

Quantitative determination of α_1 -antitrypsin (α_1 -ATRYP) IVD

Store 2 - 8°C.

INTENDED USE

The α_1 -antitrypsin is a quantitative turbidimetric test for the measurement of α_1 -antitrypsin in human serum or plasma.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Anti- α_1 -antitrypsin antibodies when mixed with samples containing α_1 -antitrypsin, form insoluble complexes. These complexes cause an absorbance change, dependent upon the α_1 -antitrypsin concentration of the patient sample, that can be quantified by comparison from a calibrator of known α_1 -antitrypsin concentration.

CLINICAL SIGNIFICANCE

α_1 -antitrypsin is a glycoprotein synthesized by the hepatic parenchyma cells. It is the most abundant proteinase inhibitor in plasma after α_2 -macroglobulin. α_1 -antitrypsin has a strong action on elastase, skin collagenase, chymotrypsin, plasmin, and thrombin. It also shows inhibitory activity against fungal and leukocytic proteases.

The α_1 -antitrypsin deficiency is an inherited disorder caused by an abnormal gene (PiZ) aberration. This character is recessive and must be on both parents' genome to be expressed. Even if any of both develops the disorder. This deficiency is associated with an increased risk of pulmonary emphysema and hepatic diseases. Neonatal cholestasis, hepatitis and cirrhosis may be also related.

α_1 -antitrypsin increases its concentration due to inflammation or necrosis process. Serum levels begin to rise after approximately 24 hours and peak at 3 or 4 days.

REAGENTS

Diluent (R1)	Tris buffer 20 mmol/L, PEG 8000, pH 8.3. Sodium azide 0.95 g/L.
Antibody (R2)	Goat serum, anti-human α_1 -antitrypsin, pH 7.5. Sodium azide 0.95 g/L.
Optional	Ref: 1102003 PROT CAL

CALIBRATION

The assay has been standardized against the Reference Material CRM 470/RPPHS (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM). It must be used the PROT CAL to calibrate the reagent. The reagent (both monoreagent and bireagent) should be recalibrated every month, when the controls are out of specifications, and when changing the reagent lot or the instrument settings.

PREPARATION

Reagents: Ready to use.

Calibration Curve: Prepare the following PROT CAL dilutions in NaCl 9 g/L as diluent. Multiply the concentration of the α_1 -antitrypsin calibrator by the corresponding factor stated in table below to obtain the α_1 -antitrypsin concentration of each dilution.

Calibrator dilution	1	2	3	4	5	6
Calibrator (μ L)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (μ L)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date.

Reagent deterioration: The presence of particles and turbidity.

Do not freeze; frozen Antibody or Diluent could change the functionality of the test.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Thermostatic bath at 37°C.
- Spectrophotometer or photometer thermostatable at 37°C with a 340 nm filter (320 - 360 nm).

SAMPLES

Fresh serum or plasma. EDTA or heparin should be used as anticoagulant. Stable 7 days at 2-8°C or 3 months at -20°C.

The samples with presence of fibrin should be centrifuged before testing. Do not use highly hemolyzed or lipemic samples.

PROCEDURE

1. Bring the reagents and the photometer (cuvette holder) to 37°C.

2. Assay conditions:

Wavelength : 340 nm
Temperature : 37 °C
Cuvette lighth path : 1 cm

3. Adjust the instrument to zero with distilled water.

4. Pipette into a cuvette:

Reagent R1 (μ L)	800
Sample or Calibrator (μ L)	10

5. Mix and read the absorbance (A_1) after the sample addition.

6. Immediately, pipette into de cuvette:

Reagent R2 (μ L)	200
-----------------------	-----

7. Mix and read the absorbance (A_2) of calibrators and sample exactly 2 minutes after the R2 addition.

Spinreact has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

CALCULATIONS

Calculate the absorbance difference (A_2-A_1) of each point of the calibration curve and plot the values obtained against the α_1 -antitrypsin concentration of each calibrator dilution. α_1 -antitrypsin concentration in the sample is calculated by interpolation of its (A_2-A_1) in the calibration curve.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of manual and automated assay procedures. Spinreact PROT CONTROL (Ref.:1102004) is available. Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES²

Newborn: Between 124 - 348 mg/dL.

Adults: 90 - 200 mg/dL.

Each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measurement range: Up to 500 mg/dL under the described assay conditions. Samples with higher concentrations, should be diluted 1/5 in NaCl 9 g/L and retested again. The linearity limit depends on the sample / reagent ratio. It will be higher by decreasing the sample volume, although the sensitivity of the test will be proportionally decreased.

Detection Limit: Values less than 16 mg/dL give non-reproducible results.

Prozone effect: No prozone effect was detected upon 1000 mg/dL

Precision: The reagent has been tested for 20 days, using three levels of serum in a EP5-based study.

EP5	CV (%)		
	34.39 mg/dl	92.7 mg/dl	181.8 mg/dl
Total	4.2%	2.6%	2.8%
Within Run	0.8%	1.1%	1.6%
Between Run	3.8%	2.4%	2.3%
Between Day	1.6%	0%	0%

Sensitivity: Δ 3.4 mA / mg/dL.

Accuracy: Results obtained using this reagent (y) were compared to those obtained using the Beckman Array 360 CE. 35 samples ranging from 70 to 250 mg/dL of α_1 antitrypsin were assayed. The correlation coefficient (r) was 0.92 and the regression equation $y = 0.8567x + 26.5$.

The results of the performance characteristics depend on the used analyzer.

INTERFERENCES

Hemoglobin (up to 8 g/L), bilirubin (up to 40 mg/dL), rheumatoid factors (up to 790 IU/mL) and lipemia (up to 16 g/L), do not interfere. Other substances may interfere ^{6,7}.

NOTES

1. Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

BIBLIOGRAPHY

1. Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
2. Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34:517-520.
3. Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
4. Sharp HL. Hospital Practice; May 1971: 83-96
5. Carrel RW et al. Assays Med Biochem 1978; 4: 83-119
6. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Pres, 1995.
7. Friedman and Young. Effects of disease on clin. laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PACKAGING

Ref.: 1102054	Cont.	R1. Diluent: 1 x 40 mL R2. Antibody: 1 x 10 mL
---------------	-------	---

Determinación cuantitativa de α₁-antitripsina (α₁-ATRYP) IVD

Conservar a 2 - 8°C.

USO RECOMENDADO

Ensayo turbidimétrico para la cuantificación de α₁-antitripsina en suero o plasma humano.

PRINCIPIO DEL METODO

Los anticuerpos α₁-antitripsina forman compuestos insolubles cuando se combinan con la α₁-antitripsina de la muestra del paciente, ocasionando un cambio de absorbancia proporcional a la concentración de α₁-antitripsina en la muestra, y que puede ser cuantificada por comparación con un calibrador de α₁-antitripsina de concentración conocida.

SIGNIFICADO CLINICO

La α₁-antitripsina es una glicoproteína sintetizada por las células del parénquima hepático y liberada al torrente circulatorio. Es el inhibidor de proteasas más importante del plasma, después de la α₂-macroglobulina. La α₁-antitripsina reacciona fuertemente con la elastasa, colágenasa de la piel, quimiotripsina, plasmina y trombina, y también muestra actividad inhibidora frente a proteasas de leucocitos y hongos.

La deficiencia de α₁-antitripsina es un problema hereditario, y aparece cuando ambos progenitores transfieren el gen anormal (PiZ) al recién nacido. Esta deficiencia está asociada a un elevado riesgo de desarrollo de enfisema pulmonar y enfermedades hepáticas como la colestasis neonatal, hepatitis, cirrosis y carcinoma hepatocelular.

El aumento de la α₁-antitripsina es consecuencia de inflamación o procesos necróticos. Su nivel en suero empieza a aumentar aproximadamente después de 24 horas de iniciar el proceso y alcanza un máximo a las 3-4 horas del inicio.

REACTIVOS

Diluyente (R1)	Tampón tris 20 mmol/L, PEG 8000, pH, 8,3. Azida sódica 0,95 g/L.
Anticuerpo (R2)	Suero de cabra, α ₁ -antitripsina humana, pH 7,5. Azida sódica 0,95 g/L.
Opcional:	Ref: 1102003 PROT CAL

CALIBRACION

El ensayo está calibrado frente al Material de Referencia CRM 470/TRPHS (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM). Debe utilizarse el PROT CAL para la Calibración. El reactivo (tanto monoreactivo como bireactivo) se debe recalibrar cada mes, cuando los controles están fuera de especificaciones, y cuando el lote de reactivo o la configuración del instrumento cambia.

PREPARACION

Reactivos: Listos para el uso.

Curva de Calibración: Preparar las siguientes diluciones del PROT CAL en NaCl 9 g/L como diluyente. Para obtener las concentraciones de cada dilución del calibrador, multiplicar la concentración de α₁-ATRYP del calibrador por el factor correspondiente indicado en la tabla:

Dilución calibrador	1	2	3	4	5	6
Calibrador (μL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (μL)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, y se evita la contaminación durante su uso. No utilizar reactivos que hayan sobrepasado la fecha de caducidad.

Indicadores de deterioro: La presencia de partículas y turbidez.

No congelar; la congelación del Anticuerpo o Diluyente puede afectar la funcionalidad de los mismos.

MATERIAL ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C.
- Espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatable a 37°C para lecturas a 340 nm (320-360 nm).

MUESTRAS

Suero o plasma fresco, recogido con citrato sódico como anticoagulantes. Estable 7 días a 2-8°C o 3 meses a -20°C.

No utilizar muestras altamente hemolizadas o lipémicas.

PROCEDIMIENTO

- Calentar los reactivos y el fotómetro (portacubetas) a 37°C.
- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 340 nm
 - Temperatura: 37°C
 - Paso de luz de la cubeta: 1 cm
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

4. Pipetear en una cubeta:

Reactivo R1 (μL)	800
Muestra o Calibrador (μL)	10

5. Mezclar y leer la absorbancia (A₁) después de la adición de la muestra.

6. Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:

Reactivo R2 (μL)	200
------------------	-----

7. Mezclar y leer la absorbancia (A₂) exactamente después de 2 minutos de añadir el reactivo R2.

Spinreact dispone de adaptaciones detalladas a la mayoría de analizadores automáticos del mercado. Solicite la información a su distribuidor.

CALCULOS

Calcular la diferencia de absorbancias (A₂ - A₁) obtenidas para los distintos calibradores, y construir la curva de calibración de los valores obtenidos frente a las concentraciones de α₁-antitripsina de cada dilución del Calibrador. La concentración de α₁-antitripsina en la muestra se calcula por interpolación de su diferencia (A₂ - A₁) en la curva de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar sueros control para controlar los ensayos tanto en procedimiento manual como en automático. Spinreact dispone del PROT CONTROL Ref: 1102004. Cada laboratorio debería establecer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

VALORES DE REFERENCIA²

Recién nacidos: 124 - 348 mg/dL.

Adultos: 90 - 200 mg/dL.

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: hasta 500 mg/dL en las condiciones descritas del ensayo. Las muestras con valores superiores deben diluirse 1/5 con NaCl 9 g/L y ensayarse de nuevo. El intervalo de medida depende de la relación muestra/reactivo. Disminuyendo el volumen de muestra, se aumenta el límite superior del intervalo de medida, aunque se reduce la sensibilidad.

Límite de detección: valores por debajo de 16 mg/dL dan lugar a resultados poco reproducibles.

Efecto prozona: No se observa hasta valores de 1000 mg/dL.

Precisión: El reactivo ha sido probado durante 20 días con tres niveles diferentes de suero en un estudio basado en las normas EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	34.39 mg/dl	92.7 mg/dl	181.8 mg/dl
Total	4.2%	2.6%	2.8%
Intra-series	0.8%	1.1%	1.6%
Entre-series	3.8%	2.4%	2.3%
Entre-días	1.6%	0%	0%

Sensibilidad: Δ 3.4 mA / mg/dL.

Exactitud: El comportamiento de este método (y) fue comparado con el método Beckman Array 360 CE. 35 muestras de concentraciones de α₁-antitripsina entre 70 y 250 mg/dL fueron analizadas con ambos métodos.

El coeficiente de regresión (r) fue de 0,92 y la ecuación de la recta de regresión y = 0.8567x + 26,5.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Bilirrubina (hasta 40 mg/dL), hemoglobina (hasta 8 g/L), lípidos (hasta 16 g/L) y factores reumatoideos (hasta 790 UI/mL), no interfieren. Otras sustancias pueden interferir^{6,7}.

NOTAS

- El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

BIBLIOGRAFIA

- Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
- Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34:517-520.
- Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
- Sharp HL. Hospital Practice; May 1971: 83-96
- Carrel RW et al. Assays Med Biochem 1978; 4: 83-119
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Pres, 1995.
- Friedman and Young. Effects of disease on clin. laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PRESENTACION

Ref.: 1102054	Cont.	R1. Diluyente: 1 x 40 mL R2. Anticuerpo: 1 x 10 mL
---------------	-------	---

Détermination quantitative de α₁-antitrypsine (α₁-ATRYP) IVD

Conserver à 2 - 8°C.

USAGE RECOMMANDÉ

Essai turbidimétrique pour la quantification de α₁-antitrypsine en sérum ou plasma humain.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les anticorps α₁-antitrypsine forment des composés insolubles quand ils sont associés avec l'α₁-antitrypsine de l'échantillon du patient, occasionnant un changement d'absorbance proportionnel à la concentration d'α₁-antitrypsine dans l'échantillon, et qui peut être quantifiée par comparaison avec un calibreur d'α₁-antitrypsine de concentration connue.

SIGNIFICATION CLINIQUE

L'α₁-antitrypsine est une glycoprotéine synthétisée par les cellules du parenchyme hépatique et libérée dans la circulation sanguine. C'est l'inhibiteur de protéases le plus important du plasma, après l'α₂-macroglobuline. L'α₁-antitrypsine réagit fortement avec l'élastase, collagénase de la peau, chymotrypsine, plasmine et thrombine, et montre également une activité inhibitrice face aux protéases de leucocytes et de champignons.

La déficience en α₁-antitrypsine est un problème héréditaire, et elle apparaît quand les deux parents transmettent le gène anormal (PiZ) au nouveau-né. Cette déficience est associée à un risque élevé de développement d'emphysème pulmonaire et de maladies hépatiques telles que la cholestase néonatale, hépatite, cirrhose et carcinome hépatocellulaire.

L'augmentation de l'α₁-antitrypsine est la conséquence d'une inflammation ou de processus nécrotiques. Leur niveau en sérum commence à augmenter environ 24 heures après le début du processus et atteint un maximum 3-4 heures après le début.

RÉACTIFS

Diluant (R1)	Tampon tris 20 mmol/L, PEG 8000, pH, 8,3. Azoture de sodium 0,95 g/L.
Anticorps (R2)	Sérum de chèvre, α ₁ -antitrypsine humaine, pH 7,5. Azoture de sodium 0,95 g/L.
En option :	Réf : 1102003 PROT CAL

ÉTALONNAGE

L'essai est étalonné par rapport au matériel de référence CRM 470/TRPHS (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM). Pour l'étalonnage il faut utiliser le PROT CAL. Le réactif (aussi bien monoréactif que biréactif) doit être recalibré tous les mois, quand les contrôles sont en dehors des spécifications, et quand le lot de réactif ou la configuration de l'instrument change.

PRÉPARATION

Réactifs : Prêt à l'usage.

Courbe d'étalonnage : Préparer les dilutions suivantes du PROT CAL en NaCl 9 g/L comme diluant. Pour obtenir les concentrations de chaque dilution du calibreur, multiplier la concentration d'α₁-ATRYP du calibreur par le facteur correspondant indiqué dans le tableau :

Dilution calibreur	1	2	3	4	5	6
Calibreur (μL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (μL)	100	90	75	50	25	-
Facteur	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0

CONSERVATION ET STABILITÉ

Tous les composants du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration quand les flacons sont gardés bien fermés à 2-8°C, et que la contamination est évitée au cours de leur utilisation. Ne pas utiliser de réactifs qui ont dépassé la date d'expiration.

Indicateurs de détérioration : Présence de particules et de turbidité.

Ne pas congeler, la congélation de l'anticorps ou du diluant peut affecter leur fonctionnalité.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

- Bain - marie à 37°C.
- Spectrophotomètre ou photomètre avec cuvette thermostable à 37°C pour des lectures à 340 nm (320-360 nm).

ÉCHANTILLONS

Sérum ou plasma frais, recueilli avec citrate sodique comme anticoagulants. Stable 7 jours à 2-8°C ou 3 mois à -20°C.

Ne pas utiliser d'échantillons fortement hémolysés ou lypémiques.

PROCÉDURE

1. Chauffer les réactifs et le photomètre (porte- cuvettes) à 37°C.

2. Conditions de l'essai :

Longueur d'onde : 340 nm

Température : 37°C

Passage de lumière de la cuvette: 1 cm

3. Ajuster le spectrophotomètre à zéro par rapport à l'eau distillée.

4. Introduire la pipette dans une cuvette :

Réactif R1 (μL)	800
Échantillon ou calibreur (μL)	10

5. Mélanger et lire l'absorbance (A₁) après l'ajout de l'échantillon.

6. Introduire la pipette dans la cuvette tout de suite après :

Réactif R2 (μL)	200
-----------------	-----

7. Mélanger et lire l'absorbance (A₂) exactement 2 minutes après avoir ajouté le réactif R2.

Spinreact dispose d'adaptations détaillées pour la plupart des analyseurs automatiques du marché. Veuillez contacter votre distributeur pour obtenir des informations.

CALCULS

Calculer la différence d'absorbances (A₂ - A₁) obtenues pour les différents calibreurs, et construire la courbe d'étalonnage des valeurs obtenues face aux concentrations d'α₁-antitrypsine de chaque dilution du calibreur. La concentration d'α₁-antitrypsine dans l'échantillon est calculée par interpolation de sa différence (A₂ - A₁) dans la courbe d'étalonnage.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Il est recommandé d'utiliser des sérums de contrôle, afin de contrôler les essais aussi bien lors de procédures manuelles qu'automatiques. Spinreact dispose du PROT CONTROL Réf : 1102004. Chaque laboratoire doit établir son propre Contrôle de Qualité et des corrections en cas de non-conformité des contrôles en termes de tolérances exigées.

VALEURS DE RÉFÉRENCE²

Nouveaux nés : 124 - 348 mg/dL.

Adultes : 90 - 200 mg/dL.

Chaque laboratoire devrait établir ses propres valeurs de référence.

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

Limite de linéarité: jusqu'à 500 mg/dL dans les conditions décrites de l'essai. Les échantillons avec des valeurs supérieures doivent être dilués 1/5 avec NaCl 9 g/L et testés à nouveau. L'intervalle de mesure dépend du rapport échantillon/réactif. En réduisant le volume d'échantillon, on augmente la limite supérieure de l'intervalle de mesure, même si la sensibilité est réduite.

Limite de détection: les valeurs en dessous de 16 mg/dL entraînent des résultats peu reproductibles.

Effet prozone: Aucun effet prozone n'a été observé jusqu'à des valeurs de 1000 mg/dL.

Précision: Le réactif a été testé pendant 20 jours avec trois niveaux de sérum différents dans une étude basée sur les normes EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	34,39 mg/dL	92,7 mg/dL	181,8 mg/dL
Total	4,2%	2,6%	2,8%
Pendant l'exécution	0,8%	1,1%	1,6%
Entre l'exécution	3,8%	2,4%	2,3%
Entre jours	1,6%	0%	0%

Sensibilité: Δ 3.4 mA / mg/dL.

Exactitude: Le comportement de cette méthode (y) a été comparé avec la méthode Beckman Array 360 CE. 35 échantillons de concentrations de α₁-antitrypsine entre 70 et 250 mg/dL ont été analysés avec les deux méthodes. Le coefficient de régression (r) a été de 0,92 et l'équation de la droite de régression y = 0.8567x + 26,5.

Les caractéristiques de la méthode peuvent varier selon l'analyseur utilisé.

INTERFÉRENCES

Bilirubine (jusqu'à 40 mg/dL), hémoglobine (jusqu'à 8 g/L), lipides (jusqu'à 16 g/L) et facteurs rhumatoïdes (jusqu'à 790 UI/mL), n'interfèrent pas. D'autres substances peuvent interférer^{6,7}.

REMARQUES

1. Le diagnostic clinique ne doit pas être réalisé uniquement avec les résultats d'un seul essai, mais doit également tenir compte des données cliniques du patient.

BIBLIOGRAPHIE

1. Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NWTietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
2. Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34:517-520.
3. PesceAJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
4. Sharp HL. Hospital Practice; May 1971: 83-96
5. Carrel RW et al. Assays Med Biochem 1978; 4: 83-119
6. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Pres, 1995.
7. Friedman and Young. Effects of disease on clin. laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PRÉSENTATION

Réf : 1102054

Cont.

R1. Diluant : 1 x 40 mL

R2. Anticorps : 1 x 10 mL

Determinação quantitativa de α₁-antitripsina (α₁-ATRYP)
IVD

Conservar a 2 – 8 °C.

UTILIZAÇÃO RECOMENDADA

Ensaio turbidimétrico para a quantificação de α₁-antitripsina no soro ou plasma humano.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os anticorpos α₁-antitripsina formam compostos insolúveis quando se combinam com a α₁-antitripsina da amostra do doente, provocando uma alteração na absorvância proporcional à concentração de α₁-antitripsina na amostra, e que pode ser quantificada por comparação com um calibrador de α₁-antitripsina de concentração conhecida.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A α₁-antitripsina é uma glicoproteína sintetizada pelas células do parênquima hepático e libertada na corrente sanguínea. É o inibidor de proteases mais importante do plasma, a seguir à α₂-macroglobulina. A α₁-antitripsina reage fortemente com a elastase, colagenase da pele, quimiotripsina, plasmina e trombina, e também apresenta atividade inibidora às proteases de leucócitos e fungos.

A deficiência de α₁-antitripsina é um problema hereditário e aparece quando ambos progenitores transferem o gene anormal (PiZ) ao recém-nascido. Esta deficiência está associada a um elevado risco de desenvolvimento de enfisema pulmonar e doenças hepáticas como a colostase neonatal, hepatite, cirrose e carcinoma hepatocelular.

O aumento da α₁-antitripsina é consequência da inflamação ou de processos necróticos. O seu nível no soro começa a aumentar aproximadamente após 24 horas de iniciar o processo e alcança um máximo às 3 - 4 horas após o início.

REAGENTES

Solvente (R1)	Tampão tris 20 mmol/L, PEG 8000, pH, 8,3. Azida sódica 0,95 g/L.
Anticorpo (R2)	Soro de cabra, α ₁ -antitripsina humana, pH 7,5. Azida sódica 0,95 g/L.
Opcional:	Ref: 1102003 PROT CAL

CALIBRAÇÃO

O ensaio está calibrado comparativamente a um Material de Referência CRM 470/TRPHS (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM). Deve utilizar-se o calibrador PROT CAL para a Calibração. O reagente (tanto monoreativo como bireativo) deve ser recalibrado a cada mês, quando os controlos estiverem fora de especificação e quando o lote de reagente ou a configuração do instrumento muda.

PREPARAÇÃO

Reagentes: Prontos a utilizar.

Curva de Calibração: Preparar as diluições seguintes do calibrador PROT CAL em NaCl 9 g/l como solvente. Para obter as concentrações de cada diluição do calibrador, multiplicar a concentração de α₁-ATRYP do calibrador pelo fator correspondente indicado na tabela:

Diluição do calibrador	1	2	3	4	5	6
Calibrador (μL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (μL)	100	90	75	50	25	-
Fator	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Todos os componentes do kit são estáveis até à data de validade indicada no rótulo do frasco quando os frascos são mantidos bem fechados a 2 - 8 °C e se evita a contaminação durante a sua utilização. Não utilizar reagentes que tenham excedido a data de validade indicada.

Indicadores de degradação: Presença de partículas e turvação.

Não congelar; a congelação do Anticorpo ou Solvente pode afetar a sua funcionalidade.

MATERIAL ADICIONAL

- Banho de água a 37 °C.
- Espectrofotómetro ou fotómetro com cuvete termostaticável a 37 °C para leituras a 340 nm (320 - 360 nm).

AMOSTRAS

Soro ou plasma fresco, recolhido com citrato de sódio como anticoagulantes. Estável durante 7 dias a 2 – 8 °C ou durante 3 meses a -20 °C. Não utilizar amostras altamente hemolizadas ou lipémicas.

PROCEDIMENTO

1. Aquecer os reagentes e o fotómetro (porta-cuvetes) a 37 °C.

2. Condições do ensaio:

Comprimento de onda: 340 nm

Temperatura: 37 °C

Caminho de luz da cuvete: 1 cm

3. Ajustar o espectrofotómetro a zero com água destilada.

4. Pipetar numa cuvete:

Reagente R1 (μL)	800
Amostra ou Calibrador (μL)	10

5. Misturar e ler a absorvância (A₁) após a adição da amostra.

6. Imediatamente depois, pipetar na cuvete:

Reagente R2 (μL)	200
------------------	-----

7. Misturar e ler a absorvância (A₂) exatamente 2 minutos após adicionar o reagente R2.

A Spinreact dispõe de adaptações detalhadas para a maioria dos analisadores automáticos do mercado. Solicite a informação ao seu distribuidor.

CÁLCULOS

Calcular a diferença de absorvâncias (A₂ - A₁) obtidas para os diferentes calibradores e construir a curva de calibração dos valores obtidos comparativamente às concentrações de α₁-antitripsina de cada diluição do calibrador. A concentração de α₁-antitripsina na amostra é calculada por interpolação da sua diferença (A₂ - A₁) na curva de calibração.

CONTROLO DE QUALIDADE

Recomenda-se utilizar soros controlo para controlar os ensaios tanto no procedimento manual como automático. A Spinreact dispõe do PROT CONTROL Ref: 1102004. Cada laboratório deve dispor do seu próprio Controlo de Qualidade e estabelecer ações corretivas no caso de os controlos não estarem de acordo com as tolerâncias aceitáveis.

VALORES DE REFERÊNCIA²

Recém-nascidos: 124 – 348 mg/dL.

Adultos: 90 – 200 mg/dL.

É recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

Intervalo de medição: até 500 mg/dL nas condições descritas do ensaio. As amostras com valores superiores devem ser diluídas 1/5 com NaCl 9 g/L e serem ensaiadas novamente. O intervalo de medição depende da proporção amostra/reagente. Diminuindo o volume da amostra, aumenta-se o limite superior do intervalo de medição, embora se reduza a sensibilidade.

Limite de deteção: valores inferiores a 16 mg/dL originam resultados pouco reprodutíveis.

Efeito prozona: não se observa até valores de 1000 mg/dL.

Precisão: o reagente foi testado durante 20 dias com três níveis diferentes de soro num estudo baseado nas normas EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	34,39 mg/dL	92,7 mg/dL	181,8 mg/dL
Total	4,2%	2,6%	2,8%
Within Run	0,8%	1,1%	1,6%
Between Run	3,8%	2,4%	2,3%
Between Day	1,6%	0%	0%

Sensibilidade: Δ 3,4 mA / mg/dL.

Exatidão: o comportamento deste método (y) foi comparado com o obtido utilizando o método Beckman Array 360 CE. 35 amostras com concentrações de α₁-antitripsina entre 70 e 250 mg/dL foram analisadas com ambos métodos. O coeficiente de regressão (r) foi de 0,92 e a equação da reta de regressão y = 0,8567x + 26,5.

As características do método variam de acordo com o analisador utilizado.

INTERFERÊNCIAS

Bilirrubina (até 40 mg/dL), hemoglobina (até 8 g/L), lípidos (até 16 g/L) e fatores reumatóides (até 790 UI/mL), não interferem. Outras substâncias podem interferir^{6,7}.

NOTAS

1. O diagnóstico clínico não deve realizar-se unicamente através dos resultados de um único ensaio, devendo considerar-se em simultâneo os dados clínicos do doente.

BIBLIOGRAFIA

1. Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
2. Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34:517-520.
3. Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
4. Sharp HL. Hospital Practice; May 1971: 83-96
5. Carrel RW et al. Assays Med Biochem 1978; 4: 83-119
6. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Pres, 1995.
7. Friedman and Young. Effects of disease on clin. laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

APRESENTAÇÃO

Ref.: 1102054	Cont.	R1. Solvente: 1 x 40 mL R2. Anticorpo: 1 x 10 mL
---------------	-------	---