

RIDASCREEN[®] α_1 -Antitrypsin

Ref. G09034



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt,
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Uso previsto

Para diagnósticos *in vitro*. RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin es un inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de α_1 antitripsina en muestras de heces.

2. Resumen y descripción del ensayo

Las proteínas son componentes fundamentales de los alimentos y constituyentes esenciales del cuerpo. El cuerpo debe ser capaz de procesar proteínas, es decir, sintetizar y degradar las proteínas en función de las necesidades.

Enzimas proteolíticas como la tripsina y la quimotripsina contribuyen a la degradación de las proteínas. Las enzimas proteolíticas no solo digieren alimentos sino que ayudan también a combatir infecciones bacterianas y enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal. Los inhibidores proteolíticos se encargan de detener la acción de las enzimas proteolíticas antes de que destruyan tejidos sanos. Uno de los principales inhibidores de enzimas proteolíticas es una glucoproteína de 50 kilodaltons denominada alfa₁-antitripsina (A1AT), o inhibidor de proteinasa α_1 . La A1AT es un inhibidor primario que forma complejos reversibles con proteasas séricas como la elastasa de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), tripsina, quimotripsina y células inflamatorias activas del sistema inmunológico.

En consecuencia, la A1AT tiene un importante efecto regulador de los procesos inflamatorios, sobre todo al inhibir la elastasa PMN, una proteasa liberada por los leucocitos. El cuerpo libera elastasa PMN en respuesta a estímulos inflamatorios. Como regulador de la actividad de las proteasas, la α_1 -antitripsina se encarga de que los efectos de la elastasa OMN se circunscriban a la inflamación y de proteger a los tejidos sanos contra la degradación proteolítica. Esto hace de la α_1 -antitripsina un valioso indicador de la actividad de enfermedades intestinales inflamatorias crónicas. Los pacientes con enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y otros trastornos intestinales, como pólipos, cáncer de colon, diverticulitis, enfermedad celiaca o alergias alimentarias graves presentan niveles de α_1 -antitripsina drásticamente elevados. La A1AT se utiliza asimismo como marcador fecal de pérdida de proteínas intestinales y aumento de la permeabilidad de la mucosa en pacientes con mucosa intestinal dañada.

En general se considera que la α_1 -antitripsina se sintetiza principalmente en el hígado y en las células intestinales y se excreta con las heces sin fragmentación trípica o resorción. En consecuencia, la α_1 -antitripsina no experimenta degradación en el intestino y es, por tanto, idónea como marcador fecal.

3. Principio de ensayo

RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de dos capas específico para la α_1 -antitripsina. Los pocillos de la placa de microtitulación están recubiertas de un anticuerpo específico contra epítopos de α_1 -antitripsina humana.

Se pipetea una alícuota de la suspensión fecal de ensayo en un pocillo de la placa de microtitulación y se incuba. A continuación se lava la placa y se incuba por segunda vez con un anticuerpo policlonal anti- α_1 -antitripsina conjugado con peroxidasa de rábano picante. Si la muestra contiene α_1 -antitripsina, se forma un complejo tipo sándwich compuesto por el anticuerpo inmovilizado, el antígeno de la α_1 -antitripsina y el anticuerpo conjugado. Se realiza un segundo paso de lavado para eliminar los anticuerpos marcados con enzima que no se han ligado. En las muestras positivas para α_1 -antitripsina, la adición de una solución sustrato provoca la unión de la enzima y la transformación de la solución incolora de los pocillos de la placa en un líquido azul. Después de añadir la solución de parada, el color cambia de azul a amarillo. La extinción (densidad óptica) medida a continuación es proporcional a la concentración de α_1 -antitripsina en la muestra.

4. Reactivos suministrados

Cada kit contiene reactivos suficientes para 96 ensayos.

Plate	96 ensayos	Placa de pocillos; 12 tiras de pocillos (separable) en portatiras; recubierta con anticuerpos policlonales (de conejo) contra α_1 -antitripsina humana
Extract 10x	100 ml	Tampón de extracción/dilución (para extracción y dilución inicial de las heces); solución salina tamponada con fosfato; contiene NaN_3 0,1%; concentración 10 X
Diluent 3	100 ml	Diluyente de muestras (para dilución final); solución salina tamponada con proteína; contiene NaN_3 0,1%; listo para usar; color rojo
Wash 10x	100 ml	Tampón de lavado; solución salina tamponada con fosfato; contiene timerosal 0,1%; concentración 10 X
Calibrator	1 ml	1 Calibrador; contiene NaN_3 0,1%; listo para usar; tapón blanco
Control +	1 ml	1 Control positivo; contiene NaN_3 0,1%; listo para usar; tapón rojo
Low Control +	1 ml	1 Control positivo bajo; contiene NaN_3 0,1%; listo para usar; tapón verde
Conjugate	12 ml	Anticuerpo policlonal (de conejo) conjugado con peroxidasa contra α_1 -antitripsina humana en solución proteica estabilizada; listo para usar; tapón rojo
SeroSC	12 ml	Peróxido de urea/tetrametilbencidina (TMB); listo para usar
Stop	12 ml	Solución de parada; ácido sulfúrico 1 N; listo para usar

Información detallada sobre sustancias peligrosas conforme a los requisitos de etiquetado. Para más información, consultar las hojas de datos de seguridad (MSDS) en www.r-biopharm.com.

5. Instrucciones de almacenamiento

Todos los reactivos deben almacenarse a 2 – 8 °C y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del producto. Una vez reconstituido, el tampón de lavado y de extracción diluido puede conservarse durante 4 semanas a 2 - 8 °C. Evitar toda contaminación microbiana. No es posible garantizar la calidad del producto pasada la fecha de caducidad. Utilizar tijeras para abrir la bolsa de aluminio sin dañar el precinto con cierre hermético. Guardar inmediatamente las tiras de pocillos sin usar en la bolsa de aluminio y conservar a 2 - 8 °C. Proteger la solución de sustrato incolora de la luz directa para evitar la descomposición y coloración (cambio a color azul) por autooxidación. Desechar el sustrato si ha cambiado de color.

6. Material necesario pero no incluido

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada

6.2. Equipos

- tubos de ensayo
- pipetas desechables (ref.: Z0001)
- mezclador de vórtice (opcional; ver 9.4.)
- micropipetas de 50 - 100 µl y 1 ml
- probeta graduada (1000 ml)
- temporizador
- unidad de lavado de placas de pocillos o pipetas multicanal (300 µl)
- fotómetro para placas de pocillos (filtro de referencia 450 nm/620 nm)
- papel de filtro (toallitas desechables)
- recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito 0,5%

7. Precauciones

Para diagnósticos in vitro exclusivamente.

Este ensayo debe realizarlo exclusivamente personal de laboratorio cualificado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Respetar el manual de instrucciones del procedimiento de ensayo. No pipetear muestras o reactivos con la boca. Evitar el contacto con hematomas de la piel o membranas mucosas. Llevar ropa de protección adecuada para manejar reactivos o muestras (guantes, bata de laboratorio y gafas de protección) y lavar las manos al término del procedimiento de ensayo. No fumar, comer o beber en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

Para más información, consultar las hojas de datos de seguridad (MSDS) en www.r-biopharm.com.

El calibrador, el control positivo y el control positivo bajo contienen componentes de sangre humana negativos para HIV y hepatitis. No obstante, tanto estos componentes como las muestras fecales deben tratarse como material potencialmente infeccioso y manejarse de acuerdo con lo establecido en las normativas de seguridad nacionales.

El tampón de lavado contiene timerosal 0,1% como conservante. Evitar el contacto con hematomas de la piel o membranas mucosas.

El calibrador, el control positivo, el control positivo bajo, el tampón de extracción y el diluyente de la muestra contienen NaN_3 0,1%. Evitar el contacto con hematomas de la piel o membranas mucosas.

El sustrato contiene peróxido de urea/TMB y puede causar quemaduras. Manejar con precaución.

La solución de parada contiene ácido sulfúrico 1 N. Evitar el contacto con la piel y la ropa. En caso de contacto, lavar con agua las partes de la piel afectadas.

Todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas deben tratarse con desinfectantes adecuados o esterilizarse a 121 °C en autoclave durante por lo menos una hora. ADVERTENCIA: para evitar la formación de gases tóxicos, neutralizar las soluciones de parada que contengan residuos líquidos antes de eliminarlas en solución de hipoclorito.

Eliminar correctamente todos los reactivos y materiales usados. Consultar las normativas nacionales aplicables en materia de eliminación de residuos.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Conservar todas las muestras de ensayo a 2 - 8 °C hasta el momento de procesarlas. Si las muestras no van a procesarse en un plazo de 3 días, deberán congelarse como mínimo a -20 °C. Evitar congelar y descongelar varias veces las muestras. No guardar las muestras de heces y los hisopados rectales en recipientes de transporte que contengan materiales con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes porque pueden interferir con el test RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin.

9. Procedimiento de ensayo

9.1. Información general

Dejar que los reactivos del kit y la placa de pocillos [Plate] alcancen temperatura ambiente antes de usarlos (20 a 25 °C). No sacar las tiras de pocillos de la bolsa de aluminio hasta que hayan alcanzado temperatura ambiente. Mezclar los reactivos energicamente inmediatamente antes de usarlos. Conservar todas las tiras de pocillos (dentro de la bolsa cerrada herméticamente) y los reactivos que no se hayan usado en el refrigerador a 2 - 8 °C. Eliminar las tiras de pocillos que se hayan usado una vez. No utilizar reactivos y tiras de pocillos si el envase está dañado o los viales no están cerrados herméticamente. Para evitar contaminación cruzada, las muestras del test no deben tener contacto directo con los componentes del kit.

No realizar el ensayo con luz solar directa. Cubrir o tapar con cinta adhesiva la placa de pocillos para evitar pérdidas por evaporación durante el ensayo.

NOTA: el calibrador y el control positivo deben analizarse con cada lote de muestras. El control positivo bajo puede analizarse con el lote si es necesidad.

9.2. Preparación del tampón de lavado

Mezclar 1 parte de tampón de lavado concentrado **Wash 10x** con 9 partes de agua destilada. Calentar el vial en baño maría (37 °C) para disolver los cristales que pueda contener el concentrado antes de reconstituirlo.

9.3. Preparación del tampón de extracción

Mezclar 1 parte de tampón de extracción concentrado **Extract 10x** con 9 partes de agua destilada (1:10). Calentar el vial en baño maría (37 °C) para disolver los cristales que pueda contener el concentrado antes de reconstituirlo.

9.4. Preparación de muestras

9.4.1. Pesaje y suspensión de muestras

Introducir 100 mg de una muestra de heces en un tubo de ensayo etiquetado y añadir 5 ml de tampón de extracción (1:50) con pipeta.

Alternativamente, introducir 80 a 130 mg de una muestra de heces en el tubo de ensayo y añadir un volumen proporcionalmente menor o mayor de tampón de extracción diluido (consultar tabla 1) a la muestra (para mantener constante la relación de dilución).

Tabla 1: volumen requerido de tampón de extracción diluido en función del peso de la muestra de heces

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

Independientemente del método de pesaje, todas las muestras fecales se homogeneizan enérgicamente en un mezclador de vórtice. En el caso de heces líquidas, pipetear exactamente 100 µl de muestra de heces y suspenderla en exactamente 5 ml de tampón de extracción diluido.

A continuación, centrifugar la muestra homogeneizada como mínimo a 3000 g durante 10 minutos para asegurar la sedimentación de las partículas fecales gruesas.

9.4.2. Dilución manual de muestras

Diluir 50 µl de sobrenadante limpio con 950 µl de tampón de extracción diluido y vórtice (1:20). La dilución final de la muestra consiste en diluir otros 50 µl de la primera dilución con 950 µl de diluyente de muestras **Diluent | 3** RIDASCREEN® (1:20) y homogeneización en mezclador de vórtice. En el ensayo se utilizará la dilución final de la muestra de heces (véase 9.5.).

9.4.3. Dilución automática de muestras

Los usuarios que utilicen el sistema automático DSX-ELISA de Dynex para realizar el ensayo pueden aplicar los pasos de dilución de muestras descritos a continuación. Para la dilución de muestras automática se necesita también un sobrenadante libre de partículas, igual que en la dilución manual. Los usuarios que utilicen otros sistemas de pipeteo automático ELISA deberán solicitar las oportunas instrucciones a R-Biopharm.

El sistema ELISA pipetea automáticamente 25 µl de sobrenadante en una placa DeepWell y los diluye con 975 µl de tampón de extracción diluido (1:40). Se ejecutan dos ciclos de mezclado consecutivos.

El número requerido de pocillos recubiertos se coloca en el soporte de pocillos de la placa de pocillos **Plate** RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin.

A continuación se extrae una alícuota de 10 µl de muestra diluida de la placa DeepWell, se transfiere a la placa de pocillos **Plate** RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin, y se diluye nuevamente con 90 µl de diluyente de muestras **Diluent | 3** RIDASCREEN® (1:10).

9.5. Primera incubación

Después de introducir el número deseado de pocillos recubiertos en el soporte se añaden 100 µl de calibrador **Calibrator** (por duplicado), 100 µl de diluyente de muestras **Diluent | 3** (= control negativo), 100 µl de control positivo **Control | +** y 100 µl de la muestra de heces diluida a los pocillos correspondientes. Si es necesario, pueden analizarse 100 µl de control positivo bajo **Low Control | +** con el lote. La placa se incuba a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 1 hora.

9.6. Primer lavado

Puesto que el lavado a fondo es un paso esencial para conseguir resultados de ensayo correctos, es crucial seguir al pie de la letra las instrucciones de lavado. Decantar las soluciones incubadas en los pocillos en un recipiente de residuos de laboratorio con solución desinfectante de hipoclorito. A continuación, golpear suavemente la microplaca sobre papel absorbente para eliminar los restos de líquido y lavar la placa cinco veces con 300 µl de tampón de lavado cada vez. Después de cada paso de lavado, golpear suavemente la placa sobre una zona sin usar del papel absorbente para asegurar que el líquido se ha eliminado por completo.

En caso de utilizar un equipo de limpieza automático, verificar que el equipo está ajustado correctamente para el tipo específico de placa de microtitulación utilizada. Las suspensiones de muestras de heces que no están completamente libres de partículas deben retirarse manualmente de los pocillos para evitar que se bloqueen las agujas de lavado. Es fundamental verificar que se han eliminado completamente las soluciones en cada paso de lavado. Después del último paso de lavado, golpear suavemente la placa sobre papel absorbente limpio o toallita de laboratorio para eliminar todo resto de humedad.

9.7. Segunda incubación

Añadir 100 µl de conjugado **Conjugate** en cada pocillo e incubar la placa durante una hora a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.8. Segundo lavado

Después de la segunda incubación, lavar la placa cinco veces con 300 µl de tampón de lavado en cada paso. Después de cada paso de lavado, golpear suavemente la placa sobre una zona sin usar del papel absorbente para asegurar que el líquido se ha eliminado por completo.

9.9. Tercera incubación

Añadir 100 µl de solución de sustrato **SeroSC** en cada pocillo e incubar la placa a oscuras y a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 15 minutos. A continuación, añadir 50 µl de solución de parada **Stop** en cada pocillo para detener la reacción (mezclar con precaución agitando a mano suavemente la placa) y medir la extinción/densidad óptica (DO) en los pocillos con una longitud de onda de 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm).

NOTA: reacciones positivas fuertes pueden provocar la formación de precipitados de color negro en la solución de sustrato.

10. Control de calidad. Señales de deterioro de los reactivos

El calibrador (por duplicado), el control positivo y, si es preciso, el control positivo bajo deberán analizarse con cada lote de muestras de paciente para garantizar la calidad de los reactivos y el correcto desarrollo del ensayo. El test se habrá realizado correctamente si la extinción (DO) de los controles está dentro de los rangos indicados en la hoja de datos de lote específica que se suministra con el kit. Si los valores medidos quedan fuera de los rangos objetivo, deberán comprobarse las siguientes variables antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
- Realización correcta del procedimiento de ensayo
- Comprobación visual de contaminación o pérdidas en los componentes del kit; la solución de sustrato no debe utilizarse si ha cambiado de color (azul)

Si los requisitos de calidad siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consultar al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Cuantificación de un punto utilizando el modelo logístico de cuatro parámetros

El ELISA RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin utiliza un modelo logístico de cuatro parámetros (4PL) para determinar la concentración de α_1 -antitripsina en heces en $\mu\text{g/g}$.

Para evaluar los resultados del ensayo se necesita el software analítico RIDA®SOFT Win. Solicitar RIDA®SOFT Win o una versión actualizada a R-Biopharm AG o al distribuidor local R-Biopharm.

Los cuatro parámetros (A - D) de la curva estándar necesarios para los cálculos 4PL y los valores nominales del calibrador, control positivo y control positivo bajo figuran en la hoja de datos de lote específica que se suministra con el kit y deben compararse con los valores del software de análisis antes de cada medición utilizando la información pertinente de la hoja de datos.

R-Biopharm AG determina la curva estándar (incluidos los parámetros A - D), el valor nominal y los rangos admisibles de la desviación estándar para el calibrador, control positivo y control positivo bajo en condiciones de ensayo óptimas para cada lote del kit. El calibrador se utiliza para en análisis cuantitativo de las muestras. El control positivo y control positivo bajo sirven para la validación interna del ensayo en el laboratorio.

RIDA®SOFT Win calcula un factor de corrección F a partir del valor medio de la determinación por duplicado del calibrador y su valor nominal, que se concilia con los valores de extinción (DO) de las muestras de heces. El resultado es una evaluación segura y fiable de los resultados del ensayo dentro del rango de la curva estándar.

En lugar de RIDA®SOFT Win pueden utilizarse otros software de análisis basados en el modelo logístico de cuatro parámetros.

11.2. Resultados del ensayo

Valores medidos inferiores al valor de corte de 400 $\mu\text{g/g}$ de α_1 -antitripsina en heces se interpretan como negativos. Recomendamos que cada laboratorio fije su propio rango de valores estándar.

12. Limitaciones del método

El ELISA RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin detecta los epitopos de α_1 -antitripsina en muestras de heces. Este ensayo no permite derivar correlaciones entre el nivel de los valores de extinción (DO) medidos y la gravedad de los síntomas clínicos. Los resultados obtenidos en el ensayo deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro y los síntomas clínicos.

13. Características de rendimiento

13.1. Calidad del ensayo

En un estudio realizado por un laboratorio independiente se analizó la sensibilidad y especificidad del ELISA RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin ELISA en 153 muestras de heces y se comparó con la del ensayo inmunoquimioluminiscente (ILMA α_1 -antitripsina) utilizados normalmente en este centro. A tenor de los resultados del estudio, los rendimientos son los siguientes:

Sensibilidad: 96,3%

Especificidad: 83,0%

13.2. Límite de detección

El límite de detección del ELISA RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin se calculó como la suma de B_0 más dos veces la desviación estándar de B_0 . B_0 es la media de determinaciones múltiples (n=36) del control negativo (Diluent 3).

El límite de detección de α_1 -antitripsina en heces se determinó en 30,8 $\mu\text{g/g}$.

13.3. Linealidad de los resultados del ensayo

Para validar la linealidad del ELISA RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin se utilizaron diluciones seriadas de múltiples muestras de heces positivas y negativas para α_1 -antitripsina. El pesaje y la suspensión de muestras del primer paso de dilución se realizaron según lo especificado en este prospecto de instrucciones (ver 9.4.). A continuación se prepararon diluciones seriadas graduadas con el diluyente de muestras Diluent 3 RIDASCREEN®. A partir de la extinción (DO) de las distintas concentraciones se calcularon las concentraciones de partida utilizando el oportuno factor de dilución. En la tabla 2 se representa la dilución seriada de una muestra representativa positiva para α_1 -antitripsina y negativa para α_1 -antitripsina.

Tabla 2: Determinación de linealidad de los resultados del ensayo

Dilución	RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin	
	Muestra positiva [$\mu\text{g/g}$ heces]	Muestra negativa [$\mu\text{g/g}$ heces]
1:12500	526	241
1:20000	484	235
1:25000	525	255
1:30000	518	252
Media	513	246
SD	19,8	9,4
CV %	3,9	4,8

13.4. Precisión

La reproducibilidad intraensayo e interensayo del ELISA RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin se validó en múltiples determinaciones realizadas en días diferentes y en condiciones de ensayo óptimas. Los resultados se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3: Reproducibilidad intraensayo (n=20)

Intraensayo	RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin	
	Concentración 1 [10 ng/ml]	Concentración 2 [30 ng/ml]
Media (DO)	0,404	1,081
SD	0,020	0,051
CV %	4,9	4,8

Tabla 4: Reproducibilidad interensayo (n=16)

Interensayo	RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin	
	Concentración 1 [10 ng/ml]	Concentración 2 [30 ng/ml]
Media (DO)	0,409	1,080
SD	0,032	0,057
CV %	7,9	5,3

14. Referencias bibliográficas

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