

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 ClNa 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 light 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

1. **Measurement range:** Up to 400 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.
2. **Detection Limit:** Values less than 16 mg/dL give non-reproducible results.
3. **Prozone effect:** No prozone effect was detected upon 750 mg/dL.
4. **Sensitivity:** Δ 3.4 mA / mg/dL.
5. **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%

6. **Accuracy:** Results obtained using this reagent (y) were compared to those obtained using the Beckman Array 360 CE. 35 samples ranging from 100 to 300 mg/dL of α_1 antitrypsin were assayed. The correlation coefficient (r) was 0.92 and the regression equation $y = 0.84x + 26.5$.

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 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, quimioproteína, 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 CINA 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
CINA 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.
- 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 400 mg/dL en las condiciones descritas del ensayo. Las muestras con valores superiores deben diluirse 1/5 con CINA 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.
- Sensibilidad:** Δ 3.4 mA / mg/dL.
- Efecto prozona:** No se observa hasta valores de 750 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%
Within Run	0.8%	1.1%	1.6%
Between Run	3.8%	2.4%	2.3%
Between Day	1.6%	0%	0%

- Exactitud:** El comportamiento de este método (y) fue comparado con el método Beckman Array 360 CE. 35 muestras de concentraciones de α₁-antitripsina entre 100 y 300 mg/dL fueron analizadas con ambos métodos. El coeficiente de regresión (r) fue de 0,92 y la ecuación de la recta de regresión $y = 0.84x + 26.5$.

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 reumatoides (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. AACCPres, 1995.
- Friedman and Young. Effects of disease on clin. laboratory tests, 3th ed. AACCPres, 1997.

PRESENTACION

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