

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com



Instruction For Use

2016-07

ORG 286 Alpha-1-Antitrypsin

INTENDED USE AND CLINICAL INDICATION

Alegria® Alpha-1-Antitrypsin is an ELISA-based test system for the quantitative measurement of Alpha-1-Antitrypsin in human stool samples. This product is intended for professional in vitro diagnostic use only.

Determination of the alpha-1-antitrypsin concentration in stool is used to evaluate the activity level of chronic inflammatory bowel diseases. Alpha-1-Antitrypsin can be found in stool during intestinal protein leakage, or increased permeability of the intestinal mucosa. Increased values can also occur during celiac disease, polyps, diverticulitis, colon cancer, food allergies etc.

SYMBOLS USED

| | |
|--|------------------------------------|
| | In vitro diagnostic medical device |
| | Manufacturer |
| | Catalogue number |
| | Sufficient for ... determinations |
| | Batch code |
| | Use by |
| | Temperature limitation |
| | Consult instructions for use |
| | Keep away from sunlight |

| | |
|--|-------------------------|
| | Alegria® Test Strips |
| | Wash Buffer |
| | System Fluid |
| | Stool Extraction Medium |
| | Ready to use |

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Determination of the alpha-1-antitrypsin concentration in stool is used to evaluate the activity level of chronic inflammatory bowel diseases. In addition, faecal alpha-1-antitrypsin is also a marker for protein leakage or increased permeability of the intestinal mucosa when the mucosal barrier is not intact.

This protein is a primary inhibitor that reversibly forms complexes with serine proteases in the digestive tract and with active inflammatory immune cells. In contrast to the digestive enzymes trypsin and chymotrypsin, the elastase of polymorphonuclear neutrophil granulocytes (PMN-elastase) is a proteolytic enzyme that is released during inflammatory processes. Alpha-1-antitrypsin binds to PMN-elastase and ensures that their proteolytic activity is limited to the inflamed area. Alpha-1-antitrypsin thus plays an important regulatory and anti-inflammatory role, preventing an attack on neighbouring healthy tissue during an inflammatory event. This function makes alpha-1-antitrypsin an indicator for active inflammatory processes.

Excretion of alpha-1-antitrypsin with stool is also a marker for the crossing of serum proteins into the intestinal lumen. Elevated values for alpha-1-antitrypsin in stool are primarily found in cases of ulcerative colitis and Crohn's disease. However, they are also found in cases of enteral protein leakage from other causes, such as Wipple's disease, necrotising enterocolitis, intestinal tuberculosis, celiac disease, intestinal lymphoma, or systemic lupus erythematosus. The levels of alpha-1-antitrypsin may also be elevated in patients with intestinal polyps, colon cancer, diverticulitis, food allergies, and pregnancy.

Alpha-1-antitrypsin is an independent indicator of activity for Crohn's disease. Studies show there is also good correlation with anatomical extent of the disease. Measurement of alpha-1-antitrypsin values in stool are also a good way to monitor the success of treatment, detect oncoming flare-ups, and determine the extend of residual inflammation after surgery.

PRINCIPLE OF THE TEST

Alpha-1-Antitrypsin contained in a stool sample has to be released from the stool with stool extraction medium. Then, extracted Alpha-1-Antitrypsin can be analyzed with the Alegria® Alpha-1-Antitrypsin assay.

The Alegria® assay features barcoded 8-well-microstrips, called Alegria® Test Strips. Each strip is designed for a single determination of one patient sample. The Alegria® Test Strip holds a complete set of reagents. Included are enzyme conjugate, enzyme substrate, sample buffer and a test specific control. Furthermore each strip has two antibody-coated wells which serve as reaction wells for one control and one patient sample.

The determination is based on an indirect enzyme linked immune reaction with the following steps: Alpha-1-Antitrypsin present in control / positive samples binds to the surface of the reaction wells forming an antibody-antigen-complex. After incubation, a first washing step removes unbound and unspecifically bound molecules. Subsequently added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen-complex. After incubation, a second washing step removes unbound enzyme conjugate. Addition of enzyme substrate solution results in hydrolysis and colour development during incubation. The intensity of the blue colour correlates with the concentration of the antibody-antigen-complex and can be measured photometrically at 650 nm. The Alegria® Test Strip is based on the proprietary SMC®-Technology (Sensotronic Memorized Calibration): information about the assay, analysis and evaluation, and the lot-specific expiry date is contained on the barcode printed on each Alegria® Test Strip.

The Alegria® Test Strip can be used with the diagnostic instrument Alegria® - a fully automated Random Access Analyser. By means of SMC®-Technology data encoded on the barcode are transferred from the Alegria® Test Strip to the instrument and the assay is automatically processed and evaluated. The instrument reads the date of expiry and rejects further processing if the Alegria® Test Strip is out of date.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- All reagents of this kit are intended for professional in vitro diagnostic use only.
- The control contains material of human origin. Since no test can guarantee the absence of infective agents in human material, we recommend handling Alegria® Test Strips as potentially infective material.
- Bovine serum albumin (BSA) used in components has been tested for BSE and found negative.
- Avoid contact with the substrate TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine).
- System fluid contains acid, classification is non-hazardous. Avoid contact with skin.
- Control, sample buffer, stool extraction medium and wash buffer contain sodium azide 0.09% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
- Enzyme conjugate, control and sample buffer contain ProClin 300 0.05% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.

During handling of all reagents, controls and serum samples observe the existing regulations for laboratory safety

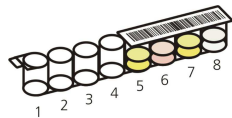
regulations and good laboratory practice:

- First aid measures: In case of skin contact, immediately wash thoroughly with water and soap. Remove contaminated clothing and shoes and wash before reuse. If system fluid comes into contact with skin, wash thoroughly with water. After contact with the eyes carefully rinse the opened eye with running water for at least 10 minutes. Remove contact lenses if this can be done easily. Get medical attention if necessary. Respiratory tract: take person to the fresh air. Swallowing: Rinse the mouth and spit the fluids out. Drink 1 - 2 glasses of water immediately. During spontaneous vomiting hold the head of the casual low with the body in a prone position in order to avoid the penetration of vomit into the air tube.
 - Personal precautions, protective equipment and emergency procedures: Observe laboratory safety regulations. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled. When spilled, absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal.
 - Exposure controls / personal protection: Wear protective gloves of nitril rubber or natural latex. Wear protective glasses. Used according to intended use no dangerous reactions known.
 - Conditions to avoid: Since substrate solution is light-sensitiv. Store Alegria® strips in the dark.
 - For disposal of laboratory waste the national or regional legislation has to be observed.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.

CONTENTS OF THE KIT

▽ 24 ORG 286

ALEGRIA TEST STRIPS



Sufficient for 24 determinations

Alegria® Test Strips are modules of 8 wells each composed of:
Wells 1 + 2: empty and not coated (wells for the sample dilution)
Wells 3 + 4: coated with antibody (reaction wells)

Well 5: **Control**: yellow; containing alpha-1-Antitrypsin, PBS, BSA, detergent, preservative sodium azide 0.09% and ProClin 300 0.05%.

Well 6: **Enzyme Conjugate**; light red; containing alpha1-Antitrypsin antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative ProClin 300 0.05%.

Well 7: **Sample Buffer**: yellow; containing TBS, stabilizing protein, detergent, preservative sodium azide 0.09%.

Well 8: **TMB Substrate**: clear; containing 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin.

Alpha-1-Antitrypsin antibodies are bound to microwells.

Product code on barcode: **alpha1 Antitr Stool**

WASH

1x 20 ml **Wash Buffer**, containing Tris, detergent, preservative sodium azide 0.09%; 50 x concentrate.

SYSTEM FLUID

1x 2.5 ml **System Fluid**, contains acid; 1000 x concentrate.

EXTRACT

1x 20 ml **Stool Extraction Medium**; containing TBS, stabilizing protein, extraction reagent, preservative sodium azide 0.09%. Ready to use. (**F5126**)



1 Alegria® Instruction for Use: Alegria® Mini-DVD



1 Certificate of Analysis

MATERIALS REQUIRED

- Vortex mixer, rocking shaker, benchtop centrifuge, optional: precision scales
- Pipettes for 10 µl
- Measuring cylinder for 1000 ml and 2500 ml, microtubes
- Distilled or deionized water

AUXILIARY IVD REAGENTS

- F5126 **EXTRACT** Stool Extraction Medium; ready to use, 20 ml.
This kit component is also available separately.

FURTHER ACCESSORIES

- ORG 282 Stool Extraction Tubes; containing 100 tubes.
- SSCO Stool Sample Collector; containing 100 pieces.
These auxiliaries are available separately.

STORAGE AND STABILITY

- Store test kit at 2-8 °C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store Alegria® Test Strips sealed and desiccated in the clip bag provided.
- Shelf life of the unopened test kit is 15 months from day of production.
Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.
- Diluted Wash Buffer and System Fluid are stable for at least 30 days when stored at 2-8 °C.
Once transferred to the reagent container we recommend consumption on the same day.

PROCEDURAL NOTES

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- All materials must be at room temperature (20-28 °C) prior to use.
- To avoid carryover or contamination, change the pipette tip between samples.

SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION, STORAGE AND HANDLING

Collecting stool samples

Stool Sample Collector (SSCO) may be used.

- Avoid contamination with toilet water containing disinfectants.
- Keep the collected stool sample no longer than 5 days at 2-8 °C or store at -20 °C no longer than 1 month.

Preparing stool sample

Extraction of Alpha-1-Antitrypsin using Stool Extraction Tube (ORG 282)

For the Alegria® Alpha-1-Antitrypsin assay the stool sample has to be diluted 1:50 in the **EXTRACT** provided. Inhomogeneous samples should be homogenised prior to sampling, e.g. by using an inoculation loop.

For liquid stool samples we recommend to weigh out sample (see below method without extraction tube).

1 Prepare Stool Extraction Tube (ORG 282)

Stool sample and **EXTRACT** have to be at room temperature.

Fill 750 µl **EXTRACT** into the transparent tube (part 1) and lock with the spatula (part 2) with the blue closure thread at the tube.

2 Pick stool sample

Open tube and pull out spatula at the orange closure thread.

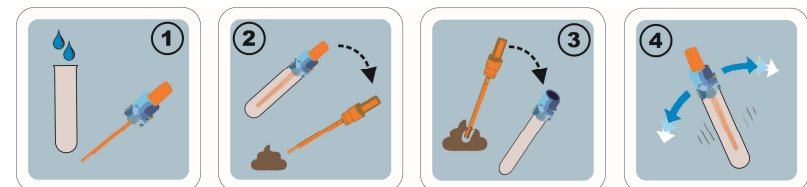
Remove the stool sample by picking the spatula into the stool. The notches of the spatula need to be fully covered with stool sample. This results in picking 15 mg of stool.

3 Portion stool sample

Press the orange dosing spatula into the blue cone insert of the tube. The surplus stool is wiped off by the cone insert. **The resulting dilution is 1:50.**

4 Extraction

Vortex 30 sec at 1800 rpm to remove stool sample from the notches of the spatula. Further homogenize for 15 min at top speed on a rocking shaker.



Open the tube at the blue cone insert and transfer the homogenate to a microtube. Centrifuge for 2 min at 3000xg. Transfer clear fluid to another microtube and test for Alpha-1-Antitrypsin **immediately**.
Extracted stool sample may be stored at 2-8°C for up to 5 days, or at -20°C for up to 1 week.

Extraction without Stool Extraction Tube (ORG 282)

- Stool sample and **EXTRACT** have to be at room temperature.

• Weigh out empty tube. Pick stool sample and transfer to tube. Weigh out and determine net weight of sample.

• Fill **EXTRACT** into the tube: 49-times net weight of sample needed to gain a 1:50 dilution

| | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| stool sample + EXTRACT | stool sample + EXTRACT |
| 15 mg + 0.75 ml | 60 mg + 2.9 ml |
| 20 mg + 1.0 ml | 70 mg + 3.4 ml |
| 30 mg + 1.5 ml | 80 mg + 3.9 ml |
| 40 mg + 2.0 ml | 90 mg + 4.4 ml |
| 50 mg + 2.5 ml | 100 mg + 4.9 ml |

Close tube. Vortex 30 sec at 1800 rpm. Further homogenize for 15 min at top speed on a rocking shaker. Open tube. Transfer the homogenate to a microtube. Centrifuge for 2 min at 3000xg. Transfer clear fluid to another microtube and test for Alpha-1-Antitrypsin **immediately**.
Extracted stool sample may be stored at 2-8°C for up to 5 days, or at -20°C for up to 1 week.

PREPARATION OF REAGENTS

WASH

Dilute the content of the Wash Buffer concentrate (50x) with distilled or deionized water to a final volume of 1000 ml prior to use. Transfer the diluted Wash Buffer into the instrument reagent container. If only one Alegria run is to be performed on one day we recommend transferring only 500 ml diluted Wash Buffer.

SYSTEM FLUID

Dilute the content of the System Fluid concentrate (1000x) with distilled or deionized water to a final volume of 2500 ml prior to use. Transfer the diluted System Fluid into the instrument reagent container.

ALEGRIA TEST STRIPS

Take the required number of Alegria® Test Strips out of the clip bag and let them reach room temperature (20-28 °C). Do not remove foil covering the empty wells until you are ready to start the assay.

EXTRACT

Ready to use

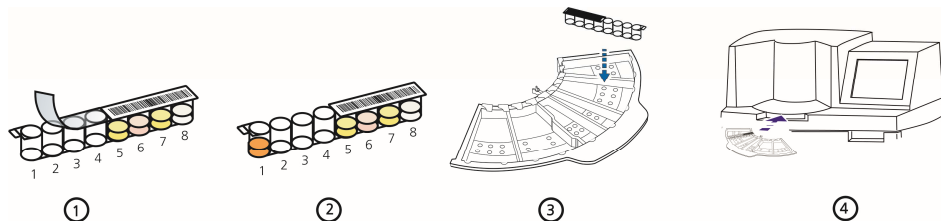
TEST PROCEDURE

Alegria® Test Strips with SMC® technology are used with the diagnostic instrument Alegria®. Detailed information about operating the instrument can be taken from the Instrument User Manual.

(1) Remove the foil from the empty wells 1 to 4 of the Alegria® Test Strip.

Do not remove foil with printed barcode, covering wells 5 to 8.

- (2) Pipette **10 µl extracted stool sample** at the bottom of well 1.
 (3) Insert the strip into the SysTray.
 (4) Place loaded SysTrays into the correct position in the Alegria® instrument and start run. All further steps will be done automatically. The test run is completed when the instrument starts printing the results.



CALIBRATION

The assay system is calibrated using a Alpha-1-Antitrypsin reference preparation.

CALCULATION OF RESULTS

By means of SMC® Technology (Sensotronic Memorized Calibration), all test data are transferred to the system through individual barcodes on the Alegria® Test Strip. Calculation and interpretation of results will be performed automatically.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range

The calculation range of this Alegria® assay is 80 - 3600 µg/g

Expected values

In a normal range study with samples from healthy donors the following ranges have been established with this Alegria® assay: Cut-off 400 µg/g

Interpretation of results

| | |
|-----------------|------------|
| Normal range | < 400 µg/g |
| Elevated values | ≥ 400 µg/g |

Linearity

Samples containing Alpha-1-Antitrypsin were serially diluted in **Stool Extraction Medium** to demonstrate the dynamic range of the assay. Activity for each dilution was calculated by means of SMC® Technology.

| Sample | Factor | Observed | Expected | O/E |
|--------|--------|----------|----------|-----|
| | | [µg/g] | [µg/g] | [%] |
| 1 | 1 | 2443.0 | 2443.0 | 100 |
| | 2 | 1168.8 | 1221.5 | 96 |
| | 4 | 581.5 | 610.8 | 95 |
| | 8 | 275.0 | 305.4 | 95 |
| 2 | 16 | 156.1 | 152.7 | 90 |
| | 1 | 2000.0 | 2000.0 | 100 |
| | 2 | 1067.7 | 1000.0 | 107 |
| | 4 | 544.8 | 500.0 | 109 |
| 3 | 8 | 266.5 | 250.0 | 107 |
| | 1 | 1671.5 | 1671.5 | 100 |
| | 2 | 888.7 | 835.8 | 106 |
| | 4 | 445.2 | 417.9 | 107 |
| | 8 | 244.6 | 208.9 | 117 |

Sensitivity

Lowest detectable concentration: 139 µg/g

Reproducibility

Intra-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 20 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Inter-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 2 determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

| Intra-Assay | | |
|-------------|-----------|------|
| Sample | Mean µg/g | % CV |
| 1 | 357.8 | 5.8 |
| 2 | 660.7 | 9.0 |
| 3 | 2777.0 | 6.6 |

| Inter-Assay | | |
|-------------|-----------|------|
| Sample | Mean µg/g | % CV |
| 1 | 433.7 | 5.0 |
| 2 | 2578.4 | 9.7 |
| 3 | 2736.2 | 8.7 |

Interfering substances

The following substances were tested per 15 mg of stool sample and were found to be non-interfering: Vancomycin hydrochlorid 0.201 mg, Ciprofloxacin 0.15 mg, Plevazid 0.006 mg, Azathioprine 0.021 mg, Prednisone 0.003 mg, Pentasa 0.399 mg, Vitamin A 2.4 UI, Vitamin C 0.015 mg, Vitamin E 0.03 mg, Vitamin D3 0.33 UI, Hemoglobin 1.749 mg.

The following microorganisms were tested at 1.1×10^7 CFU per 15 mg of stool sample and were found to be non-interfering: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*.

Study results

171 samples were tested against a comparative method. The study population contained 60 samples from asymptomatic donors, 38 samples from hospitalized patients without further information and 74 samples from hospitalized patients with bowel disease or other abdominal disorders.

169 of 171 samples showed matching results which concludes in 98.8 % agreement.

| | | Reference method | | |
|---------------------|------|------------------|-----|-----|
| | | pos | neg | |
| ORG 286 | pos | 52 | 1 | 171 |
| | neg | 1 | 117 | |
| | | 53 | 118 | |
| Positive agreement: | 98.1 | % | | |
| Positive agreement: | 99.2 | % | | |
| Overall agreement | 98.8 | % | | |

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

The above pathological and normal reference ranges in patient stool samples should be regarded as recommendations only. Each laboratory should establish its own ranges according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.

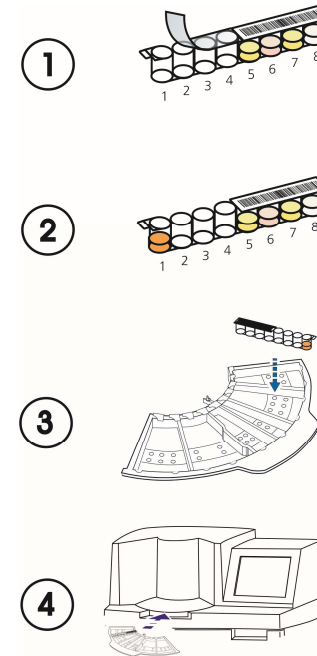
Results above 3600 µg/g measuring range: we recommend to predilute the extracted stool sample in Stool Extraction Medium e.g. 1:5 and retest using 10µl predilution in well 1 as described in section TEST PROCEDURE. Multiply the result by dilution factor e.g. factor 5.

REFERENCES

- Rodriguez-Otero P, Porcher R, Peffault de LR, Contreras M, Bouhnik Y, Xhaard A, Andreoli A, Ribaud P, Kapel N, Janin A, Socie G and Robin M.: "Fecal calprotectin and Alpha-1-Antitrypsin predict severity and response to corticosteroids in gastrointestinal graft-versus-host disease". *Blood* 2012. **119**: 5909-5917.
- Hagen LE, Schechter T, Luk Y, Brodovitch A, Gassas A, Doyle JJ: "High Alpha-1-Antitrypsin clearance predicts severity of gut graft-versus-host disease (GVHD) in children". *Pediatr Transplant*. 2011;15(6):659-663.
- Umar SB and DiBaise JK: "Protein-losing enteropathy: case illustrations and clinical review". *Am J Gastroenterol* 2010. **105**: 43-49.
- Braamskamp MJ, Dolman KM, and Tabbers MM, Clinical practice: "Protein-losing enteropathy in children". *Eur J Pediatr* 2010. **169**: 1179-1185.
- Biancone L, Onali S, Calabrese E, Petruzzello C, Zorzi F, Condino G, Sica GS, and Pallone F: "Non-invasive techniques for assessing postoperative recurrence in Crohn's disease". *Dig Liver Dis* 2008. **40 Suppl 2**: S265-S270.
- Faust D, Raschke K, Hormann S, Milovic V, Stein J: "Regulation of alpha-1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells". *Clin Exp Immunol*. 2002 May; **128**(2):279-84.
- Faust D, Spirchez Z, Armbruster FP, and Stein J: "Determination of alpha-1-proteinase inhibitor by a new enzyme linked immunosorbant assay in feces, serum and an enterocyte-like cell line". *Z Gastroenterol* 2001. **39**: 769-774.
- Becker K, Frieling T, and Haussinger D: "Quantification of fecal Alpha-1-Antitrypsin excretion for assessment of inflammatory bowel diseases". *Eur J Med Res* 1998. **3**: 65-70.
- Choudhary S, Gibson PR, Deacon MC, Young GP: "Measurement of faecal Alpha-1-Antitrypsin: methodologies and clinical application". *J Gastroenterol Hepatol*. 1996 Apr;11(4):311-8.
- Arndt B, Schürmann G, Betzler M, Herfarth C, Schmidt-Gayk H: "Assessment of Crohn's disease activity and alpha 1-antitrypsin in faeces". *Lancet*. 1992 Oct 24, **340**(8826):1037.
- Boege F and Fischbach W: "Structural heterogeneity of faecal Alpha-1-Antitrypsin shown by immunoblot

analysis in patients with Crohn's disease". *Gut* 1991. **32**: 496-499.

- Strygler B, Nicar MJ, Santangelo WC, Porter JL, Fordtran JS: "Alpha-1-Antitrypsin excretion in stool in normal subjects and in patients with gastrointestinal disorders". *Gastroenterology*. 1990 Nov; **99**(5):1380-7.
- Karbach U, Ewe K: "Enteric protein loss in various gastrointestinal diseases determined by intestinal Alpha-1-Antitrypsin clearance". *Z Gastroenterol*. 1989 Jul; **27**(7):362-5.
- Bjarnason I. Gastrointestinal safety of NSAIDs and over-the-counter analgesics. *Int J Clin Pract Suppl*. 2013 (178):37-42.
- Bjarnason I, Zanelli G, Prouse P, Smethurst P, Smith T, Levi S, et al. Blood and protein loss via small-intestinal inflammation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet*. 1987;2(8561):711-4.



ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com



Notice d'utilisation

2016-07

ORG 286 Alpha-1-Antitrypsin

DESCRIPTION ABREGEE

Alegria® Alpha-1-Antitrypsin est un test ELISA quantitatif de la Alpha-1-Antitrypsin dans les échantillons de selles humaines à utiliser dans l'évaluation des problèmes d'inflammations intestinales. Ce produit est destiné à être utilisé exclusivement par du personnel qualifié dans le cadre d'un diagnostic in vitro.

La détermination de la concentration en alpha-1-antitrypsine dans les selles permet d'évaluer le niveau d'activité des maladies intestinales inflammatoires chroniques. L'antitrypsine alpha-1 peut être trouvée dans les selles lors d'une fuite de protéine au niveau intestinal ou dans le cas d'une augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale. On peut également observer une augmentation des valeurs dans la maladie coeliaque, en présence de polypes, d'une diverticulite, de cancer du côlon, d'allergies alimentaires, etc.

SYMBOLES UTILISÉS

| | |
|--|--|
| | Dispositif médical de diagnostic in vitro |
| | Fabricant |
| | Référence du catalogue |
| | Suffisant pour |
| | Code du lot |
| | utiliser jusqu'au |
| | Limites de température |
| | Consulter la notice d'utilisation |
| | Conserver à l'abri de la lumière du soleil |

| | |
|--|---|
| | Barrettes test Alegria® |
| | Tampon de lavage |
| | Le fluide du système |
| | Milieu d'extraction pour les échantillons de selles |
| | Prêt à l'emploi |



PRINCIPE DU TEST

La Alpha-1-Antitrypsin contenue dans un échantillon de selles doit être extraite des selles à l'aide d'un milieu d'extraction. Ensuite, la Alpha-1-Antitrypsin extraite peut être analysée à l'aide du test Alegria® Alpha-1-Antitrypsin.

Le test Alegria® est fourni avec des barrettes de microtitration portant un code à barres à 8 puits, appelées barrettes test Alegria®. Chaque barrette est à usage unique, sur un seul échantillon patient. La barrette test Alegria® est fournie avec un ensemble complet de réactifs, composés de conjugué enzymatique, de substrat d'enzyme, de diluant d'échantillon et d'un contrôle spécifique du test. De plus, chaque barrette test présente deux puits contenant d'anticorps spécifiques au test, qui font office de puits de réaction pour un contrôle et un échantillon patient.

La réaction est basée sur le principe de l'ELISA indirect, avec les étapes suivantes : la Alpha-1-Antitrypsin présente dans les échantillons de contrôle/positifs se lie à la surface des puits de réaction, formant ainsi un complexe anticorps-antigène.

Après l'incubation, une première étape de lavage élimine les molécules non liées et les molécules liées non spécifiques. Le conjugué enzymatique fourni ajouté par la suite se lie aux complexes antigènes-anticorps qui se forment. Après l'incubation, une seconde étape de lavage élimine le conjugué enzymatique superflu. L'ajout de solution de substrat d'enzyme entraîne l'hydrolyse et le développement de coloration pendant l'incubation. L'intensité de la coloration bleutée varie en fonction de la concentration des complexes antigènes-anticorps et est mesurée à 650 nm par un module optique.

La barrette test Alegria® se base sur la technologie propriétaire SMC® (Sensotronic Memorized Calibration) : chaque barrette test Alegria® contient des informations sur le test, l'analyse et l'évaluation ainsi que la date d'expiration spécifique au lot qui sont imprimées sur le code à barres.

La barrette test Alegria® peut être utilisée avec l'instrument de diagnostic Alegria®, un analyseur à accès aléatoire totalement automatisé. La technologie SMC® permet de transférer les données encodées de la barrette test Alegria® vers l'instrument et le test est automatiquement traité et évalué. L'instrument lit la date d'expiration et refuse de continuer le traitement si la date de la barrette test Alegria® est dépassée.

AVERTISSEMENT ET PRECAUTIONS D'USAGE

- Tous les réactifs de ce système de test sont conçus pour être utilisés exclusivement par du personnel qualifié dans le cadre du diagnostic in vitro.
- Le contrôle interne contient du matériel d'origine humaine. Étant donné qu'aucun test ne peut garantir l'absence d'agents infectieux dans le matériel humain, nous recommandons de manipuler les bandelettes de test Alegria® comme du matériel potentiellement infectieux.
- L'albumine de sérum bovin (BSA), contenue dans des composants, est testée pour l'ESB et les résultats sont négatifs.
- Éviter tout contact avec le substrat d'enzyme TMB (3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine).
- Le liquide du système contiennent des acides. Leur concentration n'est pas dangereuse. Éviter tout contact avec la peau.
- Le contrôle, le diluant d'échantillon, milieu d'extraction et la solution de nettoyage contiennent 0.09 % d'azide de sodium comme conservateur. Sa concentration n'est pas dangereuse.
- Le conjugué enzymatique, le contrôle et le tampon d'échantillon contiennent 0.05 % de ProClin 300 comme conservateur. Sa concentration n'est pas dangereuse.

Lors de la manipulation des réactifs, des contrôles et des échantillons patient, les directives de sécurité en application dans le laboratoire et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être respectées :

- Mesures de premiers secours : En cas de contact avec la peau, laver immédiatement et abondamment à l'eau et au savon. Retirer les vêtements et les chaussures contaminés et les nettoyer avant de les porter. En cas de contact du liquide du système avec la peau, laver abondamment à l'eau. En cas de projection dans les yeux, rincer les yeux grand ouverts sous l'eau courante pendant au moins 10 minutes. Retirez vos lentilles de contact si vous pouvez le faire facilement. Voies respiratoires : prenez de l'air frais. En cas d'ingestion : Rincez-vous la bouche et crachez le liquide. Buvez un ou deux verres d'eau immédiatement. En cas de vomissement spontané, maintenez la tête plus bas que le corps sur le ventre pour éviter que le vomis passe dans les voies respiratoires.
- Mesures en cas de déversement de liquide accidentel : respecter les directives de sécurité des bonnes pratiques de laboratoire. Éviter tout contact avec la peau et les yeux. Ne pas avaler. Ne pas pipetter avec la bouche. Ne pas manger, boire, fumer ou se maquiller dans des zones de manipulation des échantillons ou des composants du produit. Absorber avec un matériel inerte et mettre au rebut de manière appropriée.
- Equipement de protection personnel : porter des gants de protection en nitril ou en latex. Porter des lunettes de protection. Dans le cadre d'une utilisation appropriée, aucun réactif n'est dangereux.

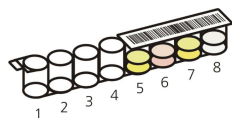
- Conditions spéciales : étant donné que le substrat TMB est photosensible, conserver les barrettes test Alegria® dans un endroit à l'abri de la lumière.
- Les déchets doivent être mis au rebut conformément aux réglementations nationales et locales sur la protection de l'environnement.

Il convient de respecter les directives de contrôle qualité des laboratoires médicaux en matière de manipulation de sérums de contrôle et / ou de test.

CONTENU DU COFFRET

▽ 24 ORG 286

ALEGRIA TEST STRIPS



Suffisant pour 24 dosages

Barrettes test Alegria® : composée de 8 puits chacun.

Puits 1 et 2: vides et non enduits (puits pour dilution de l'échantillon)

Puits 3 et 4: puits recouverts d'anticorps (puits de réaction)

Puit 5: Contrôle : jaune ; contient anti-Alpha-1-Antitrypsin, PBS, BSA, détergent; 0.09 % d'azide de sodium et 0.05 % de ProClin 300 comme conservateur.

Puit 6: Conjugué enzymatique: rouge clair ; contient des anticorps de Alpha-1-Antitrypsin couplés à la peroxydase, PBS, BSA, détergent ; 0.05 % de ProClin comme conservateur.

Puit 7: Diluant d'échantillon : jaune ; TBS, une protéine stabilisante, EDTA, de l'azoture de sodium en tant que conservateur (0.09 %).

Puit 8: Solution de substrat TMB: 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine.

Les Alpha-1-Antitrypsin anticorps sont enduits sur des plaques microtitres.

Code de produit sur le code à barres: **alpha1 Antitr Stool**

WASH

1x 20 ml Tampon de lavage; contient du tampon Tris, détergent, 0,09 % comme conservateur, concentré (50 x)

SYSTEM FLUID

1x 2.5 ml Le fluide du système contient de l'acide, concentré (1000 x)

EXTRACT

1x 20 ml **Milieu d'extraction pour les échantillons de selles**; contenant du TBS, une protéine stabilisante, un réactif d'extraction, de l'azoture de sodium en tant que conservateur (0.09 %). Prêt à l'emploi.

i

1 Mode d'emploi Alegria®. Mini-DVD Alegria®

i

1 Certificat de contrôle qualité

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Agitateur vortex, agitateur, centrifugeuse de paillasse, en option : balances de précision
- Micropipettes avec des cônes à usage unique pour 10 µl
- Eau distillée ou désionisée
- Epruvette graduée pour 1000 ml et 2500 ml

RÉACTIFS AUXILIAIRES DE DIAGNOSTIC IN VITRO

- F5126 **EXTRACT** Stool Extraction Medium; Cette partie du kit est aussi vendus séparément.

AUTRES ACCESSOIRES

- ORG 282 Stool Extraction Tubes; contenant 100 tubes.
 - SSCO Stool Sample Collector; contenant 100
- Ces auxiliaires sont vendus séparément.

STOCKAGE ET STABILITE

- Stocker le kit de test entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière.
- Ne pas exposer les réactifs à la chaleur, au soleil ou à une lumière forte pendant leur stockage et leur utilisation.
- Conserver les barrettes test Alegria® dans le sachet refermable fourni avec le dessiccateur.
- Le produit peut être conservé pendant 15 mois à partir du jour de sa production s'il n'est pas ouvert. Les réactifs qui ne sont pas ouverts restent stables jusqu'à la date d'expiration du produit. Se reporter à l'étiquette de chaque lot.
- Le tampon de lavage et le liquide du système dilués restent stables pendant au moins 30 jours, entre 2 et 8 °C. Nous recommandons d'utiliser la solution du flacon de réactif Alegria® en une journée.

RECOMMANDATIONS

- Le kit d'analyse ne peut pas être utilisé après la date de péremption.
- Avant le début du test, la barrettes réactive et les prélèvements devraient être mis à disposition durant 30 minutes à température ambiante.
- Afin d'éviter la contamination, le prélèvement devrait être pipeté avec une pointe de pipette neuve.

PRÉLÈVEMENT, STOCKAGE ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Prélèvement d'échantillons de selles

Un collecteur "Stool Sample Collector" (SSCO) peut être utilisé.

- Évitez toute contamination avec l'eau de la toilette qui contient des désinfectants.
- Conservez l'échantillon de selles collecté maximum 5 jours à une température comprise entre 2 et 8 °C. Sinon, conservez-le à une température de -20 °C pendant 1 mois maximum.

Préparation de l'échantillon de selles

Extraction de la Alpha-1-Antitrypsin à l'aide du "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

Pour le test Alegria® **Alpha-1-Antitrypsin**, l'échantillon de selles doit être dilué à **1:50** dans e **EXTRACT** fourni. Les échantillons non homogènes doivent être homogénéisés avant le traitement, par exemple à l'aide d'une anse d'inoculation. Pour les échantillons de selles liquides, nous recommandons de peser l'échantillon (voir ci-dessous la méthode sans tube d'extraction).

1 Préparez le tube "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

L'échantillon de selles et **EXTRACT** doivent être utilisés à température ambiante.

Versez **750 µl** de **EXTRACT** dans le tube transparent (partie 1) et fermez-le à l'aide de la spatule (partie 2) et du bouchon bleu sur le tube.

2 Prélevez l'échantillon de selles

Ouvrez le tube et retirez la spatule au niveau du bouchon orange.

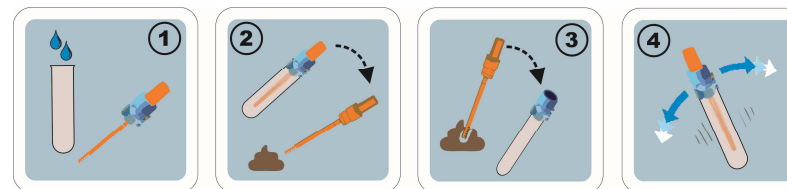
Prélevez l'échantillon de selles en utilisant la spatule. Les rainures de la spatule doivent être recouvertes de selles. Pour ce faire, prélevez **15 mg** de selles.

3 Divisez l'échantillon de selles

Enfoncez la spatule orange de dosage dans le cône bleu du tube. Le surplus de selles est supprimé dans le cône. La dilution est donc de **1:50**.

4 Extraction

Agitez pendant 30 secondes à 1800 tours/minute pour prélever les selles des rainures de la spatule. Homogénéiser pendant 15 min à la vitesse maxi sur un agitateur à balancier.



Ouvrez le tube dans le cône bleu et transférez l'échantillon homogène dans un microtube. Centrifugez pendant 2 minutes à 3 000 xg. Transférez le liquide transparent dans un autre microtube et testez immédiatement le prélèvement pour détecter **Alpha-1-Antitrypsin**.

Cet échantillon de selles extrait peut être stocké à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant maximum 5 jours ou à -20 °C pendant 1 semaine maximum.

Extraction de la Alpha-1-Antitrypsin sans tube "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

- L'échantillon de selles et **EXTRACT** doivent être utilisés à température ambiante.
- Pesez le tube vide. Prélevez un échantillon de selles et transférez-le dans le tube. Pesez l'échantillon et déterminez son poids net.
- Remplissez le **EXTRACT** dans le tube : Poids net de l'échantillon 49 fois pour une dilution **1:50**

échantillon de selles + **EXTRACT** échantillon de selles + **EXTRACT**
 15 mg + 0.75 ml 60 mg + 2.9 ml

| | | | | | |
|-------|---|--------|--------|---|--------|
| 20 mg | + | 1.0 ml | 70 mg | + | 3.4 ml |
| 30 mg | + | 1.5 ml | 80 mg | + | 3.9 ml |
| 40 mg | + | 2.0 ml | 90 mg | + | 4.4 ml |
| 50 mg | + | 2.5 ml | 100 mg | + | 4.9 ml |

Fermez le tube. Agitez 30 secondes à 1 800 tours/minute. Homogénéiser pendant 15 min à la vitesse maxi sur un agitateur à balancier. Ouvrez le tube. Transférez l'échantillon homogène dans un microtube. Centrifugez pendant 2 minutes à 3 000 xg. Transférez le liquide transparent dans un autre microtube et testez **immédiatement** le prélèvement pour détecter la **Alpha-1-Antitrypsin**.

Cet échantillon de selles extrait peut être stocké à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant maximum 5 jours ou à -20 °C pendant 1 semaine maximum.

PREPARATION DES REACTIFS

WASH

Le contenu de chaque bouteille de concentré de solution tampon de lavage (20 ml) doit être dilué - avant l'utilisation - par l'ajout d'eau distillée jusqu'à un volume final de 1000 ml (1 litre). La solution tampon de lavage est ensuite transvasée dans le récipient prévu à cet effet. Si un seul run d'Alegria® est effectué en une journée, nous recommandons de transvaser seulement 500 ml de solution de nettoyage diluée dans le flacon de réactif Alegria®.

SYSTEM FLUID

Le contenu de chaque flacon de concentré de fluide du système (1000x) doit être dilué à un volume final de 2500 ml par ajout d'eau distillée. Ce liquide est ensuite transvasé dans la bouteille prévue à cet effet.

ALEGRIA TEST STRIPS

Avant toute utilisation, retirer le nombre nécessaire de barrettes test Alegria® du sac refermable et les acclimater à température ambiante (20 à 28 °C). Retirer le film au dessus des puits vides juste avant le début du test.

EXTRACT

Prêt à l'emploi

MODE OPERATOIRE

L'analyseur Random Access Alegria® totalement automatisé utilise des barrettes test Alegria® avec la technologie SMC®. Le mode d'emploi de l'automate présente des informations précises sur le fonctionnement de l'automate.

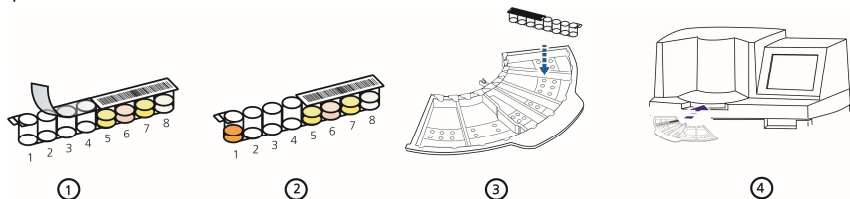
(1) Retirer uniquement le film recouvrant les cavités vides 1 à 4 de la barrette test.

Le film sur lequel le code à barres est imprimé et recouvrant les cavités 5 à 8 ne doit pas être retiré

(2) Déposer 10 µl de prélèvement non dilué du patient sur le fond de la cavité 1.

(3) Insérer les barrettes test Alegria® dans le SysTray.

(4) Mettre le SysTray chargé dans la position correcte au niveau de l'automate Alegria® et lancer le run. Les autres étapes se font automatiquement. Un run est terminé lorsque l'imprimante de l'automate Alegria® commence à imprimer les résultats.



CALIBRATION

Le système d'essai est étalonné en utilisant une préparation de Alpha-1-Antitrypsin de référence.

CALCUL DES RESULTATS

Les données des barrettes test Alegria® sont transférées dans le système de l'automate Alegria® à l'aide de la technologie SMC® (Sensotronic Memorized Calibration). Le calcul et l'interprétation des résultats a lieu de façon entièrement automatique.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Gamme de mesure

La plage de mesure est de 80 - 3600 µg/g

Valeur normale

Dans le cadre d'une étude de la plage normale avec des échantillons de donneurs de sains, les valeurs suivantes ont été définies : valeur limite 400 µg/g

Interprétation des résultats

Plage normale < 400 µg/g

Valeurs élevées ≥ 400 µg/g

Linéarité

Trois échantillons patient présentant une concentration Alpha-1-Antitrypsin élevée sont dilués de manière linéaire dans la **milieu d'extraction**, pour représenter la zone dynamique de l'échantillon, ainsi que les limites inférieure et supérieure de la linéarité. L'activité de chaque étape de dilution est mesurée à l'aide de la technologie SMC®.

| Echantillon | Dilution | Observé | Escompté | O/E |
|-------------|----------|---------|----------|-----|
| | | [µg/g] | [µg/g] | [%] |
| 1 | 1 | 2443.0 | 2443.0 | 100 |
| | 2 | 1168.8 | 1221.5 | 96 |
| | 4 | 581.5 | 610.8 | 95 |
| 2 | 8 | 275.0 | 305.4 | 95 |
| | 16 | 156.1 | 152.7 | 90 |
| | 1 | 2000.0 | 2000.0 | 100 |
| 3 | 2 | 1067.7 | 1000.0 | 107 |
| | 4 | 544.8 | 500.0 | 109 |
| | 8 | 266.5 | 250.0 | 107 |
| 4 | 1 | 1671.5 | 1671.5 | 100 |
| | 2 | 888.7 | 835.8 | 106 |
| | 4 | 445.2 | 417.9 | 107 |

Limite de détection

Concentration détectable la plus basse: 139 µg/g

Reproductibilité

Précision intra-test: le coefficient de variation (CV) est calculé pour trois échantillons à partir de 20 réalisées en un seul run. Les résultats de la précision intra-test sont récapitulés dans le tableau.

Précision inter-test: le coefficient de variation (CV) est calculé pour trois échantillon à partir de 2 réalisées en 5 runs. Les résultats de la précision inter-test sont récapitulés dans le tableau.

| Echantillon | Intra-test | |
|-------------|--------------|------|
| | Moyenne µg/g | % CV |
| 1 | 357.8 | 5.8 |
| 2 | 660.7 | 9.0 |
| 3 | 2777.0 | 6.6 |

| Echantillon | Inter-test | |
|-------------|--------------|------|
| | Moyenne µg/g | % CV |
| 1 | 433.7 | 5.0 |
| 2 | 2578.4 | 9.7 |
| 3 | 2736.2 | 8.7 |

Interférences

Les substances suivantes ont été testées pour 15 mg d'échantillon de selles et se sont avérées non interférentes : chlorhydrate de vancomycine 0,201 mg, ciprofloxacine 0,15 mg, prévazide 0,006 mg, azathioprine 0,021 mg, prednisonne 0,003 mg, pentasa 0,399 mg, vitamine A 2,4 UI, vitamine C 0,015 mg, vitamine E 0,03 mg, vitamine D3 0,33 UI, hémoglobine 1,749 mg.

Les microorganismes suivants ont été testés à raison de 1,1 x 10⁷ UFC pour 15 mg d'échantillon de selles et se sont avérés non interférents : E. coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella enterica, Shigella flexneri, Yersinia

enteroclitica.

Résultats d'étude

| | | Méthode comparative | | |
|---------------------|------|---------------------|-----|-----|
| | | pos | neg | |
| ORG 286 | pos | 52 | 1 | 171 |
| Alpha-1-Antitrypsin | neg | 1 | 117 | |
| | | 53 | 118 | |
| Accord positif: | 98.1 | % | | |
| Accord négatif: | 99.2 | % | | |
| Accord total: | 98.8 | % | | |

LIMITES DU TEST

Ce test est une aide au diagnostic. Un diagnostic clinique ne doit pas être basé sur les résultats d'un seul test, mais doit être fait par un médecin après évaluation de l'ensemble des résultats laboratoire et des éléments cliniques, en tenant compte de toute la clinique du patient. De plus, chaque décision de traitement doit être prise individuellement. Les plages pathologiques et normales de référence ci-dessus, dans les échantillons fécaux des patients, ne devraient être considérées qu'à titre de recommandations uniquement. Chaque laboratoire doit fonder ses propres gammes en fonction de la norme ISO 15189 ou d'autres lignes directrices applicables en laboratoire. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) entraînent une entéropathie proliférative chez entre 20 et 65 % des patients prenant ces médicaments. Les AINS peuvent conduire à des concentrations élevées de Alpha-1-Antitrypsin fécales. Dans ces cas, la réévaluation de la Alpha-1-Antitrypsin fécale après l'arrêt des AINS devrait être envisagée.

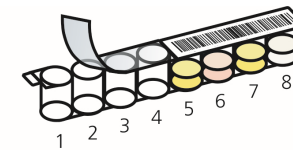
Intervalle de mesure des résultats ci-dessus (> 3600 µg/g) : nous recommandons de pré-diluer l'échantillon de selles extrait dans un milieu d'extraction de selles, par ex. à 1:5 et de refaire le test en utilisant 10 µl de pré-dilution dans le puits 1 comme le décrit le paragraphe PROCEDURE DE TEST. Multiplier le résultat par le facteur de dilution, par ex. facteur 5.

RÉFÉRENCES

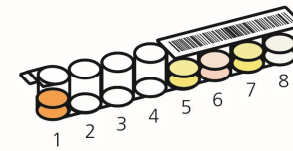
- Rodriguez-Otero P, Porcher R, Peffault de LR, Contreras M, Bouhnik Y, Xhaard A, Andreoli A, Ribaud P, Kapel N, Janin A, Socie G and Robin M: "Fecal calprotectin and Alpha-1-Antitrypsin predict severity and response to corticosteroids in gastrointestinal graft-versus-host disease". *Blood* 2012. **119**: 5909-5917.
- Hagen LE, Schechter T, Luk Y, Brodovitch A, Gassas A, Doyle JJ: "High Alpha-1-Antitrypsin clearance predicts severity of gut graft-versus-host disease (GVHD) in children". *Pediatr Transplant*. 2011;15(6):659-663.
- Umar SB and DiBaise JK: "Protein-losing enteropathy: case illustrations and clinical review". *Am J Gastroenterol* 2010. **105**: 43-49.
- Braamskamp MJ, Dolman KM, and Tabbers MM, Clinical practice: "Protein-losing enteropathy in children". *Eur J Pediatr* 2010. **169**: 1179-1185.
- Biancone L, Onali S, Calabrese E, Petruzzello C, Zorzi F, Condino G, Sica GS, and Pallone F: "Non-invasive techniques for assessing postoperative recurrence in Crohn's disease". *Dig Liver Dis* 2008. **40 Suppl 2**: S265-S270.
- Faust D, Raschke K, Hormann S, Milovic V, Stein J: "Regulation of alpha-1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells". *Clin Exp Immunol*. 2002 May; **128**(2):279-84.
- Faust D, Spirchez Z, Armbruster FP, and Stein J: "Determination of alpha-1-proteinase inhibitor by a new enzyme linked immunosorbant assay in feces, serum and an enterocyte-like cell line". *Z Gastroenterol* 2001. **39**: 769-774.
- Becker K, Frieling T, and Haussinger D: "Quantification of fecal Alpha-1-Antitrypsin excretion for assessment of inflammatory bowel diseases". *Eur J Med Res* 1998. **3**: 65-70.
- Choudhary S, Gibson PR, Deacon MC, Young GP: "Measurement of faecal Alpha-1-Antitrypsin: methodologies and clinical application". *J Gastroenterol Hepatol*. 1996 Apr; **11**(4):311-8.
- Arndt B, Schürmann G, Betzler M, Herfarth C, Schmidt-Gayk H: "Assessment of Crohn's disease activity and alpha 1-antitrypsin in faeces". *Lancet*. 1992 Oct 24, **340**(8826):1037.
- Boege F and Fischbach W: "Structural heterogeneity of faecal Alpha-1-Antitrypsin shown by immunoblot analysis in patients with Crohn's disease". *Gut* 1991. **32**: 496-499.
- Strygler B, Nicar MJ, Santangelo WC, Porter JL, Fordtran JS: "Alpha-1-Antitrypsin excretion in stool in normal

- subjects and in patients with gastrointestinal disorders". *Gastroenterology*. 1990 Nov; **99**(5):1380-7.
- Karbach U, Ewe K: "Enteric protein loss in various gastrointestinal diseases determined by intestinal Alpha-1-Antitrypsin clearance". *Z Gastroenterol*. 1989 Jul; **27**(7):362-5.
- Bjarnason I. Gastrointestinal safety of NSAIDs and over-the-counter analgesics. *Int J Clin Pract Suppl*. 2013 (178):37-42.
- Bjarnason I, Zanelli G, Prouse P, Smethurst P, Smith T, Levi S, et al. Blood and protein loss via small-intestinal inflammation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet*. 1987;2(8561):711-4.

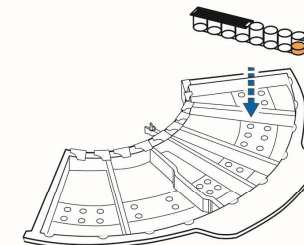
1



2



3



4



ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com



Instrucciones de uso

2016-07

ORG 286 Alpha-1-Antitrypsin

DESCRIPCIÓN BREVE

Alegria® Alpha-1-Antitrypsin es un sistema de prueba basado en el sistema ELISA para la medición cuantitativa de la Alpha-1-Antitrypsin en muestras fecales humanas para ser utilizado en la evaluación de enfermedades inflamatorias intestinales. Este producto se ha concebido exclusivamente para su uso profesional en el diagnóstico in vitro.

La determinación de la concentración de alfa-1 antitripsina se usa para evaluar el nivel de actividad de las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas. La alfa-1 antitripsina se puede encontrar en las heces durante la filtración de la proteína intestinal o mayor permeabilidad de la mucosa intestinal. También pueden ocurrir valores incrementados durante la enfermedad celíaca, pólipos, diverticulitis, cáncer de colon, alergias alimenticias, etc.

SÍMBOLOS UTILIZADOS

| | |
|--|--|
| | Producto sanitario para diagnóstico in vitro |
| | Fabricante |
| | Número de catálogo |
| | Válido para |
| | Código de lote |
| | Fecha de caducidad |
| | Limitación de temperatura |
| | Consúltense las instrucciones de uso |
| | Manténgase fuera de la luz del sol |

| | |
|--|--|
| | Tira de prueba Alegria® |
| | Solución de lavado |
| | El fluido del sistema |
| | Medio de extracción para muestras de heces |
| | Listo para el uso |



METODOLOGÍA

Para extraer la Alpha-1-Antitrypsin presente en una muestra fecal es necesario usar el cultivo de extracción. Después se podrá analizar la Alpha-1-Antitrypsin extraída con el análisis de Alegria® Alpha-1-Antitrypsin.

El kit de ensayo Alegria® dispone de microtiras de 8 pocillos con código de barras, llamadas tiras de ensayo Alegria®. Cada tira está diseñada para determinar una única muestra de paciente. La tira de ensayo Alegria® posee un juego completo de reactivos, que incluye conjugado de enzimas, sustrato de enzimas, tampón de muestra y un control específico de ensayo. Además cada tira tiene dos pocillos recubiertos de anticuerpos que sirven de pocillos de reacción para un control y una muestra de paciente.

La determinación se basa en una reacción inmunológica indirecta ligada a enzimas con los pasos siguientes: La Alpha-1-Antitrypsin presente en las muestras de referencia/ positivas se fija a la superficie de los pocillos de reacción creando un complejo antígeno- anticuerpo. Tras la incubación, un primer paso de lavado elimina las moléculas no ligadas y las moléculas ligadas no específicas. El conjugado de enzima añadido a continuación se liga al complejo anticuerpo-antígeno inmovilizado. Tras la incubación, un segundo paso de lavado elimina el conjugado de enzimas no ligado. La adición de la solución de sustrato de enzimas tiene como resultado la hidrólisis y el desarrollo del color durante la incubación. La intensidad del color azul guarda relación con la concentración del complejo anticuerpo-antígeno y puede medirse fotométricamente a 650 nm.

La tira de ensayo Alegria® se basa en la tecnología SMC® patentada (Calibración memorizada Sensotronic): la información sobre el ensayo, el análisis y la evaluación y la fecha de caducidad específica del lote se encuentran en el código de barras impreso en cada tira de ensayo Alegria®.

La tira de ensayo Alegria® se puede utilizar con el instrumento de diagnóstico Alegria® - un analizador de acceso aleatorio automatizado. Mediante la tecnología SMC®, los datos codificados en el código de barras se transmiten de la tira de ensayo Alegria® al instrumento y el ensayo se procesa y evalúa automáticamente. El instrumento lee la fecha de caducidad y rechaza un posterior procesado si la tira de ensayo Alegria® está caducada.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Todos los reactivos de este juego son para su uso profesional para el diagnóstico in vitro.
- El control interno contiene material de origen humano. Ya que no se puede garantizar con ninguna prueba la ausencia de agentes infecciosos en el material humano, recomendamos que maneje las tiras reactivas Alegria® como posible material infeccioso.
- Se le ha realizado la prueba de EEB a la albúmina de suero bovino (ASB) usada en los componentes y el resultado ha sido negativo.
- Evite el contacto con el sustrato TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbencidina).
- Los fluidos del sistema contienen ácidos, cuya clasificación es de no peligrosa. Evite el contacto con la piel.
- Los tampones de control, de muestra, cultivo para la extracción y de lavado contienen 0.09% de ácido de sodio como conservante. Esta concentración está clasificada como no peligrosa.
- Conjugado enzimático, control y tampón de muestra contienen ProClin 300 al 0.05% como conservante. Esta concentración está clasificada como no peligrosa.

Durante el tratamiento de todos los reactivos, de los controles y de las muestras de suero cumpla con la regulación vigente en materia de seguridad en el laboratorio y con las buenas prácticas de laboratorio:

Medidas de primeros auxilios: en caso de contacto con la piel, lave cuidadosamente la zona con agua y jabón. Quítese la ropa y el calzado contaminado y lávelos antes de volverlos a utilizar. Si la piel entra en contacto con los fluidos del sistema, lave la zona cuidadosamente con agua. En caso de contacto con los ojos, aclare con cuidado el ojo abierto con agua corriente durante al menos 10 minutos. Si lo puede hacer con facilidad, quítese las lentes de contacto. Vías respiratorias: saque a la persona al aire libre. Ingestión: enjuáguese la boca y escupa el líquido. Beba 1- 2 vasos de agua inmediatamente. Ante vómitos espontáneos, sujete la cabeza hacia abajo con el cuerpo en decúbito prono para evitar que el vómito se introduzca en las vías respiratorias.

• Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de urgencia:
Siga las regulaciones en materia de seguridad en el laboratorio. Evite el contacto con la piel y los ojos. No ingiera el producto. No pipetee nunca con la boca. No coma, beba, fume ni se aplique maquillaje en las zonas en las que se trabaja con las muestras o con los reactivos del juego. En el caso de derrame, absorba el producto con un material inerte y elimine el producto derramado como corresponda.

• Controles de exposición/ protección personal: utilice guantes de protección de caucho de nitrilo o de látex natural. Use gafas de protección. No se conocen reacciones peligrosas si se usa conforme a su fin.

• Condiciones que se deben evitar: la solución de sustrato es sensible a la luz, por lo que las tiras Alegria® se deben almacenar en un lugar oscuro.

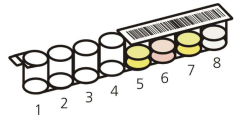
• Siga la normativa nacional o regional para eliminar los desechos del laboratorio.

Siga las directrices en materia de realización de controles de calidad en laboratorios médicos mediante controles de ensayo y/ o mezcla de sueros.

CONTENIDO DEL KIT

24 ORG 286

ALEGRIA TEST STRIPS



Válido para 24 determinaciones

Tira de prueba Alegria®: que consta de 12 módulos de 8 pocillos cada uno.

Pocillos 1 y 2: vacíos y sin revestimiento (pocillos para solución de muestras)

Pocillos 3 y 4: recubiertos de anticuerpos (pocillos de reacción)

Pocillo 5: **Control**; amarillo; contiene Alpha-1-Antitrypsin, PBS, ASB, detergente; conservante ácido de sodio 0.09% y ProClin 300 0.05%.

Pocillo 6: **Enzima conjugada**; rojo claro; contiene anticuerpos anti-Alpha-1-Antitrypsin, etiquetado HRP; PBS, ASB, detergente, conservante ProClin 0.05%.

Pocillo 7: **Tampón de muestra**; amarillo, contiene TBS, proteína estabilizadora, EDTA, azida sódica conservante 0.09%.

Pocillo 8: **TMB solución de sustrato**: 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina.

Los anticuerpos Alpha-1-Antitrypsin recubren los micropocillos.

Código de producto de código de barras: **alpha1 Antitr Stool**

WASH

1x 20 ml Solución de lavado; contiene Tris, detergente, conservante ácido de sodio 0,09%; 50x concentrado

SYSTEM FLUID

1x 2.5 ml El fluido del sistema; contiene ácido; 1000x concentrado

EXTRACT

1x 20 ml **Medio de extracción para muestras de heces**; contiene TBS, proteína estabilizadora, reactivo para la extracción, azida sódica conservante 0.09%. Listo para usarse.

i

1 Alegria® Instrucciones de uso: Alegria® Mini-DVD

i

1 Certificado de control de calidad

EQUIPOS REQUERIDOS DE LABORATORIO

- Mezclador Vortex, agitadora oscilante, centrifugadora de mesa, opcional: balanzas de precisión
- Micropipetas con jeringas de un solo uso para 10 µl
- Agua destilada o desionizada
- Probeta graduada para 1000 ml, 2500 ml

REACTIVOS AUXILIARES PARA EL ANÁLISIS IN VITRO

- F5126 **EXTRACT** Stool Extraction Medium. Este componente del kit también se vende por separado.

OTROS ACCESORIOS

- ORG 282 Stool Extraction Tubes; con 100 tubos.
- SSCO Stool Sample Collector; con 100

Estos accesorios se venden por separado.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

- Almacene el juego de prueba a 2-8°C en un lugar oscuro.
- No exponga los reactivos al calor, al sol o a una luz intensa durante su almacenamiento o uso.
- Almacene las tiras reactivas Alegria® selladas en la bolsa con pinza suministrada con un secante.
- El tiempo de conservación de los juegos de prueba sin abrir es de 15 meses desde la fecha de fabricación. Los reactivos sin abrir se mantienen estables hasta la fecha de caducidad del juego. Consulte las etiquetas de cada lote individual.
- Los tampones de lavado diluidos y los fluidos del sistema se mantienen estables durante al menos 30 días si se almacenan a 2-8°C. Recomendamos que se use en el mismo día una vez que se haya transferido al recipiente del reactivo.

NOTAS TECNICAS

- El juego de ensayo no se debe utilizar después de la fecha de vencimiento.
- El papel de ensayo y las muestras deben disponerse con temperatura de ambiente aprox. 30 minutos antes de iniciar el ensayo.

- Pipetear la muestra en el fondo de la cavidad. Para prevenir una arrastre, debe pipetearse la muestra siempre con una punta limpia de pipeta.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACION

Recogida de muestras fecales

Puede utilizar el colector "Stool Sample Collector" (SSCO).

- Evite que se contamine con agua del inodoro que contenga desinfectantes.
- Conserve la muestra de heces obtenida durante un plazo inferior a 5 días a 2-8 ° C. Otra opción es almacenarla a -20° C durante 1 mes como máximo.

Preparación de la muestra fecal

Extracción de la Alpha-1-Antitrypsin con el tubo "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

Para el análisis de Alegria® Alpha-1-Antitrypsin, se debe diluir la muestra de heces en **EXTRACT** suministrado a **1:50**. Las muestras heterogéneas se deberán homogeneizar antes del muestreo, por ejemplo, usando un asa de siembra. En el caso de muestras de heces líquidas, recomendamos que pese la muestra (vea el método explicado más abajo sin el tubo de extracción).

1 Prepare el tubo "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

La muestra de heces y **EXTRACT** deben estar a temperatura ambiente.

Llene el tubo transparente (parte 1) con **750 µl** del **EXTRACT** y ciérrelo con la espátula (parte 2) con la rosca de cierre azul en el tubo.

2 Recoja la muestra de heces

Abra el tubo y saque la espátula por la rosca de cierre naranja.

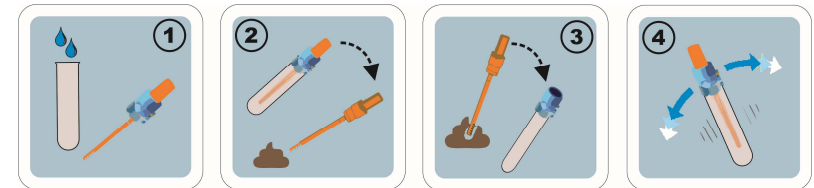
Recoja la muestra de heces introduciendo la espátula en las heces. Las ranuras de la espátula deberán estar totalmente recubiertas con la muestra de heces, para lo que deberá recoger **15 mg** de heces.

3 Divida la muestra de heces

Pulse la espátula dosificadora naranja para que se introduzca en el cono azul insertado en el tubo. El exceso de heces se eliminará por la pieza insertada cónica. La dilución resultante es **1:50**.

4 Extracción

Agite durante 30 segundos a 1800 rpm para retirar la muestra de heces de las ranuras de la espátula. Homogeneizar durante 15 min a máxima velocidad en un agitador basculante.



Abra el tubo por la pieza insertada cónica azul y transfiera el homogeneizado a un microtubo. Centrifugue durante 2 min. a 3000 xg. Transfiera el líquido limpio a otro microtubo y compruebe Alpha-1-Antitrypsin **inmediatamente**. Las muestras fecales extraídas de esta manera se pueden conservar a 2-8° C durante un máximo de 5 días o a -20° C durante un máximo de 1 semana.

Extracción Alpha-1-Antitrypsin sin el tubo "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

- La muestra de heces y **EXTRACT** deben estar a temperatura ambiente.
- Pese el tubo vacío. Coja una muestra de heces y transfírela al tubo. Vuelva a pesar el tubo y calcule el peso neto de la muestra.
- Llene el tubo con **EXTRACT**: será necesario 49 veces el peso neto de la muestra para lograr una dilución **1:50**.

| muestra de heces | + EXTRACT | muestra de heces | + EXTRACT |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 15 mg | + 0.75 ml | 60 mg | + 2.9 ml |
| 20 mg | + 1.0 ml | 70 mg | + 3.4 ml |
| 30 mg | + 1.5 ml | 80 mg | + 3.9 ml |
| 40 mg | + 2.0 ml | 90 mg | + 4.4 ml |
| 50 mg | + 2.5 ml | 100 mg | + 4.9 ml |

Cierre el tubo. Agite durante 30 seg. a 1800 rpm. Homogeneizar durante 15 min a máxima velocidad en un agitador basculante. Abra el tubo. Transfiera el homogeneizado a un microtubo. Centrifugue durante 2 min. a 3000 xg. Transfiera el líquido limpio a otro microtubo y compruebe Alpha-1-Antitrypsin **inmediatamente**. Las muestras fecales extraídas de esta manera se pueden conservar a 2-8° C durante un máximo de 5 días o a -20° C durante un máximo de 1 semana.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

WASH

El contenido de cada botella del concentrado de solución de lavado (20 ml) debe diluirse mediante adición de agua destilada para obtener un volumen final de 1000 ml (1 litro). La solución de lavado se vierte a continuación en un contenedor previsto. Si sólo se va a realizar una serie de Alegria en un día, recomendamos transferir solamente 500 ml de tampón de lavado diluido.

SYSTEM FLUID

Antes de la utilización diluya el contenido de cada botellita de concentrado de fluido del sistema (1000x) con agua destilada hasta alcanzar un volumen total de 2500 ml. El fluido del sistema será conducido seguidamente al contenedor previsto para ello.

ALEGRIA TEST STRIPS

Coja el número necesario de tiras reactivas Alegria® de la bolsa con pinza y espere hasta que alcancen la temperatura ambiente (20-28°C). No retire la lámina que cubre los pocillos vacíos hasta que esté preparado para empezar el ensayo.

EXTRACT

Listo para el uso

PROCEDIMIENTO

Las tiras reactivas Alegria® con tecnología SMC® se usan con el equipo de diagnóstico Alegria®. En el Manual de Usuario del equipo encontrará más información sobre su uso.

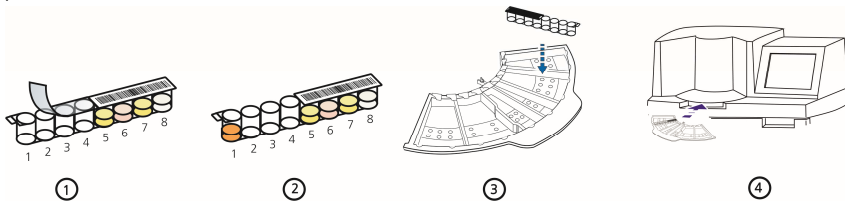
(1) De las láminas que cubren las cavidades 1 - 4 sólo deben ser retiradas la que cubren las tiras de prueba requeridas

No retire las láminas caracterizadas con un código de barras que cubren las cavidades 5 - 8.

(2) Pipetear 10 µl de muestra de paciente no diluida en el fondo de la cavidad 1.

(3) Introduzca la tira en el SysTray.

(4) Coloque los Systrays cargados en la posición correcta en el equipo Alegria® y comience la serie. Los siguientes pasos se realizarán de manera automática. La serie de prueba habrá terminado cuando el equipo comience a imprimir los resultados.



CALIBRADO

El sistema de análisis está calibrado mediante un preparado referencial purificado de Alpha-1-Antitrypsin.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Mediante la tecnología SMC® (Sensotronic Memorized Calibration), todos los datos de la prueba se transfieren al sistema a través de un código de barras individual en la tira reactiva Alegria®. La evaluación e interpretación de los resultados se realiza completamente automático.

Los CARACTERISTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Rango de medición

El intervalo de cálculo de este ensayo Alegria® es 80 - 3600 µg/g

Valores previstos

En un estudio habitual del intervalo con muestras de suero de donantes de sanos se han establecido los siguientes intervalos con el ensayo Alegria®: valor límite 400 µg/g

Interpretación de los resultados

Intervalo normal < 400 µg/g
Valores elevados ≥ 400 µg/g

Linealidad

Se diluyeron en serie tres muestras de pacientes con niveles altos de Alpha-1-Antitrypsin en un **medio de extracción** para demostrar el intervalo dinámico del ensayo en el límite superior/ inferior de linealidad. Se calculó la actividad para cada dilución mediante la tecnología SMC®.

| Muestra | Dilución | Observado [µg/g] | Esperado [µg/g] | O/E [%] |
|---------|----------|---------------------|--------------------|------------|
| 1 | 1 | 2443.0 | 2443.0 | 100 |
| | 2 | 1168.8 | 1221.5 | 96 |
| | 4 | 581.5 | 610.8 | 95 |
| | 8 | 275.0 | 305.4 | 95 |
| 2 | 16 | 156.1 | 152.7 | 90 |
| | 1 | 2000.0 | 2000.0 | 100 |
| | 2 | 1067.7 | 1000.0 | 107 |
| | 4 | 544.8 | 500.0 | 109 |
| 3 | 8 | 266.5 | 250.0 | 107 |
| | 1 | 1671.5 | 1671.5 | 100 |
| | 2 | 888.7 | 835.8 | 106 |
| | 4 | 445.2 | 417.9 | 107 |

Límite de detección

Concentración mínima detectable: 139 µg/g

Reproductibilidad

Precisión intranalítica: se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada una de las 3 muestras a partir de los resultados de 20 análisis en una única serie. En la tabla siguiente se muestran los resultados para la precisión intranalítica.

Precisión entre ensayos: se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada una de las 3 muestras a partir de los resultados de 2 análisis en 5 series diferentes. Los resultados para las precisiones de serie en serie se muestran en la siguiente tabla.

| Intra-Ensayo | | | Inter-Ensayo | | |
|--------------|-----------------|-------------|--------------|-----------------|-------------|
| Muestra | Medio [µg/g] | % CV [%] | Muestra | Medio [µg/g] | % CV [%] |
| 1 | 357.8 | 5.8 | 1 | 433.7 | 5.0 |
| 2 | 660.7 | 9.0 | 2 | 2578.4 | 9.7 |
| 3 | 2777.0 | 6.6 | 3 | 2736.2 | 8.7 |

Interferencias

Se analizaron las siguientes sustancias por 15 mg de muestra de heces y se encontró que no interferían: Vancomicina clorhidrato 0,201 mg, Ciprofloxacina 0,15 mg, Prevazid 0,006 mg, Azatioprina 0,021 mg, Prednisona 0,003 mg, Pentasa 0,399 mg, Vitamina A 2,4 UI, Vitamina C 0,015 mg, Vitamina E 0,03 mg, Vitamina D3 0,33 UI, Hemoglobina 1,749 mg.

Se analizaron los siguientes microorganismos a 1,1 x 10⁷ UFC por 15 mg de muestra de heces y se encontró que no interferían: E. coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella enterica, Shigella flexneri, Yersinia enterocolitica.

Resultados del estudio

| | | Métodos Comparativos | | |
|--------------------------------|------|----------------------|-----|-----|
| | | pos | neg | |
| ORG 286 Alpha-1-Antitrypsin | pos | 52 | 1 | 171 |
| | neg | 1 | 117 | |
| | | 53 | 118 | |
| Acuerdo positivo: | 98.1 | % | | |
| Acuerdo negativo: | 99.2 | % | | |
| Totalmente de acuerdo: | 98.8 | % | | |

LÍMITE DEL PROCEDIMIENTO

Este ensayo es una ayuda diagnóstica. El diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una prueba, sino que debe ser realizada por el médico después de todo, los hallazgos clínicos y de laboratorio han sido evaluados respecto a la imagen completa clínica del paciente. También todas las decisiones de tratamiento deben tenerse en cuenta individualmente.

Los rangos de referencia de muestras de heces de pacientes que se indican más arriba deben tomarse únicamente como recomendación. Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de acuerdo a la norma ISO 15189 u otras normas aplicables de laboratorio.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) pueden provocar enteropatía en un 20 % y un 60 % de los pacientes que toman estos fármacos. Los AINE pueden conducir a elevadas concentraciones de Alpha-1-Antitrypsin fecal. En estos casos se debería considerar la posibilidad de volver a evaluar la Alpha-1-Antitrypsin fecal tras la retirada de los AINE.

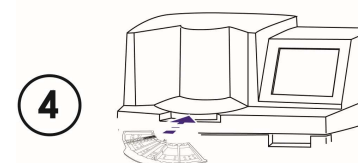
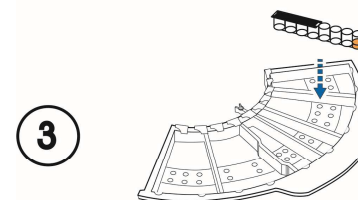
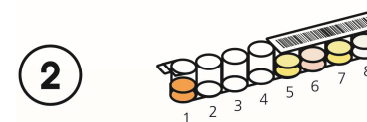
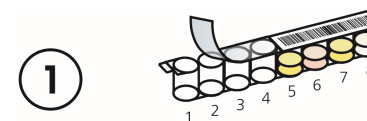
Los resultados por encima del rango de medición (> 3600 µg/g): recomendamos prediluir la muestra de heces extraída en el Medio de extracción de heces p. ej. 1:5 y volver a analizar usando 10 µl predilución en pocillo 1 como se describe en la sección PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS. Multiplicar el resultado por el factor de dilución p. ej. factor 5.

BIBLIOGRAFÍA

- Rodríguez-Otero P, Porcher R, Peffault de LR, Contreras M, Bouhnik Y, Xhaard A, Andreoli A, Ribaud P, Kapel N, Janin A, Socie G and Robin M: "Fecal calprotectin and Alpha-1-Antitrypsin predict severity and response to corticosteroids in gastrointestinal graft-versus-host disease". *Blood* 2012. **119**: 5909-5917.
- Hagen LE, Schechter T, Luk Y, Brodovitch A, Gassas A, Doyle JJ: "High Alpha-1-Antitrypsin clearance predicts severity of gut graft-versus-host disease (GVHD) in children". *Pediatr Transplant*. 2011;15(6):659-663.
- Umar SB and DiBaise JK: "Protein-losing enteropathy: case illustrations and clinical review". *Am J Gastroenterol* 2010. **105**: 43-49.
- Braamskamp MJ, Dolman KM, and Tabbers MM, Clinical practice: "Protein-losing enteropathy in children". *Eur J Pediatr* 2010. **169**: 1179-1185.
- Biancone L, Onali S, Calabrese E, Petruzzello C, Zorzi F, Condino G, Sica GS, and Pallone F: "Non-invasive techniques for assessing postoperative recurrence in Crohn's disease". *Dig Liver Dis* 2008. **40 Suppl 2**: S265-S270.
- Faust D, Raschke K, Hormann S, Milovic V, Stein J: "Regulation of alpha-1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells". *Clin Exp Immunol*. 2002 May; **128**(2):279-84.
- Faust D, Spirchez Z, Armbruster FP, and Stein J: "Determination of alpha-1-proteinase inhibitor by a new enzyme linked immunosorbant assay in feces, serum and an enterocyte-like cell line". *Z.Gastroenterol* 2001. **39**: 769-774.
- Becker K, Frieling T, and Haussinger D: "Quantification of fecal Alpha-1-Antitrypsin excretion for assessment of inflammatory bowel diseases". *Eur J Med Res* 1998. **3**: 65-70.
- Choudhary S, Gibson PR, Deacon MC, Young GP: "Measurement of faecal Alpha-1-Antitrypsin: methodologies and clinical application". *J Gastroenterol Hepatol*. 1996 Apr;11(4):311-8.
- Arndt B, Schürmann G, Betzler M, Herfarth C, Schmidt-Gayk H: "Assessment of Crohn's disease activity and alpha 1-antitrypsin in faeces". *Lancet*. 1992 Oct 24, **340**(8826):1037.
- Boege F and Fischbach W: "Structural heterogeneity of faecal Alpha-1-Antitrypsin shown by immunoblot analysis in patients with Crohn's disease". *Gut* 1991. **32**: 496-499.
- Strygler B, Nicar MJ, Santangelo WC, Porter JL, Fordtran JS: "Alpha-1-Antitrypsin excretion in stool in normal

subjects and in patients with gastrointestinal disorders". *Gastroenterology*. 1990 Nov; **99**(5):1380-7.

- Karbach U, Ewe K: "Enteric protein loss in various gastrointestinal diseases determined by intestinal Alpha-1-Antitrypsin clearance". *Z Gastroenterol*. 1989 Jul; **27**(7):362-5.
- Bjarnason I. Gastrointestinal safety of NSAIDs and over-the-counter analgesics. *Int J Clin Pract Suppl*. 2013 (178):37-42.
- Bjarnason I, Zanelli G, Prouse P, Smethurst P, Smith T, Levi S, et al. Blood and protein loss via small-intestinal inflammation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet*. 1987;2(8561):711-4.



ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com



Istruzioni per l'uso
2016-07



ORG 286 Alpha-1-Antitrypsin

BREVE DESCRIZIONE

Alegria® Alpha-1-Antitrypsin è un sistema di test basato su ELISA per la misurazione quantitativa della Alpha-1-Antitrypsin fecale da usare nella valutazione di disturbi infiammatori intestinali. Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso professionale nella diagnostica in vitro.

La determinazione della concentrazione di alfa-1-antitripsina nelle feci è utilizzata per valutare il livello di attività delle malattie infiammatorie croniche intestinali. L'alfa-1-antitripsina può essere rilevata nelle feci in caso di perdita intestinale di proteine o aumento della permeabilità della mucosa intestinale. L'aumento dei valori potrebbe avere luogo anche in caso di malattia celiaca, polipi, diverticolite, cancro del colon, allergie alimentari ecc.

SIMBOLI UTILIZZATI

| | |
|--|--|
| | Dispositivo medico-diagnostico in vitro |
| | Fabbricante |
| | Riferimento di Catalogo |
| | Sufficiente per |
| | Codice di lotto |
| | Utilizzare entro |
| | Limiti di temperatura |
| | Consultare le istruzioni per l'uso |
| | Conservare al riparo dal la luce solare |
| | Strisce reattive Alegria® |
| | Tampone di lavaggio |
| | Sistema fluido |
| | Mezzo di estrazione per campioni di feci |
| | Pronto per l'uso |

METODOLOGIA

La Alpha-1-Antitrypsin contenuta in un campione fecale deve essere estratta dalle feci con un mezzo di estrazione. Quindi, è possibile analizzare la Alpha-1-Antitrypsin con l'analisi Alegria® Alpha-1-Antitrypsin.

Il test Alegria® è caratterizzato da microstrisce con 8 pozzetti dotate di codice a barre, denominate strisce reattive Alegria®. Ciascuna striscia è destinata a un'unica determinazione su un singolo campione paziente. Le strisce reattive Alegria® contengono un set di reagenti completo che include: enzima coniugato, enzima-substrato, tampone del campione e un controllo specifico per la determinazione. Inoltre ciascuna striscia dispone di due pozzetti sensibilizzati con anticorpi che servono da pozzetti di reazione per un controllo e un campione paziente.

La determinazione è basata su una reazione immune indiretta legata a un enzima con le seguenti fasi: La Alpha-1-Antitrypsin contenuta nei campioni di controllo / positivi si lega alla superficie del sito di reazione formando un complesso di antigeni-anticorpi. Dopo un periodo di incubazione, una prima fase di lavaggio rimuove le molecole non legate e le molecole non specifiche legate.

Successivamente l'enzima coniugato aggiunto lega il complesso antigene-anticorpo fissato. Dopo un periodo di incubazione, una seconda fase di lavaggio rimuove l'enzima coniugato non legato. L'aggiunta della soluzione di enzima-substrato provoca idrolisi e la comparsa del colore durante l'incubazione. L'intensità del colore blu è correlata alla concentrazione del complesso antigene-anticorpo e può essere misurata fotometricamente a 650 nm. Le strisce reattive Alegria® si basano sulla tecnologia proprietaria SMC® (Sentronic Memorized Calibration): informazioni su test, analisi, valutazione e data di scadenza dello specifico lotto sono contenute nel codice a barre stampato su ciascuna striscia reattiva Alegria®.

Le strisce reattive Alegria® possono essere utilizzate con lo strumento diagnostico Alegria®, un analizzatore Random Access completamente automatico. Mediante la tecnologia SMC® i dati codificati nel codice a barre vengono trasferiti dalle strisce reattive Alegria® allo strumento e il test viene processato e analizzato in modo automatico. Lo strumento legge la data di scadenza e non procede all'analisi di strisce reattive Alegria® scadute.

INDICAZIONI E MISURE PRECAUZIONALI

- Tutti i reagenti di questa confezione di prova sono destinati esclusivamente all'uso da parte di personale specializzato nella diagnostica in vitro.
 - Il controllo interno contiene materiale di origine umana. Poiché nessun test può garantire l'assenza di agenti infettivi nel materiale, raccomandiamo di manipolare le strisce del test Alegria® come materiale potenzialmente infettivo.
 - L'albumina di siero bovino (BSA), contenuta nei componenti, è stata testata per rilevare la presenza di ESB ed è risultata negativa.
 - Evitare il contatto con il substrato enzimatico TMB (3,3', 5,5'-tetrametil benzidina).
 - Il liquido del sistema contiene acido. Questa concentrazione è classificata come non pericolosa. Evitare il contatto con gli occhi.
 - Il mezzo di controllo, il tampone, mezzo di estrazione e il tampone di lavaggio contengono 0.09% di azoturo di sodio come conservante. Questa concentrazione non è classificata come pericolosa.
 - Il coniugato enzimatico, il controllo e il tampone del campione contengono 0.05% di ProClin 300 come conservante. Questa concentrazione è classificata come non pericolosa.
- Durante la manipolazione di reagenti, mezzi di controllo e campioni dei pazienti si devono osservare le normali norme di sicurezza e la buona prassi di laboratorio:
- Misure di pronto soccorso: in caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e accuratamente con acqua e sapone. Togliersi abiti e scarpe contaminati e lavarli prima di usarli nuovamente. Se il liquido del sistema dovesse entrare in contatto con la cute, lavare accuratamente con acqua. Dopo il contatto con gli occhi, sciacquare con acqua corrente per almeno 10 minuti con le palpebre ben aperte. Rimuovere le lenti a contatto se possono essere rimosse con facilità. Tratto respiratorio: portare la persona all'aria aperta. Inghiottimento: sciacquare la bocca per far fuoriuscire i liquidi. Bere immediatamente 1-2 bicchieri d'acqua. Se il paziente vomita spontaneamente tenere la testa bassa con il corpo in posizione prona per evitare che il vomito entri nella trachea.
 - Misure in caso di rilascio involontario: osservare le norme di sicurezza della buona prassi di laboratorio. Evitare il contatto con occhi e cute. Non ingerire. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere, fumare o truccarsi nei luoghi in cui vengono manipolati i campioni oppure i componenti del prodotto. Raccogliere eventuali versamenti con materiale inerte ed eseguire uno smaltimento adeguato dei rifiuti.
 - Dispositivi di protezione individuale: indossare guanti protettivi in lattice o nitrile. Indossare occhiali di protezione. In caso di uso conforme non sono note reazioni pericolose.
 - Condizioni da evitare: poiché il substrato TMB è fotosensibile, immagazzinare le cartine a immersione Alegria® al buio.

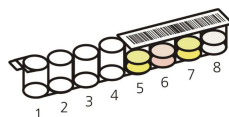
- I rifiuti devono essere smaltiti in conformità alle disposizioni ambientali nazionali e locali.
- Osservare le direttive per il controllo di qualità nei laboratori medici riguardanti il trasporto di sieri di riferimento e/o pool di sieri.

CONTENUTO DEL KIT

▽ 24 ORG 286

Sufficiente per 24

ALEGRIA TEST STRIPS



Strisce reattive Alegria®: costituita da 12 moduli con 8 pozzetti ciascuno.
 Pozzetti 1 e 2: vuoti e non rivestiti (pozzetti per la diluizione del campione)
 Pozzetti 3 e 4: cavità rivestito con anticorpi (cavità di reazione)
 Pozzetto 5: **Controllo**; giallo; contiene **Alpha-1-Antitrypsin**, PBS, BSA, detergente; azoturo di sodio 0.09% e 0.05% ProClin 300 come conservante.
 Pozzetto 6: **Coniugato enzimatico**: rosso chiaro; contiene anticorpi **Alpha-1-Antitrypsin** marcati con perossidasi, PBS, BSA, detergente; 0.05% ProClin come conservante
 Pozzetto 7: **Tampone del campione**: giallo; TBS, proteine stabilizzanti, EDTA, conservante acido di sodio 0.09%.
 Pozzetto 8: **Soluzione di substrato TMB**: 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina.

Gli anticorpi Alpha-1-Antitrypsin sono rivestiti da micropozzetti

Codice prodotto barre:

alpha1 Antitr Stool

WASH

1x 20 ml Tamponi di lavaggio; contiene elettroforesi triacetato, detergente, azoturo di sodio 0,09% come conservante.; concentrato (50 x)

SYSTEM FLUID

1x 2.5 ml Sistema fluido; contiene acido; concentrato (1000 x)

EXTRACT

1x 20 ml **Mezzo di estrazione per campioni di feci**; contiene TBS, proteine stabilizzanti, reagente di estrazione, conservante acido di sodio 0.09%. Pronto per l'utilizzo.



1 Alegria® Istruzioni per l'uso: Alegria® Mini-DVD



1 Certificato di analisi

MATERIALE NECESSARIO

- Vortex Mixer (Mixer a vortice) sbattitore, centrifuga da banco, in opzione: bilancia di precisione.
- Micropipette con puntali monouso 10 µl
- Acqua distillata oppure deionizzata
- Cilindro di misura per 1000 ml, 2500 ml

REAGENTI IVD AUSILIARI

- F5126 **EXTRACT** Stool Extraction Medium; Questo componente è venduto anche separatamente.

ALTRI ACCESSORI

- ORG 282 Stool Extraction Tubes; contiene 100 fiale.
- SSCO Stool Sample Collector; contiene 100

Questi accessori sono venduti separatamente.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Immagazzinamento della confezione di prova a 2-8 °C al buio.
- Durante l'immagazzinamento e l'utilizzo non esporre i reagenti a calore, sole o eccessiva luce.
- Immagazzinare le cartine a immersione Alegria® nel sacchetto con clip in dotazione, sigillate e con il disseccante.
- La confezione di prova non aperta può essere conservata per 15 mesi dalla data di produzione. I reagenti non aperti sono stabili fino alla scadenza della confezione di prova. Vedere l'etichetta del singolo lotto.
- Il tampone di lavaggio diluito e il liquido del sistema diluito sono stabili per almeno 30 giorni a una temperatura di 2-8°C. Consigliamo di consumare in giornata le soluzioni pronte all'uso travasate nelle bottigliette di reagente Alegria®.

AVVERTENZE OPERATIVE

- Il kit di prova non può essere utilizzato dopo la data di scadenza.
- Le strisce ed i campioni devono essere preparati 30 minuti prima dell'inizio del test a temperatura ambiente.
- Pipettare i campioni sul fondo della cavità. Per evitare un trascinamento, si dovrebbe pipettare il campione di volta in volta con un puntale di pipetta fresco.

RACCOLTA, CONSERVAZIONE, MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

Raccolta dei campioni di feci

Usare il raccoglitore "Stool Sample Collector" (SSCO).

- Evitare la contaminazione con l'acqua del WC che contiene disinfettanti.
- Conservare i campioni di feci raccolte non più di 5 giorni a 2-8°C. Oppure, conservarli a -20°C per 1 mese al massimo.

Preparazione dei campioni di feci

Estrazione della Alpha-1-Antitrypsin con la fiala "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

Per l'esame della Alegria® Alpha-1-Antitrypsin, il campione di feci dev'essere diluito con proporzione **1:50** nel **EXTRACT** fornito. I campioni non omogenei devono essere omogeneizzati prima della campionatura, ad es. con un raccordo di inoculazione. Per i campioni di feci liquide raccomandiamo di pesare il campione (vedere il metodo senza fiala di estrazione).

1 Preparare la fiala "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

Il campione di feci e **EXTRACT** devono essere a temperatura ambiente. Inserire **750 µl** di **EXTRACT** nella fiala trasparente (parte 1) e chiudere con la spatola (parte 2) con il tappo filettato azzurro della fiala.

2 Raccolgere il campione di feci

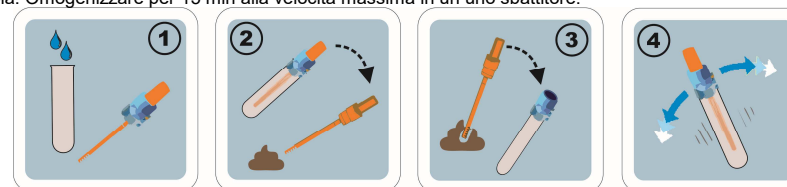
Aprire la fiala ed estrarre la spatola sul tappo filettato arancione. Rimuovere il campione di feci inserendo la spatola nelle feci. Le lunette della spatola devono essere completamente ricoperte col campione delle feci. Ciò significa che vengono prelevati **15 mg** di feci.

3 Porzione campione di feci

Premere la spatola di dosaggio arancione nel cono blu inserito nel tubo. Le feci in eccesso vengono rimosse dall'inserito a cono. La diluizione prodotta è di **1:50**.

4 Estrazione

Applicare l'azione del Vortex per 30 sec a 1800 giri/minuto per rimuovere il campione di feci dalle lunette della spatola. Omogeneizzare per 15 min alla velocità massima in un uno sbattitore.



Aprire la fiala all'altezza del cono blu e trasferire le feci omogeneizzate in una microfiala. Centrifugare per 2 minuti a 3000xg. Trasferire il fluido in un'altra microfiala e testare **immediatamente** Alpha-1-Antitrypsin. Questo campione di feci estratte deve essere conservato a 2-8°C per un periodo non superiore a 5 giorni o a -20 °C per un periodo fino a 1 settimana.

Estrazione della Alpha-1-Antitrypsin senza fiala "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

- Il campione di feci e **EXTRACT** devono essere a temperatura ambiente.
- Pesare la fiala vuota. Raccolgere il campione di feci e inserirlo nella fiala. Pesarla e determinare il peso netto del campione.
- Inserire il **EXTRACT** nella fiala: occorre un peso netto x 49 per ottenere una diluizione di **1:50**

| campione fecale + EXTRACT | |
|---------------------------|-----------|
| 15 mg | + 0.75 ml |
| 20 mg | + 1.0 ml |
| 30 mg | + 1.5 ml |
| 40 mg | + 2.0 ml |
| 50 mg | + 2.5 ml |

| campione fecale + EXTRACT | |
|---------------------------|----------|
| 60 mg | + 2.9 ml |
| 70 mg | + 3.4 ml |
| 80 mg | + 3.9 ml |
| 90 mg | + 4.4 ml |
| 100 mg | + 4.9 ml |

Chiudere la fiala. Applicare l'azione del Vortex per 30 sec a 1800 giri/minuto. Omogenizzare per 15 min alla velocità massima in un uno sbattitore.

Aprire la fiala. Trasferire le feci omogeneizzate in una microfiala. Centrifugare per 2 minuti a 3000xg. Trasferire il fluido e testare **immediatamente** Alpha-1-Antitrypsin. Questo campione di feci estratte deve essere conservato a 2 -8°C per un periodo non superiore a 5 giorni o a -20 °C per un periodo fino a 1 settimana.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

WASH

Il contenuto di ogni flacone del concentrato del tampone di lavaggio (20 ml) va diluito prima dell'uso fino ad un volume finale di 1000 ml (1 litro), aggiungendo dell'acqua distillata. La soluzione di lavaggio viene quindi trasferita immediatamente nel contenitore previsto per lo scopo. Se si esegue solo un ciclo di Alegria® per ogni giorno di lavoro, consigliamo di trasferire nella bottiglietta di reagente Alegria® solamente 500 ml di tampone di lavaggio diluito.

SYSTEM FLUID

Il contenuto di ogni flacone di sistema fluido concentrato (1000x) va diluito prima dall'utilizzo, aggiungendo acqua distillata fino a un volume finale di 2500 ml. Il sistema fluido ottenuto viene poi trasferito nell'apposito contenitore.

ALEGRIA TEST STRIPS

Prima dell'uso, prelevare dal sacchetto con clip il numero necessario di cartine a immersione Alegria®, portarle a temperatura ambiente (20-28°C). Rimuovere la pellicola che ricopre le cavità vuote solo immediatamente prima dell'inizio del test.

EXTRACT

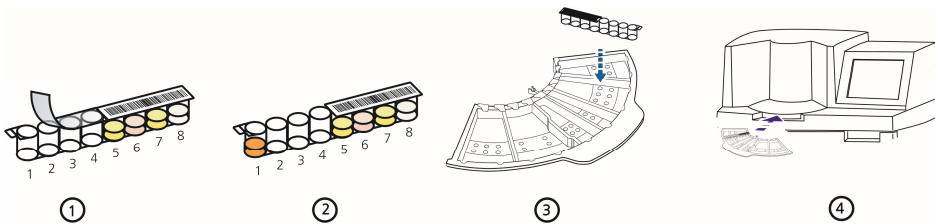
Pronto per l'uso

ESECUZIONE DEL TEST

L'analizzatore random access Alegria® completamente automatico utilizza cartine a immersione Alegria® con tecnologia SMC®. Il manuale contiene le indicazioni precise per l'utilizzo dell'apparecchio.

- (1) Rimuovere la pellicola che copre le cavità vuote da 1 a 4 solo dagli strip necessari per eseguire il test
La pellicola che copre le cavità da 5 a 8, stampata con il codice a barre, non va rimossa.
- (2) Pipettare di volta in volta 10 µl di campione del paziente sul fondo della cavità 1.
- (3) Introdurre la cartina a immersione Alegria® nel SysTray.
- (4) Inserire il SysTray caricato nell'apparecchiatura Alegria® nella giusta posizione e avviare il ciclo.

Tutte le altre fasi sono automatiche. Un ciclo si conclude quando la stampante dell'apparecchiatura Alegria® inizia a stampare i risultati.



CALIBRAZIONE

Il sistema di prova è calibrato utilizzando una preparazione di riferimento di Alpha-1-Antitrypsin.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I dati delle singole cartine a immersione Alegria® vengono trasferiti nel sistema dell'apparecchiatura Alegria® mediante la tecnologia SMC® (Sensotronic Memorized Calibration). L'analisi e l'interpretazione dei risultati avvengono in modo completamente automatico.

CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

Campo di misura

Il campo di misura è pari a 80 - 3600 µg/g

Valori normali

Nell'ambito di uno studio sul campo di riferimento con campioni di donatori di sani sono stati rilevati i seguenti valori: valore limite 400 µg/g

Interpretazione dei risultati

Gamma nella media < 400 µg/g
Valori elevati ≥ 400 µg/g

Linearità

Tre campioni di pazienti con un'elevata concentrazione di Alpha-1-Antitrypsin specifici sono stati sottoposti a diluizione lineare nel **mezzo di estrazione** per stabilire il campo dinamico dell'analisi nonché l'estremità inferiore e superiore della linearità. L'attività degli anticorpi di ogni stadio di diluizione è stata calcolata mediante la tecnologia SMC®.

| Campione | Diluizione | Osservato | Previsto | O/P |
|----------|------------|-----------|----------|-----|
| | | [µg/g] | [µg/g] | [%] |
| 1 | 1 | 2443.0 | 2443.0 | 100 |
| | 2 | 1168.8 | 1221.5 | 96 |
| | 4 | 581.5 | 610.8 | 95 |
| | 8 | 275.0 | 305.4 | 95 |
| 2 | 16 | 156.1 | 152.7 | 90 |
| | 1 | 2000.0 | 2000.0 | 100 |
| | 2 | 1067.7 | 1000.0 | 107 |
| | 4 | 544.8 | 500.0 | 109 |
| 3 | 8 | 266.5 | 250.0 | 107 |
| | 1 | 1671.5 | 1671.5 | 100 |
| | 2 | 888.7 | 835.8 | 106 |
| | 4 | 445.2 | 417.9 | 107 |

Limite di determinazione

Concentrazione minima rilevabile: 139 µg/g

Riproducibilità

Precisione intra-assay: il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato per tre campioni ognuno con 20 definizioni in un ciclo. I risultati della precisione nella serie sono riassunti nella tabella.

Precisione intra-assay: il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato per tre campioni rispettivamente da 2 definizioni in 5 cicli. I risultati della precisione da ciclo a ciclo sono riassunti nella tabella.

| Campione | Intra-test | |
|----------|------------|------|
| | Mezzo | % CV |
| | [µg/g] | [%] |
| 1 | 357.8 | 5.8 |
| 2 | 660.7 | 9.0 |
| 3 | 2777.0 | 6.6 |

| Campione | Inter-test | |
|----------|------------|------|
| | Mezzo | % CV |
| | [µg/g] | [%] |
| 1 | 433.7 | 5.0 |
| 2 | 2578.4 | 9.7 |
| 3 | 2736.2 | 8.7 |

Interferisce

Le seguenti sostanze sono state testate per 15 mg di campione di feci e sono risultate non interferenti: vancomicina cloridrato 0,201 mg, ciprofloxacina 0,15 mg, lansoprazolo 0,006 mg, azatioprina 0,021 mg, prednisone 0,003 mg, mesalazina 0,399 mg, vitamina A 2,4 UI, vitamina C 0,015 mg, vitamina E 0,03 mg, vitamina D3 0,33 UI, emoglobina 1,749 mg.

I seguenti microrganismi sono stati testati a $1,1 \times 10^7$ CFU per 15 mg di campione di feci e sono risultati non interferenti: E. coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella enterica, Shigella flexneri, Yersinia enterocolitica.

Risultati dello studio

| ORG 286 | pos | Metodo comparativo | | 171 |
|---------------------|-----|--------------------|-----|-----|
| | | pos | neg | |
| Alpha-1-Antitrypsin | pos | 52 | 1 | |
| | neg | 1 | 117 | |
| | | 53 | 118 | |
| Accordo positivo: | | 98.1 | % | |
| Accordo negativo: | | 99.2 | % | |
| Accordo totale: | | 98.8 | % | |

LIMITI DEL PROCEDIMENTO

Questo test è un ausilio diagnostico. La diagnosi clinica definitiva non dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo test, ma dovrebbe essere fatta dal medico, dopo tutto i risultati clinici e di laboratorio sono state valutate concernente l'intero quadro clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione per la terapia dovrebbe essere presa individualmente.

Le referenze normali e patologiche sopra indicate nei campioni di feci dei pazienti devono essere considerate solo come riferimento. Ogni laboratorio deve stabilire i propri range secondo la ISO 15189 o ad altre linee guida del laboratorio applicabili.

I farmaci non-steroidi antiinfiammatori (NSAIDs) inducono enteropatia su 20-65% dei pazienti che ricevono questo farmaco. NSAID può provocare un'alta concentrazione di Alpha-1-Antitrypsin nelle feci. In questi casi bisogna procedere alla rivalutazione del valore di Alpha-1-Antitrypsin nelle feci dopo aver bloccato il NSAID.

Risultati al di sopra del campo di misura (>3.600 µg/g): si consiglia di prediluire il campione di feci estratto nel tampone di estrazione dalle feci, ad es. con un rapporto di 1:5, e di ripetere il test utilizzando una prediluzione 10 µl nel pozzetto 1, come descritto nella sezione PROCEDURA DI ANALISI. Moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione, ad esempio il fattore 5.

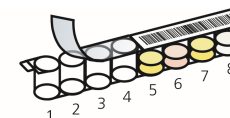
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Rodriguez-Otero P, Porcher R, Peffault de LR, Contreras M, Bouhnik Y, Xhaard A, Andreoli A, Ribaud P, Kapel N, Janin A, Socie G and Robin M: "Fecal calprotectin and Alpha-1-Antitrypsin predict severity and response to corticosteroids in gastrointestinal graft-versus-host disease". *Blood* 2012. **119**: 5909-5917.
- Hagen LE, Schechter T, Luk Y, Brodovitch A, Gassas A, Doyle JJ: "High Alpha-1-Antitrypsin clearance predicts severity of gut graft-versus-host disease (GVHD) in children". *Pediatr Transplant*. 2011;15(6):659-663.
- Umar SB and DiBaise JK: "Protein-losing enteropathy: case illustrations and clinical review". *Am J Gastroenterol* 2010. **105**: 43-49.
- Braamskamp MJ, Dolman KM, and Tabbers MM, Clinical practice: "Protein-losing enteropathy in children". *Eur J Pediatr* 2010. **169**: 1179-1185.
- Biancone L, Onali S, Calabrese E, Petruzzello C, Zorzi F, Condino G, Sica GS, and Pallone F: "Non-invasive techniques for assessing postoperative recurrence in Crohn's disease". *Dig Liver Dis* 2008. **40 Suppl 2**: S265-S270.
- Faust D, Raschke K, Hormann S, Milovic V, Stein J: "Regulation of alpha-1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells". *Clin Exp Immunol*. 2002 May; **128**(2):279-84.
- Faust D, Spirchez Z, Armbruster FP, and Stein J: "Determination of alpha-1-proteinase inhibitor by a new enzyme linked immunosorbant assay in feces, serum and an enterocyte-like cell line". *Z.Gastroenterol* 2001. **39**: 769-774.
- Becker K, Frieling T, and Haussinger D: "Quantification of fecal Alpha-1-Antitrypsin excretion for assessment of inflammatory bowel diseases". *Eur J Med Res* 1998. **3**: 65-70.
- Choudhary S, Gibson PR, Deacon MC, Young GP: "Measurement of faecal Alpha-1-Antitrypsin: methodologies

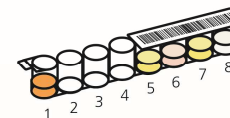
and clinical application". *J Gastroenterol Hepatol*. 1996 Apr;11(4):311-8.

- Arndt B, Schürmann G, Betzler M, Herfarth C, Schmidt-Gayk H: "Assessment of Crohn's disease activity and alpha 1-antitrypsin in faeces". *Lancet*. 1992 Oct 24, **340**(8826):1037.
- Boege F and Fischbach W: "Structural heterogeneity of faecal Alpha-1-Antitrypsin shown by immunoblot analysis in patients with Crohn's disease". *Gut* 1991. **32**: 496-499.
- Strygler B, Nicar MJ, Santangelo WC, Porter JL, Fordtran JS: "Alpha-1-Antitrypsin excretion in stool in normal subjects and in patients with gastrointestinal disorders". *Gastroenterology*. 1990 Nov; **99**(5):1380-7.
- Karbach U, Ewe K: "Enteric protein loss in various gastrointestinal diseases determined by intestinal Alpha-1-Antitrypsin clearance". *Z Gastroenterol*. 1989 Jul; **27**(7):362-5.
- Bjarnason I. Gastrointestinal safety of NSAIDs and over-the-counter analgesics. *Int J Clin Pract Suppl*. 2013 (178):37-42.
- Bjarnason I, Zanelli G, Prouse P, Smethurst P, Smith T, Levi S, et al. Blood and protein loss via small-intestinal inflammation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet*. 1987;2(8561):711-4.

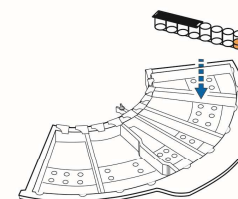
1



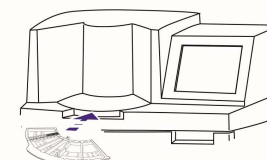
2



3



4



ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com



Használati utasítás

2016-07

ORG 286 Alpha-1-Antitrypsin

RÖVID LEÍRÁS

Alegria® Alpha-1-Antitrypsin egy ELISA-alapú tesztrendszer, amely a Alpha-1-Antitrypsin mérésére szolgál az emberi székletmintákban, a bélrendszer gyulladásos rendellenességeinek kimutatására használandó. A termék rendeltetésszerűen csak a professzionális in vitro diagnosztikában használható!

A székletben kimutatható alfa-1-antitripszin koncentráció meghatározását szoktuk használni a krónikus gyulladásos bélbetegségek aktivitási szintjének megítéléséhez. Az alfa-1-antitripszin a béleredetű proteinvesztés, vagy a bélnyálkahártya fokozott átteresztő képessége esetén mutatható ki a székletben. Jelentősen megnövekedett értékek mutathatók ki a hasüregi betegségek, polipok, a vastagbél falának elölboltosulása (divertikulitisz), a vastagbélrák, élelmiszerallergia, stb. esetén is.

HASZNÁLT SZIMBÓLUMOK

| | |
|--|--|
| | In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz |
| | Gyártó |
| | Katalógusszám |
| | Elegendő |
| | Gyártási tételszám |
| | Lejárat napja |
| | Megengedett hőmérséklet |
| | Olvassa el a használati utasítást! |
| | Napfénytől védve tárolandó |

| | |
|--|---|
| | Alegria® tesztcsík |
| | Mosópuffer |
| | Rendszerfolyadék |
| | Extrakciós oldat az emberi székletmintákban |
| | Használatra kész |

METODIKA

A székletmintában lévő Alpha-1-Antitrypsin extrakciós oldat segítségével kell kivonni. Ezután a kivont Alpha-1-Antitrypsin az Alegria® Alpha-1-Antitrypsin vizsgálattal lehet elemezni.

Az Alegria® teszt vonalkódos 8-cellás mikroszalagot tartalmaz, amelynek a neve Alegria® tesztcsík. Minden szalag egyetlen beteg mintájának egyszeri meghatározására szolgál. Az Alegria® tesztcsík egy komplett reagens szettet tartalmaz. Találhatók benne enzim konjugátok, enzim szubsztrátok, minta puffer és egy teszt-specifikus ellenőrzőanyag. Emellett minden csík két antitesttel bevont cellát tartalmaz, amelyek reakciós cellaként szolgálnak egy kontroll és egy beteg minta számára.

A meghatározás alapja egy közvetlen kapcsolódó enzimes immun-reakció az alábbi lépések során: A kontrollmintákban vagy pozitív mintákban jelen lévő Alpha-1-Antitrypsin a reakciós cellák felületéhez kötődik, így antitest-antigén komplexumot hozva létre. Az inkubáció után, az első lépésben a mosás eltávolítja a kötetlen és a nem specifikus kötött molekulákat. Ezt követően a hozzáadott enzim konjugátum kötődik az immobilizált antitest-antigén komplexhez. Az inkubáció után, a második mosás eltávolítja a nem kötődő enzim konjugátumot. Enzim szubsztrát oldat hozzáadása az inkubáció során hidrolizálást és színelőhívást okoz. A kék szín intenzitása megfelel az antitest-antigén-komplex koncentrációjának és fotometriásan mérhető 650 nm-en.

Az Alegria® tesztcsík a saját SMC®-technológiára (Szenzotronikus memorizált kalibráció) épül: a tesztre, elemzésre és értékelésre, valamint a csomag-specifikus lejárat dátum információi minden Alegria® tesztcsík nyomtatott vonalkódjában van tárolva.

Az Alegria® tesztcsík használható az Alegria® diagnosztikai műszerrel – egy teljesen automatizált, véletlen elérésű analízátor. az SMC®-technológia segítségével a vonalkódon tárolt adatok továbbíthatók az Alegria®tesztcsíkról a műszerbe és a műszer automatikusan feldolgozza és értékeli a teszt eredményeket. A készülék beolvassa a lejárat dátumát és ha az Alegria® tesztcsík elavult, automatikusan elutasítja a további feldolgozást.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

- A készlet minden egyes reagense kizárólag professzionális, in vitro diagnosztika céljára szolgál.
- A belső kontrollanyag emberi eredetű anyagot tartalmaz. Mivel semmilyen teszt nem tudja kizárni a fertőző anyagokat az emberi eredetű anyagokból, azt javasoljuk, hogy az Alegria® tesztcsíkokat kezeljék potenciálisan fertőző anyagként.
- Az összetevőkben használt szarvasmarha szérum albumin (BSA) tekintetében BSE vizsgálat történt, negatív eredménnyel.
- Kerülni kell a TMB-vel (3,3',5,5'-Tetrametyl-benzidín) történő érintkezést.
- A rendszerben lévő folyadék savat tartalmaz, mely nem veszélyes besorolású. Bőrrel ne érintkezzen!
- A kontroll, a mintapuffer, extrakciós oldat és a mosópuffer 0.09%-os nátrium-azid tartósítószerrel tartalmaz. Ez az említett koncentrációban nem veszélyes besorolású.
- Az enzim konjugátumban, kontroll és minta puffert tartalmaznak ProClin 300 0,05% tartósítószer. Ez az említett koncentrációban nem veszélyes besorolású.

A reagensekkel, kontrollokkal és mintákkal való munkavégzés során figyelembe kell venni a laboratóriumi biztonságra és a jó laboratóriumi munkavégzési gyakorlatra vonatkozó meglévő szabályokat.

- Elsősegélynyújtás: ha az anyag bőrre került, azonnal alaposan le kell mosni vízzel és szappannal. A szennyezett ruhát és cipőt le kell venni és ismételt hordás előtt ki kell mosni. Ha a rendszerben lévő folyadék a bőrre került, vízzel alaposan le kell mosni. Ha a szembe jutott, akkor az érintett szemet nyitva tartva óvatosan, legalább 10 percen át folyó vízzel öblíteni kell. Ha ezt könnyedén megteheti, távolítsa el a kontaktlencsét. Belégzés: vigye az érintett személyt friss levegőre. Lenyelés: öblítse ki a száját, és köpje ki a folyadékot. Azonnal igyon meg 1-2 pohár vizet. Ha spontán hányás következik be, hason fekvő helyzetben tartsa a fejét a testénél alacsonyabban, hogy a hányadék ne jusson be a légútba.

- Személyi óvintézkedések, védőfelszerelés és sürgősségi intézkedések:

Be kell tartani a laboratóriumi biztonsági szabályokat. Az anyagok ne kerüljenek a szembe és a bőrre, valamint lenyelésre! Szájjal pipettázni tilos! Olyan területeken, ahol minták vagy reagenskészletek kezelése folyik, nem szabad enni, inni, dohányozni és sminkelni. A kiömlött anyagokat intert anyaggal fel kell itatni és a felvitáshoz használt anyagot megfelelő hulladékgyűjtőbe kell dobni.

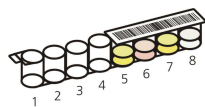
- Fertőzésvédelem / személyi védelem: Nitrilgumiból vagy természetes latexből készült védőkesztyűt kell viselni. Védőszemüveget is viselni kell. Az előírások szerinti használat esetén veszélyes reakciók nem ismertek.
- Elkerülendő helyzetek: Mivel a szubsztrát-oldat fényérzékeny, az Alegria® tesztcsíkokat sötétben kell tárolni.
- A laboratóriumi hulladékokra vonatkozó nemzeti vagy a regionális szabályozást be kell tartani.

Az orvosi laboratóriumokra vonatkozó a minőségellenőrzési szabályokat be kell tartani, assay-kontroll és poolozott szérumok használatával.

A KÉSZLET TARTALMA

24 ORG 286

ALEGRIA TEST STRIPS



Elegendő 24 meghatározásra

Alegria® tesztsík: 12 modul mindegyik 8 cellával.

Lyukak 1 + 2: üresek és bevonat nélküliek (a minta hígítására szolgáló lyukak)

Lyukak 3 + 4: antitesttel bevont lyukak (reaktív lyukak)

Lyukak 5: **Kontroll**; sárga; Alpha-1-Antitrypsin, PBS-t, BSA-t, detergenst; tartósítószer 0.09%-os nátrium-azid és 0.05% ProClin 300

Lyukak 6: **Enzim konjugátum**; világos piros; HRP-jelzett anti-Alpha-1-Antitrypsin antitesteket, PBS-t, BSA-t, detergenst és 0.05% ProClin 300 tartósítószeret tartalmaz.

Lyukak 7: **Mintapuffer**: sárga; ; TBS-t, stabilizáló proteint, EDTA, és tartósítószerként 0.09 % nátrium-azidot tartalmaz

Lyukak 8: **TMB szubsztrát oldat**; 3,3', 5,5'-tetrametil-benzidin.

A gyűjtőedények Alpha-1-Antitrypsin antitestekkel vannak lefedve.

Termék kód vonalkód: **alpha1 Antitr Stool**

WASH

1x 20 ml Mosópuffer; Tris-t, detergenst és 0,09%-os nátrium-azid tartósítószeret tartalmaz; 50x-es koncentrátum

SYSTEM FLUID

1x 2.5 ml Rendszerfolyadék; savat tartalmaz; 1000x-es koncentrátum

EXTRACT

1x 20 ml **Extraktós oldat az emberi székletmintákban**; TBS-t, stabilizáló proteint, extraktiós reagenst és tartósítószerként 0.09 % nátrium-azidot tartalmaz. Azonnal felhasználható.

i

1 Alegria® használati utasítás: Alegria® mini-DVD

i

1 Minőségellenőrzési tanúsítvány

SZÜKSÉGES LABORÁTORIUMI ESZKÖZÖK

- Vortex keverő, rázógép, asztali centrifuga, opcionális: precíziós mérleg
- Mikro pipetták egyszer használatos hegyekkel 10 µl-hez
- Desztillált vagy deionizált víz
- Mérőhenger 1000 ml-hez ; 2500 ml-hez

KIEGÉSZÍTŐ IVD-REAGENSEK

- F5126 **EXTRACT** Stool Extraction Medium; Ez a készlet alkatrész külön is kapható.

TOVÁBBI KIEGÉSZÍTŐK

- ORG 282 Stool Extraction Tubes; 100 kémcső.
- SSCO Stool Sample Collector; 100

Ezeket a kiegészítőket külön lehet megvásárolni.

TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

- A tesztsíkot 2-8 °C hőmérsékleten, sötét helyen kell tárolni.
- A tárolás és a használat során ne tegye ki a reagenseket hó, napfény vagy erős fény hatásának.
- Az Alegria® tesztsíkokat a hozzájuk tartozó zárható zsákban, nedvességtől védve, lezártan kell tartani..
- A bontatlan készlet a gyártástól számítva 15 hónapig tárolható. A bontatlan reagensek a készlet lejárati idejéig stabilak maradnak. Lásd az egyes csomagokra vonatkozó feliratokat.
- A hígított mosópuffer és rendszerfolyadék 2-8°C hőmérsékleten tárolva legalább 30 napig stabil marad. Javasoljuk, hogy ha már bekerült a reagens-tartóba, akkor az adott napon kerüljön felhasználásra.

AZ ELJÁRÁSOKKAL KAPCSOLATOS MEGJEGYZÉSEK

- A tesztkészlet a szavatossági határidő lejáta után nem használható fel.
- A tesztsíkot és a mintákat a teszt elkezdése előtt 30 percig szobahőmérsékleten kell kész állapotba helyezni.
- Az átszennyezés elkerülése érdekében, használj új pipettahegyet minden mintához.

MINTÁK GYŰJTÉSE, TÁROLÁSA ÉS KEZELÉSE

Székletminta gyűjtése

Széklet-mintavételi edény használható "Stool Sample Collector" (SSCO)

- Vigyázzon, hogy ne érintkezzen fertőtlenítőszeret tartalmazó öblítővízzel.

- A minták legfeljebb 5 napig tárolhatók 2–8 °C-os hőmérsékleten. Alternatively, store at -20 °C C-on 1 hónap maximum.

Székletminta előkészítése

A Alpha-1-Antitrypsin kivonata széklet "Stool Extraction Tube" (ORG 282) segítségével

Az Alegria® Alpha-1-Antitrypsin vizsgálathoz a székletmintákat a mellékelt **EXTRACT** **1:50** arányban kell vegyíteni. Az inhomogén mintákat a vizsgálat előtt homogenizálni kell, pl. inokulálási hurokkal. Folyékony halmazállapotú minták esetében javasolt kimérni a mintát (ha nem használ extraktiós csövet, lásd az alábbi módszert).

1 "Stool Extraction Tube" (ORG 282) előkészítése

A székletmintának és az **EXTRACT** szoba-hőmérsékletűnek kell lennie.

Töltsön **750 µl** **EXTRACT** az átlátszó csőbe (1. lépés), és zárja le a spatulával (2. lépés) úgy, hogy a kék záróelem a cső szájánál legyen.

2 Mintavétel

Nyissa fel a csövet, és húzza ki a spatulát a narancs záróelemnél fogva.

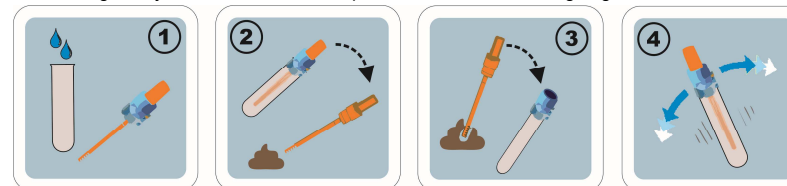
Dugja be a spatulát a székletmintába. A mintának teljesen be kell fedni a spatula hornyait. Ezzel **15 mg**-nyi mintát vesz.

3 A minta kimérése

Helyezze bele a narancssárga adagoló spatulát a kék csőbe. A kúp alakú betét eltávolítja a felesleges mintát. Az így kapott keverék **1:50** arányú.

4 Extrakció

Keverje vortex keverővel 30 másodpercig 1800 fordulat/perc sebességen, hogy a minta kijöjjön a spatula hornyából. Homogenizálja a mintát minimum 15 percen át a rázó eszköz legmagasabb fokozatán.



Távolítsa el a kék záróelemet, és töltsse át a keveréket mikrosőbe. Centrifugálja 2 percig 3000xg sebességen. Töltsse át az átlátszó folyadékot egy másik mikrosőbe, és **azonnal** tesztelje Alpha-1-Antitrypsin. Az extrakció utáni mintát 2-8 °C-on legfeljebb 5 napig, míg -20 °C-on legfeljebb maximum 1 hétig.

A Alpha-1-Antitrypsin kivonata széklet "Stool Extraction Tube" (ORG 282) nélkül

- A székletmintának és az **EXTRACT** szoba-hőmérsékletűnek kell lennie.
- Mérje le az **üres** csövet. Vegyen mintát, és tegye a csőbe. Mérje le, majd számítsa ki a minta nettó súlyát.
- Öntsön **EXTRACT** a csőbe: az **1:50** keverékarányhoz a minta nettó súlyának 49-szeresét kitevő mennyiség szükséges.

| székletminta + | EXTRACT | székletminta + | EXTRACT |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 15 mg | + 0.75 ml | 60 mg | + 2.9 ml |
| 20 mg | + 1.0 ml | 70 mg | + 3.4 ml |
| 30 mg | + 1.5 ml | 80 mg | + 3.9 ml |
| 40 mg | + 2.0 ml | 90 mg | + 4.4 ml |
| 50 mg | + 2.5 ml | 100 mg | + 4.9 ml |

Zárja le a csövet. Keverje vortex keverővel 30 másodpercig 1800 fordulat/perc sebességen. Homogenizálja a mintát minimum 15 percen át a rázó eszköz legmagasabb fokozatán. Nyissa fel a csövet. Öntse a keveréket egy mikrosőbe. Centrifugálja 2 percig 3000xg sebességen. Töltsse át az átlátszó folyadékot egy másik mikrosőbe, és **azonnal** tesztelje Alpha-1-Antitrypsin. Az extrakció utáni mintát 2-8 °C-on legfeljebb 5 napig, míg -20 °C-on legfeljebb maximum 1 hétig.

REAGENSEK ELŐÁLLÍTÁSA

WASH

A mosópuffer-koncentrátum minden üvegének tartalmát (20 ml) a használat előtt desztillált víz hozzáadásával

hígítsuk fel 1000 ml (1 liter) végső térfogatra. A mosóoldatot ezután vezessük át az erre tervezett konténerbe. Amennyiben egy nap csak egyszer történik mérés az Alegria®-val, akkor javasoljuk, hogy csak 500 ml hígított mosópuffer kerüljön áttöltésre.

SYSTEM FLUID

A rendszerfolyadék koncentrációját mindegyik üvegének tartalmát (1000x) használat előtt desztillált víz hozzáadásával 2500 ml végső térfogatra kell hígítani. Ezt követően a rendszerfolyadékot át kell vezetni az arra szolgáló konténerbe.

ALEGRIA TEST STRIPS

Használat előtt vegye ki a szükséges számú Alegria® tesztcsíkot a zárható tasakból és hagyja őket szobahőmérsékletre (20-28°C) melegedni. A mélyedéseket takaró fóliát csak közvetlenül a teszt megkezdése előtt távolítsa el.

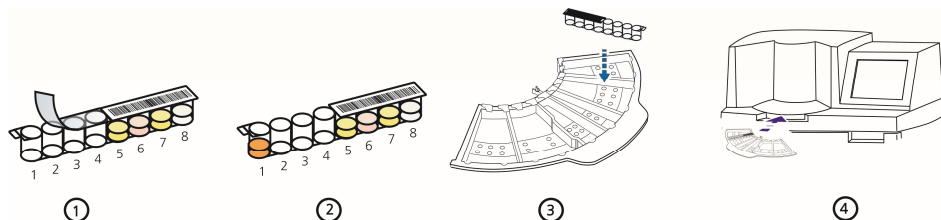
EXTRACT

Használatra kész

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

Az SMC® technológiával működő Alegria® tesztcsíkokat Alegria® diagnosztikus berendezésben lehet használni. A készülék működésére vonatkozó részletes ismereteket az eszköz Kezelési Útmutatója tartalmazza.

- (1) A fóliát, amely az üres üregeket fedi be 1-től 4-ig, kizárólag azokról a tesztcsíkokról eltávolítani, amelyekre szükség van. **A vonalkód nyomtatással ellátott fóliát, amely az 5-től 8-ig terjedő üregeket fedi be, el nem távolítani.**
- (2) Adagoljunk pipettával egyenként 10 µl hígítatlan páciensmintát az 1. lyuk alá.
- (3) Helyezze a csíkot a tálcára (SysTray).
- (4) A feltöltött tálcát a megfelelő pozícióban tegye az Alegria® berendezésbe és indítsa el a műveletet. Minden további lépés automatikusan követi egymást. A tesztnek akkor van vége, amikor a készülék elkezd nyomtatni az eredményeket.



KALIBRÁLÁS

Az elemző rendszer kalibrálása egy Alpha-1-Antitrypsin referencia felhasználásával.

AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

Az SMC® technológia (Sensoronic Memorized Calibration) értelmében valamennyi adat az egyes Alegria® tesztcsíkokon található egyedi vonalkódokhoz rendeltlen kerül továbbításra a rendszerben. Az eredmények automatikus kiszámítása és értelmezése.

TELJESÍTMÉNYMUTATÓK

Mérési tartomány

Az Alegria® mérőműszer számítási tartománya 80 - 3600 µg/g

Várható értékek

Az Alegria® mérőműszer számítási tartománya 400 µg/g

Az eredmények interpretációja

Normál tartomány < 400 µg/g
Emelkedett szint ≥ 400 µg/g

Linearitás

Három, nagy mennyiségű Alpha-1-Antitrypsin tartalmazó betegminta **extrakciós oldat** végzett sorozathígítása történt az assay dinamikus tartományának és a linearitás felső/alsó határának bemutatására. Minden egyes hígításra vonatkozóan SMC® Technológiával történt az aktivitás kiszámítása.

| Minta | Hígítás | Megfigyelt | Várt | M/V |
|-------|---------|------------|--------|-----|
| | | [µg/g] | [µg/g] | [%] |
| 1 | 1 | 2443.0 | 2443.0 | 100 |
| | 2 | 1168.8 | 1221.5 | 96 |
| | 4 | 581.5 | 610.8 | 95 |
| | 8 | 275.0 | 305.4 | 95 |
| 2 | 16 | 156.1 | 152.7 | 90 |
| | 1 | 2000.0 | 2000.0 | 100 |
| | 2 | 1067.7 | 1000.0 | 107 |
| | 4 | 544.8 | 500.0 | 109 |
| 3 | 8 | 266.5 | 250.0 | 107 |
| | 1 | 1671.5 | 1671.5 | 100 |
| | 2 | 888.7 | 835.8 | 106 |
| | 4 | 445.2 | 417.9 | 107 |

Észlelési határ

Legalacsonyabb észlelhető koncentráció: 139 µg/g

Reprodukálhatóság

Assay-n belüli pontosság: a variációs koefficiens mindhárom mintára vonatkozóan az egy menetben 20 meghatározásból kapott eredményekből került kiszámításra. Az alábbi táblázat tartalmazza az assay-n belüli pontosságra vonatkozó eredményeket.

Assay-k közötti pontosság: a variációs koefficiens mindhárom mintára az 5 különböző menetben végzett 2 meghatározásból kapott eredményekből került kiszámításra. Az alábbi táblázat tartalmazza az egyes menetek közötti pontosságra vonatkozó eredményeket.

| Vizsgálaton belül | | |
|-------------------|------------|------|
| Minta | Középérték | % CV |
| | [µg/g] | [%] |
| 1 | 357.8 | 5.8 |
| 2 | 660.7 | 9.0 |
| 3 | 2777.0 | 6.6 |

| Vizsgálat között | | |
|------------------|------------|------|
| Minta | Középérték | % CV |
| | [µg/g] | [%] |
| 1 | 433.7 | 5.0 |
| 2 | 2578.4 | 9.7 |
| 3 | 2736.2 | 8.7 |

Interferenciák

Az alábbi vegyületeket ellenőriztük 15 mg székletmintában és azokat nem interferálóknak találtuk: Vancomycin hidroklorid 0,201 mg, Ciprofloxacin 0,15 mg, Previdid 0,006 mg, Azathioprin 0,021 mg, Prednizon 0,003 mg, Pentasa 0,399 mg, A-vitamin 2.4 NE, C-vitamin 0,015 mg, E-vitamin E 0,03 mg, D3-vitamin D3 0,33 NE, hemoglobin 1,749 mg.

Az alábbi mikroorganizmusokat teszteltük 15 mg székletmintákként 1,1 x 10⁷ CFU szinten és azokat nem találtuk interferálóknak: E. coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella enterica, Shigella flexneri, Yersinia enterocolitica.

Kutatási eredmények

| | | Komparatív eljárások | | |
|-----------------------|-------------|----------------------|-----|-----|
| | | pos | neg | |
| Alpha-1-Antitrypsin | ORG 286 pos | 52 | 1 | 171 |
| | neg | 1 | 117 | |
| Pozitív megállapodás: | | 53 | 118 | |
| | | 98.1 | % | |

Negatív megállapodás: 99.2 %
Teljes egyetértés: 98.8 %

AZ ELJÁRÁS HATÁRAI

Ez a vizsgálat egy olyan diagnosztikai támogatás. Határozott klinikai diagnózist nem szabad eredményei alapján egyetlen teszt, de kell az orvos után, minden klinikai és laboratóriumi leletek kerültek kiértékelésre vonatkozó teljes klinikai képet a beteg. Szintén minden döntés a kezelést meg kell venni külön-külön.

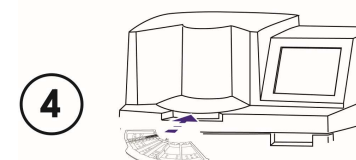
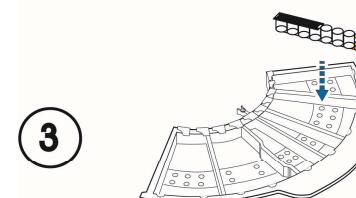
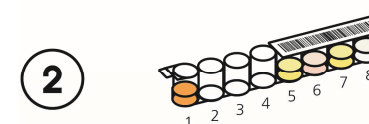
A fentiekben meghatározott kóros és normális székletre vonatkozó referencia értékek csak ajánlott értékek. Minden laboratóriumnak magának kell megalkotnia a saját tartományok az ISO 15189 vagy más vonatkozó laboratóriumi irányelveket.

A szteroidmentes gyulladáscsökkentők (angol rövidítéssel NSAID-ok) a páciensek 20-65%-ánál entropátiát válhatnak ki. A szteroidmentes gyulladáscsökkentők szedése a székletben megemelkedett Alpha-1-Antitrypsin koncentrációhoz vezethet. Ilyen esetekben a székletben található Alpha-1-Antitrypsin szint tesztelését a szteroidmentes gyulladáscsökkentők szedésének befejezése után ajánlatos ismét elvégezni.

A mérési tartományon (> 3600 µg/g) felüli értékek esetén: A székletből vett minta 1:5 arányban történő közepes hígítását javasoljuk: 10 µl előkészített oldat legyen az 1-es edényben a TESZTELJÁRÁS pontban leírtak szerint. A kapott eredményt szorozza meg a hígítási aránnyal, ez esetben 5-ös szorzóval.

HIVATKOZÁSOK

1. Rodriguez-Otero P, Porcher R, Peffault de LR, Contreras M, Bouhnik Y, Xhaard A, Andreoli A, Ribaud P, Kapel N, Janin A, Socie G and Robin M: "Fecal calprotectin and Alpha-1-Antitrypsin predict severity and response to corticosteroids in gastrointestinal graft-versus-host disease". *Blood* 2012. **119**: 5909-5917.
2. Hagen LE, Schechter T, Luk Y, Brodovitch A, Gassas A, Doyle JJ: "High Alpha-1-Antitrypsin clearance predicts severity of gut graft-versus-host disease (GVHD) in children". *Pediatr Transplant*. 2011;15(6):659-663.
3. Umar SB and DiBaise JK: "Protein-losing enteropathy: case illustrations and clinical review". *Am J Gastroenterol* 2010. **105**: 43-49.
4. Braamskamp MJ, Dolman KM, and Tabbers MM, Clinical practice: "Protein-losing enteropathy in children". *Eur J Pediatr* 2010. **169**: 1179-1185.
5. Biancone L, Onali S, Calabrese E, Petruzzello C, Zorzi F, Condino G, Sica GS, and Pallone F: "Non-invasive techniques for assessing postoperative recurrence in Crohn's disease". *Dig Liver Dis* 2008. **40 Suppl 2**: S265-S270.
6. Faust D, Raschke K, Hormann S, Milovic V, Stein J: "Regulation of alpha-1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells". *Clin Exp Immunol*. 2002 May; 128(2):279-84.
7. Faust D, Spirchez Z, Armbruster FP, and Stein J: "Determination of alpha-1-proteinase inhibitor by a new enzyme linked immunosorbant assay in feces, serum and an enterocyte-like cell line". *Z Gastroenterol* 2001. **39**: 769-774.
8. Becker K, Frieling T, and Haussinger D: "Quantification of fecal Alpha-1-Antitrypsin excretion for assessment of inflammatory bowel diseases". *Eur J Med Res* 1998. **3**: 65-70.
9. Choudhary S, Gibson PR, Deacon MC, Young GP: "Measurement of faecal Alpha-1-Antitrypsin: methodologies and clinical application". *J Gastroenterol Hepatol*. 1996 Apr;11(4):311-8.
10. Arndt B, Schürmann G, Betzler M, Herfarth C, Schmidt-Gayk H: "Assessment of Crohn's disease activity and alpha 1-antitrypsin in faeces". *Lancet*. 1992 Oct 24, 340(8826):1037.
11. Boege F and Fischbach W: "Structural heterogeneity of faecal Alpha-1-Antitrypsin shown by immunoblot analysis in patients with Crohn's disease". *Gut* 1991. **32**: 496-499.
12. Strygler B, Nicard MJ, Santangelo WC, Porter JL, Fordtran JS: "Alpha-1-Antitrypsin excretion in stool in normal subjects and in patients with gastrointestinal disorders". *Gastroenterology*. 1990 Nov; 99(5):1380-7.
13. Karbach U, Ewe K: "Enteric protein loss in various gastrointestinal diseases determined by intestinal Alpha-1-Antitrypsin clearance". *Z Gastroenterol*. 1989 Jul; 27(7):362-5.
14. Bjarnason I. Gastrointestinal safety of NSAIDs and over-the-counter analgesics. *Int J Clin Pract Suppl*. 2013 (178):37-42.
15. Bjarnason I, Zanelli G, Prouse P, Smethurst P, Smith T, Levi S, et al. Blood and protein loss via small-intestinal inflammation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet*. 1987;2(8561):711-4.



ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com



Návod k použití
2016-07



ORG 286 Alpha-1-Antitrypsin

KRÁTKÝ POPIS

Alegria® Alpha-1-Antitrypsin je testovací systém ELISA pro kvantitativní měření Alpha-1-Antitrypsin ve vzorcích lidské stolice k použití při hodnocení zánětlivých střevních poruch. Tento výrobek je určen pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.

Na vyhodnocení úrovně aktivity chronických zánětlivých onemocnění střev se používá stanovení koncentrace alfa-1 antitrypsinu ve stolici. Alfa-1 antitrypsin se vyskytuje ve stolici během úniku intestinálního proteinu nebo během zvýšení propustnosti střevní sliznice. Zvýšené hodnoty můžeme zaznamenat také při celiakii, polypech, divertikulitidě, rakovině tlustého střeva, alergii na potraviny atd.

POUŽÍVANÉ SYMBOLY

| | |
|--|---|
| | Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro |
| | Výrobce |
| | Katalogové číslo |
| | Dostačuje pro |
| | Kód šarže |
| | Spotřebujte do |
| | Teplotní omezení |
| | Viz návod k použití |
| | Chraňte před slunečním světlem |

| | |
|--|-----------------------------------|
| | Alegria® Testovací stripy |
| | Promývací pufr |
| | Systémová kapalina |
| | Extrakce média pro vzorky stolice |
| | Připraven k použití |

PRINCIP TESTU

Alpha-1-Antitrypsin obsažený ve vzorcích lidské stolice je třeba separovat ze stolice pomocí extrakčního média. Poté lze extrahovaný Alpha-1-Antitrypsin analyzovat pomocí analýzy Alegria® Calprotectin.

Test Alegria® obsahuje mikrostripy s názvem Alegria® Test Strips. Mají 8 jamek a jsou označené čárovým kódem. Každý proužek je určen pro jedno stanovení z jednoho vzorku od pacienta. Alegria® Test Strip obsahuje kompletní sadu reagensů: enzymatický konjugát, enzymatický substrát, vzorek pufru a kontrolní vzorek specifický pro daný test. Na každém proužku jsou dále dvě jamky protilátková povrchová úprava, které slouží jako reakční jamky pro jeden kontrolní vzorek a jeden vzorek od pacienta.

Stanovení je založeno na nepřímé imunitní reakci navázaného enzymu, která má tyto fáze: Alpha-1-Antitrypsin přítomný v řídicím / zkoumaném vzorku se váže na plochu reakční kavity, což vytváří komplex protilátkového antigenu. Po inkubaci se při prvním promytí odstraní nenavázané a nespecificky navázané molekuly. Následně přidáním enzymatického konjugátu se naváže na imobilizovaný komplex protilátky a antigenu. Po druhém promytí odstraní nenavázaný enzymatický konjugát. Po přidání enzymatického substrátu dojde k hydrolyze a ke vzniku zbarvení v průběhu inkubace. Intenzita modrého zbarvení odpovídá koncentraci komplexu protilátky a antigenu a lze ji fotometricky měřit při vlnové délce 650 nm.

Princip testu Alegria® Test Strip vychází z patentované technologie SMC® (Sensoronic Memorized Calibration): údaje o testu, analýze a hodnocení a dále datum expirace dané šarže jsou obsaženy v čárovém kódu vytištěném na každém proužku testu Alegria® Test Strip.

Alegria® Test Strip je možné použít s diagnostickým přístrojem Alegria® – plně automatickým analyzátozem s přímým přístupem (Random Access). Pomocí technologie SMC® jsou data zakódovaná v čárovém kódu přenesena z proužku Alegria® Test Strip do přístroje, který automaticky provede test a vyhodnotí jej. Přístroj odečte datum expirace a je-li test Alegria® Test Strip prošlý, odmítne jeho další zpracování.

UPOZORNĚNÍ A PREVENCE

- Všechna činidla této sady jsou navržena pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.
- Interní řízení obsahuje materiál lidského původu. Protože žádný test nemůže zajistit absenci infekčních činitelů v lidském materiálu, doporučujeme manipulovat s testovacími proužky Alegria® jako s možným infekčním materiálem.
- Bílkovina hovězího séra (BSA) použitá v komponentách byla otestována na BSE a to negativně.
- Vyhnete se kontaktu se substrátem TMB (3,3',5,5'-tetrametyl benzidin).
- Systémová kapalina obsahuje kyselinu, dle klasifikace je bezpečná. Zabraňte kontaktu s pokožkou.
- Kontrola, vzorkový roztok, extrakce média a mycí roztok obsahují 0.09% azidu sodného jako ochranný prostředek. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.
- Enzym konjugace, kontrola a vzorkový roztok obsahuje 0.05% ProClinu 300 jako ochranného prostředku. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.

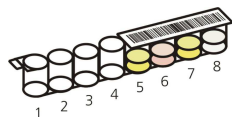
Během manipulace se všemi činidly, kontrolami vzorky séra sledujte stávající nařízení pro laboratorní bezpečnost a správnou laboratorní práci:

- První pomoc: V případě kontaktu s pokožkou ihned důkladně opláchněte vodou a saponátem. Sundejte kontaminovaný oděv a boty a před dalším použitím je omyjte. Dojde-li ke kontaktu systémové kapaliny s kůží, opláchnete důkladně vodou. Po kontaktu se zrakem důkladně oplachujte otevřené oči tekoucí vodou po dobu alespoň 10 minut. Půjde-li to bez obtíží, sundejte kontaktní čočky. Dýchací cesty: přemístěte osobu na čerstvý vzduch. Požití: vypláchněte ústa a tekutinu vyplivněte. Ihned vypijte 1 - 2 sklenice vody. Při nenuceném zvracení umístěte hlavu postiženého směrem k zemi při poloze těla na břiše, abyste zabránili vniknutí zvratků do dýchací trubice.
 - Osobní opatření, ochranné vybavení a postup v případě nouze: Sledujte nařízení laboratorní bezpečnosti. Vyvarujte se kontaktu s pokožkou a očima. Nepožívejte. Nenasávejte ústy. Nejezte, nepijte, nekuřte nebo nenášejte make up v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo sadou činidel. Při vylití absorbujte inertním materiálem a políty materiál řádně zlikvidujte.
 - Limity vystavení / ochrana osob: Noste ochranné rukavice z nitrilové nebo z přírodního latexu. Noste ochranné brýle. Při používání dle určeného použití nejsou známy nebezpečné reakce.
 - Situace, kterým je třeba předcházet: Roztok substrátu je citlivý na světlo. Proto skladujte proužky Alegria® na tmavém místě.
 - Při likvidaci laboratorního odpadu je třeba dodržovat místní a národní předpisy.
- Dodržujte směrnici pro provádění řízení kvality ve zdravotnických laboratořích analyzačními kontrolami a/nebo sdruženými séry.

OBSAH SOUPRAVY

24 ORG 286

ALEGRIA TEST STRIPS



Dostačuje pro 24

Alegria® testovací stripy: destička obsahující 12 modulů po 8 jamek.

Jamky 1 a 2: prázdné a bez činidla (jamky pro ředění vzorku)

Jamky 3 a 4: protilátková povrchová úprava (reakční jamky)

Jamky 5: **Kontrola:** žlutá; obsahuje Alpha-1-Antitrypsin, PBS, BSA, detergent; ochranný prostředek azid sodný 0.09% a ProClin 300 0.05%.

Jamky 6: **Enzymový konjugát:** světle červená; obsahující protilátky anti-Alpha-1-Antitrypsin, označeno HRP; PBS, BSA, detergent, ochranný prostředek ProClin 300 0.05%.

Jamky 7: **Vzorkový pufr:** žlutá; obsahuje TBS, stabilizační protein, EDTA, konzervant azid sodný 0,09%.

Jamky 8: **TMB substrátový roztok:** 3,3', 5,5'- tetramethyl-benzidin.

Mikrojамky se povlečou protilátkami proti Alpha-1-Antitrypsin.

Kód produktu na čárový kód: **alpha1 Antitr Stool**

WASH

1x 20 ml Promývací pufr; obsahuje Tris, detergent, ochranný prostředek azid sodný 0,09%; 50x koncentrát

SYSTEM FLUID

1x 2.5 ml Ředěná systémová kapalina; obsahuje kyselinu; 1000x koncentrát

EXTRACT

1x 20 ml **Extrakce média pro vzorky stolice;** obsahuje TBS, stabilizační protein, extrakční reagentii, konzervant azid sodný 0,09%. Připraveno k použití.

i

1 Alegria® Pokyny pro použití: Alegria® Mini-DVD

i

1 Certifikát kontroly kvality

POTŘEBNÉ VYBAVENÍ

- Vírový mixér, vibrační třepadlo, stolní odstředivka, volitelně: přesná měřidla
- mikropipety se špičkami na jedno použití na 10 µl
- destilovaná nebo deionizovaná voda
- odměrný válec na 1000 ml, 2500 ml

POMOCNÉ IVD REAGENCIE

- F5126 **EXTRACT** Stool Extraction Medium; Tato složka kit je také prodává samostatně.

DALŠÍ PŘÍSLUŠENSTVÍ

- ORG 282 Stool Extraction Tubes; obsahuje 100 tub.
- SSCO Stool Sample Collector; obsahuje 100

Tyto doplňky se prodávají zvlášť.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

- Skladujte testovací sadu při 2-8°C na tmavém místě.
- Během skladování a používání nevystavujte činidla horku, slunečnímu záření nebo silnému světlu.
- Skladujte testovací proužky Alegria® hermeticky uzavřeny a v suchu v dodaném zásobníku.
- Uchovatelnost neotevřené testovací je 15 měsíců od data výroby. Neotevřená činidla jsou stabilní do konce expirace sady. Viz štítky pro individuální dávku.
- Rozředěný mycí roztok a systémová kapalina jsou stabilní minimálně 30 dní, jsou-li skladovány při 2-8°C. Pro přemístění do nádoby s činidlem doporučujeme spotřebovat v tentýž den.

POZNÁMKY K PRACOVNÍMU POSTUPU

- Testovací sada nemůže být po uplynutí data použití používána.
- Veškerý materiál musí být ponechán před použitím při pokojové teplotě (20-28 st C).
- Aby se zabránilo kontaminaci, vyměňujte špičky mikropipet mezi vzorky.

ODEBÍRÁNÍ VZORKŮ, JEJICH PŘÍPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ

Sběr vzorků stolice

Lze využít sběrač vzorku stolice "Stool Sample Collector" (SSCO)

- Vyhněte se kontaminaci se záchodovou vodou obsahující dezinfekci.
- Vzorky stolice neuchovávejte déle než 5 dní při 2-8 °C. Popřípadě skladujte při -20 °C po dobu 1 měsíce maximum.

Příprava vzorku stolice

Extrakce Alpha-1-Antitrypsin pomocí trubičky "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

Pro Alegria® Alpha-1-Antitrypsin analýzu je nutné vzorek stolice naředít **1:50** v poskytnutém **EXTRACT**.

Nehomogenní vzorky lze homogenizovat před odebráním vzorku, například pomocí inokulační smyčky.

U tekutých vzorků stolice doporučujeme vzorek zvážit (viz metoda níže bez extrakční trubičky).

1 Příprava trubičky "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

Vzorek stolice a **EXTRACT** musí mít pokojovou teplotu.

Nalijte **750 µl** **EXTRACT** do průhledné trubičky (část 1) a uzavřete pomocí stěrky (část 2) modrým závitovým uzávěrem na trubičce.

2 Odebrání vzorku stolice

Otevřete trubičku a vytáhněte stěrku na oranžovém závitovém uzávěru.

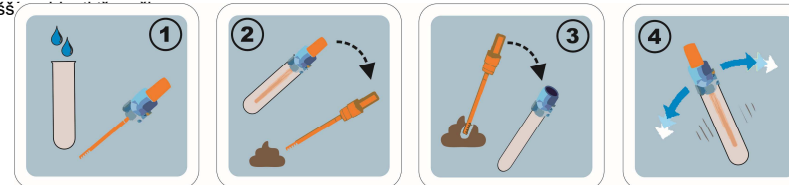
Odeberte vorek stolice zasunutím stěrky do stolice. Drážky na stěrce je nutné plně pokrýt vzorkem stolice. Výsledkem je odebrání **15 mg** stolice.

3 Díl vzorku stolice

Zatlačte oranžovou dávkovací lopatku do modré kuželové vložky ve zkumavce. Nadbytek stolice se oťe o kuželovou vložku. Výsledný roztok je **1:50**.

4 Extrakce

Vířte 30 s při 1800 ot./min. pro odstranění vzorku stolice z drážek stěrky. Homogenizujte po dobu 15 minut při nejvyšší rychlosti třepačky.



Otevřete trubičku na modré kuželové vložce a přemístěte homogenát do mikrotrubičky. Odstředíte 2 min. při 3000xg. Přemístěte čistou tekutinu do další trubičky a **ihned** otestujte na Alpha-1-Antitrypsin.

Takový extrahovaný vzorek stolice lze skladovat při 2-8 °C až 5 dní nebo při -20 °C až 1 týden.

Extrakce Alpha-1-Antitrypsin bez trubičky "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

- Vzorek stolice a **EXTRACT** musí mít pokojovou teplotu.
- Zvažte prázdnou trubičku. Odeberte vzorek stolice a přemístěte jej do trubičky. Zvažte jej a zjistíte čistou hmotnost vzorku.
- Nalijte **EXTRACT** do trubičky: 49násobkem čisté hmotnosti vzorku získáte roztok **1:50** dilution

| vzorek stolice + | EXTRACT | vzorek stolice + | EXTRACT |
|------------------|----------------|------------------|----------------|
| 15 mg | + 0.75 ml | 60 mg | + 2.9 ml |
| 20 mg | + 1.0 ml | 70 mg | + 3.4 ml |
| 30 mg | + 1.5 ml | 80 mg | + 3.9 ml |
| 40 mg | + 2.0 ml | 90 mg | + 4.4 ml |
| 50 mg | + 2.5 ml | 100 mg | + 4.9 ml |

Uzavřete trubičku. Vířte 30 s při 1800 ot./min. Homogenizujte po dobu 15 minut při nejvyšší rychlosti třepačky. Otevřete trubičku. Přemístěte homogenát do mikrotrubičky. Odstředíte 2 min. při 3000xg. Přemístěte čistou tekutinu do další trubičky a **ihned** otestujte na Alpha-1-Antitrypsin. Takový extrahovaný vzorek stolice lze skladovat při 2-8 °C až 5 dní nebo při -20 °C až 1 týden.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

WASH

Naředte obsah Promývacího pufru koncentrátu (50x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem

1000ml (1l). Promývací roztok se poté přeleje do výhradně k tomu určené nádoby. Pokud je třeba provést pouze jeden cyklus Alegria v jednom dni, doporučujeme transfer pouze 500 ml zředěného Promývacího pufru.

SYSTEM FLUID

Naředte obsah Ředěné systémové kapaliny koncentrátu (1000x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 2500ml před použitím. Systémová kapalina se následně přelije do připravené nádoby.

ALEGRIA TEST STRIPS

Vyjměte požadovaný počet testovacích proužků Alegria® ze zásobníku a nechejte je ohřát na pokojovou teplotu (20 -28°C). Nesundávejte fóliový obal prázdných jamek, dokud nebudete připraveni začít analýzu.

EXTRACT

Připraven k použití

PŘÍPRAVA SLOŽEK

Testovací proužky Alegria® s technologií SMC® se používají s diagnostickým zařízením Alegria®.

Podrobné informace o obsluze nástroje naleznete v návodu k obsluze zařízení.

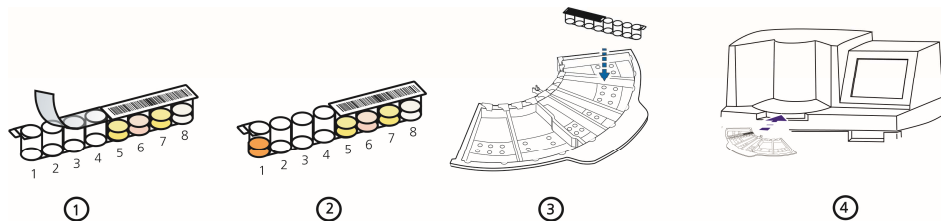
(1) Sejmout fólii, která pokrývá prázdné jamky 1 až 4 z potřebného testovacího proužku

Fólie otiskovaná čárkovým kódem, jenž pokrývá kavitu 5 až 8, není k sejmutí.

(2) Na dno kavitě 1 napipetovat jamky 10 µl nezředěného vzorku pacienta.

(3) Vložte proužek do SysTray.

(4) Umístěte obsazený SysTrays do správné polohy v nástroji Alegria® a spusťte test. Všechny další kroky se provedou automaticky. Testovací chod je dokončen, když nástroj začne tisknout výsledky.



KALIBRACE

Testovací systém je kalibrován pomocí referenčního přípravku Alpha-1-Antitrypsin purifikovaného z lidských neutrofilů.

VÝPOČET VÝSLEDKU

Pomocí technologie SMC® (Senzotronicky zapamatovaná kalibrace) se všechna data převádí do systému pomocí individuálních čárových kódů na testovacím proužku Alegria®. Vyhodnocení a interpretace výsledků probíhá plně automaticky.

PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY

Rozsah měření

Vypočet rozsahu analýzy Alegria® je 80 - 3600 µg/g

Předpokládané hodnoty

V běžném rozsahu studie vzorků dárců zdravé byly stanoveny následující rozsahy pomocí analýzy: hranice hodnoty 400 µg/g

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Normální rozsah < 400 µg/g
Zvýšené hodnoty ≥ 400 µg/g

Linearita

Tři vzorky pacientů obsahující vysokou úroveň určité Alpha-1-Antitrypsin byly sériově zředěny ve **Extrakce média** pro ukázkou dynamického rozsahu analýzy a horního / spodního konce linearitu. Aktivita pro každý roztok byla

spočítána pomocí SMC® technologie.

| Vzorek | Ředění | Pozorovaná | Očekávaná | P/O |
|--------|--------|------------|-----------|-----|
| | | [µg/g] | [µg/g] | [%] |
| 1 | 1 | 2443.0 | 2443.0 | 100 |
| | 2 | 1168.8 | 1221.5 | 96 |
| | 4 | 581.5 | 610.8 | 95 |
| | 8 | 275.0 | 305.4 | 95 |
| 2 | 16 | 156.1 | 152.7 | 90 |
| | 1 | 2000.0 | 2000.0 | 100 |
| | 2 | 1067.7 | 1000.0 | 107 |
| | 4 | 544.8 | 500.0 | 109 |
| 3 | 8 | 266.5 | 250.0 | 107 |
| | 1 | 1671.5 | 1671.5 | 100 |
| | 2 | 888.7 | 835.8 | 106 |
| | 4 | 445.2 | 417.9 | 107 |

Limit detekce

Nejnižší zjištělná koncentrace: 139 µg/g

Reprodukovatelnost

Intraanalyzáční přesnost: Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 20 nálezu v jednom cyklu. Výsledky pro přesnost analýzy jsou uvedeny v tabulce níže.

Interanalyzáční přesnost: Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 2 nálezu při 5 různých cyklech. Výsledky přesnosti mezi cykly jsou uvedeny v tabulce níže.

| Intra-Assay | | |
|-------------|--------|------|
| Vzorek | Průměr | % CV |
| | [µg/g] | [%] |
| 1 | 357.8 | 5.8 |
| 2 | 660.7 | 9.0 |
| 3 | 2777.0 | 6.6 |

| Inter-Assay | | |
|-------------|--------|------|
| Vzorek | Průměr | % CV |
| | [µg/g] | [%] |
| 1 | 433.7 | 5.0 |
| 2 | 2578.4 | 9.7 |
| 3 | 2736.2 | 8.7 |

Interference

Následující látky byly testovány na 15 mg vzorku stolice a bylo zjištěno, že neinterferují: vankomycin hydrochlorid 0,201 mg, ciprofloxacin 0,15 mg, prevazid 0,006 mg, azatioprin 0,021 mg, prednison 0,003 mg, pentasa 0,399 mg, vitamín A 2,4 UI, vitamín C 0,015 mg, vitamín E 0,03 mg, vitamín D3 0,33 UI, hemoglobin 1,749 mg.

Tyto mikroorganizmy byly tetovány při 1,1 x 10⁷ CFU na 15 mg vzorku stolice a bylo zjištěno, že neinterferují: E. coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella enterica, Shigella flexneri, Yersinia enterocolitica.

Výsledky studie

| | | Porovnávací metoda | | |
|---------------------|-------------|--------------------|-----|-----|
| | | pos | neg | |
| Alpha-1-Antitrypsin | ORG 286 pos | 52 | 1 | 171 |
| | neg | 1 | 117 | |
| | | 53 | 118 | |
| Pozitivní dohoda: | | 98.1 | % | |
| Negativní dohoda: | | 99.2 | % | |
| Celková dohoda: | | 98.8 | % | |

HRANICE METODY

Toto vyšetření je diagnostická pomůcka. Definitivní klinická diagnóza by neměla být založena na výsledcích

jediného testu, ale měly by být lékař po všech klinických a laboratorních nálezů byly hodnoceny o celé klinickým obrazem pacienta. Také každé rozhodnutí pro terapii by měla být přijata individuálně.

Výše uvedené referenční rozsahy patologických a normálních hodnot jsou uvedeny pouze jako doporučení. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí podle normy ISO 15189 nebo jiné použitelné laboratorní pokyny. Nesteroidní antiflogistika (NSAID) způsobují enteropatii až u 20-65 % pacientů, kteří jsou jimi léčeni. NSAID mohou způsobit zvýšenou koncentraci Alpha-1-Antitrypsin ve stolici. V takových případech je nutno zvážit opakované vyšetření Alpha-1-Antitrypsin ve stolici po ukončení léčby NSAID.

Výsledky nad rozsahem měření (> 3600 µg/g): doporučujeme zředit extrahovaný vzorek stolice předběžně pomocí média na extrakci stolice, např. 1:5 a text zopakovat použitím 10 µl předběžného zředění v jamce 1 tak, jak je popsáno v části METODA TESTOVÁNÍ. Výsledek testu vynásobte faktorem ředění, např. faktorem 5.

REFERENCE

1. Rodriguez-Otero P, Porcher R, Peffault de LR, Contreras M, Bouhnik Y, Xhaard A, Andreoli A, Ribaud P, Kapel N, Janin A, Socie G and Robin M: "Fecal calprotectin and Alpha-1-Antitrypsin predict severity and response to corticosteroids in gastrointestinal graft-versus-host disease". *Blood* 2012. **119**: 5909-5917.
2. Hagen LE, Schechter T, Luk Y, Brodovitch A, Gassas A, Doyle JJ: "High Alpha-1-Antitrypsin clearance predicts severity of gut graft-versus-host disease (GVHD) in children". *Pediatr Transplant*. 2011;15(6):659-663.
3. Umar SB and DiBaise JK: "Protein-losing enteropathy: case illustrations and clinical review". *Am J Gastroenterol* 2010. **105**: 43-49.
4. Braamskamp MJ, Dolman KM, and Tabbers MM, Clinical practice: "Protein-losing enteropathy in children". *Eur J Pediatr* 2010. **169**: 1179-1185.
5. Biancone L, Onali S, Calabrese E, Petruzzello C, Zorzi F, Condino G, Sica GS, and Pallone F: "Non-invasive techniques for assessing postoperative recurrence in Crohn's disease". *Dig.Liver Dis* 2008. **40 Suppl 2**: S265-S270.
6. Faust D, Raschke K, Hormann S, Milovic V, Stein J: "Regulation of alpha-1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells". *Clin Exp Immunol*. 2002 May; 128(2):279-84.
7. Faust D, Spirchez Z, Armbruster FP, and Stein J: "Determination of alpha-1-proteinase inhibitor by a new enzyme linked immunosorbant assay in feces, serum and an enterocyte-like cell line". *Z.Gastroenterol* 2001. **39**: 769-774.
8. Becker K, Frieling T, and Haussinger D: "Quantification of fecal Alpha-1-Antitrypsin excretion for assessment of inflammatory bowel diseases". *Eur J Med Res* 1998. **3**: 65-70.
9. Choudhary S, Gibson PR, Deacon MC, Young GP: "Measurement of faecal Alpha-1-Antitrypsin: methodologies and clinical application". *J Gastroenterol Hepatol*. 1996 Apr;11(4):311-8.
10. Arndt B, Schürmann G, Betzler M, Herfarth C, Schmidt-Gayk H: "Assessment of Crohn's disease activity and alpha 1-antitrypsin in faeces". *Lancet*. 1992 Oct 24, 340(8826):1037.
11. Boege F and Fischbach W: "Structural heterogeneity of faecal Alpha-1-Antitrypsin shown by immunoblot analysis in patients with Crohn's disease". *Gut* 1991. **32**: 496-499.
12. Strygler B, Nicar MJ, Santangelo WC, Porter JL, Fordtran JS: "Alpha-1-Antitrypsin excretion in stool in normal subjects and in patients with gastrointestinal disorders". *Gastroenterology*. 1990 Nov; 99(5):1380-7.
13. Karbach U, Ewe K: "Enteric protein loss in various gastrointestinal diseases determined by intestinal Alpha-1-Antitrypsin clearance". *Z Gastroenterol*. 1989 Jul; 27(7):362-5.
14. Bjarnason I. Gastrointestinal safety of NSAIDs and over-the-counter analgesics. *Int J Clin Pract Suppl*. 2013 (178):37-42.
15. Bjarnason I, Zanelli G, Prouse P, Smethurst P, Smith T, Levi S, et al. Blood and protein loss via small-intestinal inflammation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet*. 1987;2(8561):711-4.

