USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis**

1	INTENDED USE.....	2
2	INTRODUCTION.....	2
3	MATERIAL SUPPLIED.....	2
4	MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED.....	3
5	STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS.....	3
6	STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES.....	4
7	ASSAY PROCEDURE.....	5
8	RESULTS.....	6
9	LIMITATIONS.....	6
10	QUALITY CONTROL.....	6
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	7
12	PRECAUTIONS.....	8
13	TECHNICAL HINTS.....	8
14	GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE.....	8
1	VERWENDUNGSZWECK.....	9
2	EINLEITUNG.....	9
3	INHALT DER TESTPACKUNG.....	9
4	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL.....	10
5	VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN.....	10
6	PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG.....	11
7	TESTDURCHFÜHRUNG.....	12
8	ERGEBNISSE.....	13
9	EINSCHRÄNKUNGEN.....	13
10	QUALITÄTSKONTROLLE.....	13
11	TESTCHARAKTERISTIKA.....	14
12	VORSICHTSMASSNAHMEN.....	15
13	TECHNISCHE MERKMALE.....	15
14	ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST.....	15
15	REFERENCES/LITERATURE / LITERATUR.....	16
	SYMBOLS USED.....	17

## 1 INTENDED USE

The assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of α1-Antitrypsin in stool. It is 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 α1-antitrypsin concentration in stool.

In serum, α1-antitrypsin represents the majority of serine protease inhibitors and protects tissues from protease damages during inflammation. The protein is synthesized primarily in the liver but also to a small extent in intestinal macrophages, monocytes, and intestinal epithelial cells. Since α1-antitrypsin is relatively resistant against enzymatic digestion, the secreted amount in stool reflects the internal concentration of the protein. An elevated α1-antitrypsin stool concentration is therefore a widely recognized marker for intestinal protein loss and for an increased mucosal permeability.

In clinical routine, the α1-antitrypsin clearance (ratio of the α1-antitrypsin ELISA values of stool and serum samples) has been established along with the sole determination of the 24h α1-antitrypsin secretion in stool. Thus the group of J. S. Fordtran reports that the sole determination of the α1-antitrypsin concentration in stool yielded false positive or false negative results in 21 % of the patients compared to the α1-antitrypsin clearance measurement (Strygler et al. 1990).

The analytical quality of DRG's α1-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 α1-antitrypsin in all of these samples, in some of them even in very high concentrations.

These results clearly prove that the α1-antitrypsin ELISA is far more sensitive than the conventional method and that it recognizes not only hepatic but also enteral α1-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 α1-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

Label	Kit Components	Quantity
PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 mL
CONJ	Conjugate concentrate, (goat-anti-α1-antitrypsin, peroxidase-labelled)	1x 200 µL
STD	Standards*, lyophilized (0; 3.3; 10; 30; 90 µg/L)	2 x 5 vials
CTRL 1	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
CTRL 2	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 mL
STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 mL
IDK Extract®	Extraction buffer concentrate IDK Extract® 2.5x	2 x 100 mL

\* The used standards have been calibrated on the WHO reference material CRM 470.

#### 4 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water\*
- Stool sample application system such as cat. no.: EIA-5674
- Calibrated precision pipettors and 10 - 1000 µL single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeating pipets
- Vortex-Mixer
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

\* DRG recommends the use of Ultra Pure 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 assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 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 ultra pure water **1:10** before use (100 mL WASHBUF + 900 mL ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2 °C - 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 °C - 8 °C for 1 month.**
- **Preparation of the extraction buffer:**  
The **extraction buffer concentrate IDK Extract®** has to be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 mL *IDK Extract®* + 150 mL ultra pure 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 °C - 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 °C - 8 °C for 4 months.**
- The **lyophilized standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at 2 °C - 8 °C until the expiry date stated on the label. Before use, STD and CTRL have to be reconstituted with **500 µL of ultra pure water and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution.** Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at 2 °C - 8 °C for 4 weeks.**
- **Preparation of the conjugate:**  
Before use, the **conjugate concentrate (CON J)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (100 µL CONJ + 10 mL wash buffer). The CONJ is stable at **2 °C - 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. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2 °C - 8 °C.**

## 6 STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### 6.1 Storage

The **sample stability** is as follows:

**Raw stool:** 3 days at room temperature (15 °C - 30 °C),  
3 days at 2 °C - 8 °C,  
or at least 4 weeks at -20 °C

**Stool extracts:** 9 days at room temperature, 2 °C - 8 °C or -20 °C, maximum 3 freeze-thaw cycles

### 6.2 Extraction of the stool sample

**Extraction buffer** (1:2.5 diluted IDK Extract<sup>®</sup>) is used as a sample extraction buffer.

We recommend the following sample preparation:

#### Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: EIA-5674)

##### Stool sample tube – Instruction 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** (1:2.5 diluted IDK Extract<sup>®</sup>) 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 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.
- Shake 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 sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- 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**

### 6.3 Dilution of samples

The supernatant of the sample preparation procedure (dilution I) is further diluted **1:250** in wash buffer.

For example:

**20 µL** supernatant (dilution I) + **980 µL** wash buffer, mix well = **dilution II** (1:50)

**200 µL** dilution II + **800 µL** wash buffer, mix well = **dilution III** (1:5)

This results in a **final dilution of 1:25000**.

For analysis, pipette **100 µL** of **dilution III** per well.

## 7 ASSAY PROCEDURE

### 7.1 Principle of the test

The assay utilizes the sandwich technique with two selected polyclonal antibodies that bind to human α1-antitrypsin. Standards, controls and prediluted samples which are assayed for human α1-antitrypsin are added into the wells of a microplate coated with a high affine polyclonal anti-human α1-antitrypsin antibody. During the first incubation step, α1-antitrypsin is bound by the immobilized antibody. Then a peroxidase-conjugated polyclonal anti-human α1-antitrypsin antibody is added into each microtiter well and a sandwich of capture antibody – human α1-antitrypsin – peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine 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 α1-antitrypsin. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. α1-Antitrypsin present in the samples, is determined directly from this curve.

### 7.2 Test procedure

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

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

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2 °C - 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 DRG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1. Before use, wash the wells **5 times** with **250 µL wash buffer** into each well. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2. Add each **100 µL standards / controls / samples** into the respective wells.
3. Cover the plate tightly and incubate for **1 hour at room temperature** (15 °C - 30 °C) on a **horizontal shaker\***.
4. Discard the contents of each well and wash **5 times** with **250 µL of 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 hour at room temperature** (15 °C - 30 °C) on a **horizontal shaker\***.
7. Discard the contents 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 minutes\*\* at room temperature** (15 °C - 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 no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** against 620 nm as a reference.

\* 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 program used, the duplicate values should be evaluated manually.

### Stool samples

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 25 000** to get the actual concentration. 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 greater 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:

$$\text{highest concentration of the standard curve} \times \text{sample dilution factor to be used}$$

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

$$\text{Analytical sensitivity} \times \text{sample dilution factor to be used}$$

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

## 10 QUALITY CONTROL

DRG 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.

### 10.1 Reference range

Based on 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

### 11.1 Analytical Sensitivity

The detection limit was set as  $B_0 + 2 \text{ SD}$ . The Zero-standard was measured 20 times.

The values were estimated in relation to the concentration of the calibration curve and resulted in a detection limit of 0.72 µg/L without consideration of the sample dilution factor.

### 11.2 Precision and reproducibility

#### Intra-Assay (n = 20)

The precision (intra-assay variation) of the α1-Antitrypsin ELISA was calculated from 20 replicate determinations on each one of two samples.

Sample	α1-antitrypsin [mg/dL]	CV [%]
1	15.2	4.5
2	42.2	13.1

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

The total precision (inter-assay variation) of the α1-Antitrypsin ELISA was calculated from data on 2 samples obtained in 20 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of three months.

Sample	α1-antitrypsin [mg/dL]	CV [%]
1	16.15	9.8
2	54.46	14.8

### 11.3 Spiking Recovery

Two samples were spiked with different α1-antitrypsin standard amounts and measured with the assay.

Sample	Unspiked Sample [µg/L]	Spike [µg/L]	α1-antitrypsin expected [µg/L]	α1-antitrypsin measured [µg/L]
A	6.3	1.65	7.95	7.2
		5.0	11.3	11.4
		15.0	21.3	20.9
		45.0	51.3	46.7
B	5.6	1.65	7.3	7.0
		5.0	10.6	10.9
		15.0	20.6	17.5
		45.0	50.6	46.7

### 11.4 Specificity

No cross reactivity with other plasma proteins in stool was observed.

No cross reactivity with α1-antitrypsin in mouse serum was observed.

### 11.5 Dilution Recovery

Two patient serum samples were diluted with wash buffer. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	α1-antitrypsin expected [mg/dL]	α1-antitrypsin measured [mg/dL]
A	1:12 500	48.0	48.88
	1:25 000	24.5	23.25
	1:50 000	12.3	11.9
	1:100 000	6.1	6.0
B	1:12 500	158.4	158.4
	1:25 000	79.3	99.0
	1:50 000	39.6	33.0
	1:100 000	19.8	22.1



## 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 and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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 analyzed 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.
- 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. DRG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von α1-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 α1-Antitrypsin-Konzentrationen im Stuhl gesichert.

Im Serum macht α1-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 α1-Antitrypsin relativ resistent gegen Abbau durch Verdauungsenzyme ist, wird es fast unverändert im Stuhl ausgeschieden. Der Nachweis von α1-Antitrypsin ist daher ein anerkannter Marker für den intestinalen Eiweißverlust und erhöhte Schleimhautpermeabilität.

Neben der Messung der einfachen 24h-α1-Antitrypsin-Ausscheidung in Stuhlproben hat sich auch die α1-Antitrypsin-Clearance-Bestimmung (Quotient aus den α1-Antitrypsin-ELISA-Werten von Stuhl- und Serumproben) im klinischen Alltag durchgesetzt. So zeigte die Gruppe um J. S. Fordtran, dass im Vergleich zur α1-Antitrypsin-Clearance die alleinige Bestimmung der α1-Antitrypsin-Stuhlkonzentration in 21 % der Fälle ein falsch positives oder falsch negatives Ergebnis erbrachte (Strygler et al. 1990).

Der von DRG entwickelte α1-Antitrypsin-ELISA übertrifft bei der Analyse von Serum, Stuhl und Zellkulturüberständen die bisher angewandte Radialen Immundiffusion (RID) deutlich. Im direkten Vergleich waren die im ELISA ermittelten α1-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 α1-Antitrypsin nachweisen, zum Teil sogar in sehr hoher Konzentration (Faust et al. 2001).

Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass der α1-Antitrypsin-ELISA wesentlich sensitiver ist als andere gebräuchliche Methoden und dass er nicht nur hepatische, sondern auch enterale α1-Antitrypsin-Formen erkennen kann. Besonders bei extrem hohen enteralen Eiweißverlusten ist er der radialen Immundiffusion deutlich überlegen. Die Kombination von zwei spezifischen Antikörpern in unserem α1-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

Symbol	Kit Komponenten	Menge
PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 mL
CONJ	Konjugatkonzentrat, (Ziege-anti-α1-Antitrypsin, peroxidasemarkiert)	1 x 200 µL
STD	Standards*, lyophilisiert (0; 3.3; 10; 30; 90 µg/L)	2 x 5 Fläschchen
CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 Fläschchen
CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 Fläschchen
SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 mL
STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 mL
IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®, 2,5 x	2 x 100 mL

\* Die für den Test verwendeten Standards wurden am WHO-Referenzpräparat CRM 470 kalibriert.

#### 4 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Stuhlprobenaufbereitungssystem wie z.B. Artikel-Nr. EIA-5674
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µL
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

\* DRG 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 VORBEREITUNG UND LAGERUNG 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 als 100 µL** 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 °C auf. Der **WASHBUF** kann bei **2 °C - 8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden.  
Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist **einen Monat** bei **2 °C - 8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:**  
Das **Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract<sup>®</sup>** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 mL **IDK Extract<sup>®</sup>** + 150 mL Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf.  
Das **IDK Extract<sup>®</sup>** kann bei **2 °C - 8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden.  
Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes **IDK Extract<sup>®</sup>**) ist **4 Monate** bei **2 °C - 8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **lyophilisierten Standards (STD)** und **Kontrollen (CTRL)** sind bei **2 °C - 8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.  
STD und CTRL werden mit **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.  
**Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **können 4 Wochen bei 2 °C - 8 °C gelagert werden**.
- **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 °C - 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 °C - 8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6 PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### 6.1 Lagerung

Die Probenstabilität ist wie folgt:

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

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

### 6.2 Stuhlprobenextraktion

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

#### Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. EIA-5674)

##### **Stuhlprobenröhrchen - Anwendung**

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

##### **SAS mit 1,5 mL Puffer:**

Aufgenommene Stuhlmenge: 15 mg  
Puffervolumen: 1,5 mL  
Verdünnungsfaktor: 1:100

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung **1,5 mL Probenextraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes IDK Extract®) **befüllen**.  
Wichtig: Probenextraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- 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.
- Das Röhrchen solange mischen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. 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 in Probenextraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- 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**

### 6.3 Probenverdünnung

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:250 mit Waschpuffer** weiterverdünnt.

Zum Beispiel:

**20 µL** Verdünnung I + **980 µL** Waschpuffer, mischen = **Verdünnung II** (1:50)

**200 µL** Verdünnung II + **800 µL** Waschpuffer, mischen = **Verdünnung III** (1:5)

**Endverdünnung I: 1:25000**

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

## 7 TESTDURCHFÜHRUNG

### 7.1 Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von α1-Antitrypsin in Stuhl.

Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte polyklonale Antikörper, die humanes α1-Antitrypsin erkennen, verwendet.

Standards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf α1-Antitrypsin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen polyklonalen Kaninchen anti-α1-Antitrypsin-Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das α1-Antitrypsin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat, ein peroxidasemarkierter Schaf-anti-α1-Antitrypsin-Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes α1-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 α1-Antitrypsin-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### 7.2 Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur** (15 °C - 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 °C - 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 DRG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1. Die Vertiefungen **vor Gebrauch 5x 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 °C - 30 °C) unter **Schütteln\*** inkubieren.
4. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5x 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 °C - 30 °C) unter **Schütteln\*** inkubieren.
7. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5x 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 Minuten\*\* bei Raumtemperatur** (15 °C - 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. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei **405 nm** gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

\* 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 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:

$$\text{höchste Konzentration der Standardkurve} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{Analytische Sensitivität} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

## 10 QUALITÄTSKONTROLLE

DRG 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 DRG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### 10.1 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 Normwertbereich zu etablieren.

## 11 TESTCHARAKTERISTIKA

### 11.1 Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als B0 + 2 SD. Gemessen wurde 20-mal der Null-Standard.

Die Ergebnisse wurden ermittelt in Bezug auf die Konzentration der Kalibrationskurve und ergaben ohne Berücksichtigung des Probenverdünnungsfaktors eine Nachweisgrenze von 0,72 µg/L.

### 11.2 Präzision und Reproduzierbarkeit

#### Intra-Assay (n = 20)

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Eine Normalprobe und eine pathologische Probe wurden 20-mal in einem α1-Antitrypsin ELISA von einer Person angesetzt.

Probe	α-1-Antitrypsin [mg/dL]	VK [%]
1	15,2	4,5
2	42,2	13,1

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

Es wurde die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen geprüft. Eine Normalprobe und eine pathologische Probe wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im α1-Antitrypsin ELISA gemessen.

Probe	α-1-Antitrypsin [mg/dL]	VK [%]
1	16,15	9,8
2	54,46	14,8

### 11.3 Spike-Wiederfindung

Verschiedene α1-Antitrypsin Proben wurden mit unterschiedlichen Spikes gemessen (n=4).

Probe	Ungespikte Probe [µg/L]	Spike [µg/L]	α-1-Antitrypsin erwartet [µg/L]	α-1-Antitrypsin gemessen [µg/L]
A	6,3	1,65	7,95	7,2
		5,0	11,3	11,4
		15,0	21,3	20,9
		45,0	51,3	46,7
B	5,6	1,65	7,3	7,0
		5,0	10,6	10,9
		15,0	20,6	17,5
		45,0	50,6	46,7

### 11.4 Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen im Stuhl gefunden.

Es wurde keine Kreuzreaktivität mit α1-Antitrypsin im Mausserum gefunden.

### 11.5 Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben mit bekannter α1-Antitrypsin Konzentration wurden seriell verdünnt und gemessen. Gegenübergestellt sind die erwartete (berechnete) und die gemessene α1-Antitrypsin Konzentration (n= 2).

Probe	Verdünnung	Erwartet [mg/dL]	Gemessen [mg/dL]
A	1:12 500	48,0	48,88
	1:25 000	24,5	23,25
	1:50 000	12,3	11,9
	1:100 000	6,1	6,0
B	1:12 500	158,4	158,4
	1:25 000	79,3	99,0
	1:50 000	39,6	33,0
	1:100 000	19,8	22,1

### 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 giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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.
- 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 DRG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.



## 15 REFERENCES/LITERATURE / 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. *Ärztezeitschrift 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 α1-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. 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. α1-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.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité