

RIDASCREEN[®] α_1 -Antitrypsin

Art. N^o: G09034



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



1. Área de aplicação

Para diagnóstico *in vitro*. O teste RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin é um teste imunoenzimático para determinação quantitativa de α_1 -antitripsina em amostras de fezes.

2. Resumo e explicação do teste

Proteínas são constituintes essenciais de alimentos e do corpo. O corpo tem de estar em condições de transformar as proteínas, ou seja, de sintetizá-las ou de desfazer-se delas consoante for necessário.

Enzimas proteolíticas tais como tripsina ou quimotripsina ajudam no processo de degradação. Estas enzimas não só são capazes de digerir os alimentos como também de combater infecções bacterianas e inflamações do trato gastrointestinal. Para que o efeito destas substâncias degradadoras de proteínas possa ser parado para não destruir tecido saudável, há inibidores que impossibilitam estas enzimas. Um dos inibidores mais importantes é a α_1 -antitripsina (também conhecida como inibidor da α_1 proteinase), uma glicoproteína com um peso molecular de 50 kDA (quilodalton). Esta proteína é um inibidor primário que, em associação com proteases de serina tais como elastase de polimorfonuclear, tripsina, quimotripsina bem como células imunitárias inflamadas ativas por exemplo, forma complexos reversíveis.

Por isso, a α_1 -antitripsina tem também um efeito regulador importante em processos inflamatórios inibindo primariamente a elastase de polimorfonuclear, uma protease liberada pelos leucócitos. O corpo libera elastase de polimorfonuclear para combater as reações da inflamação. Para que o efeito da elastase polimorfonuclear fique limitado à inflamação, ou seja, para não atacar tecido saudável, a α_1 -antitripsina regula a atividade da protease e por isso pode ser tomada para avaliação da atividade de doenças inflamatórias crônicas dos intestinos. Pacientes com, por exemplo, doença de Crohn, colite ulcerosa ou outras doenças dos intestinos tais como pólipos, carcinoma do colón, diverticulite, doença celíaca ou alergias severas a alimentos apresentam valores fortemente elevados. A α_1 -antitripsina também pode ser utilizada como marcador fecal para a perda intestinal de proteínas e para a permeabilidade aumentada da mucosa em pacientes com mucosa intestinal não-intacta.

Geralmente, presume-se que a α_1 -antitripsina é sintetizada principalmente no fígado mas também nas células intestinais e excretada sem clivagem tríptica ou reabsorção com a amostra de fezes. Consequentemente, a α_1 -antitripsina não está sujeita à degradação intestinal pelo que se apropria idealmente como marcador de fezes.

3. Princípio do teste

No teste RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin são aplicados anticorpos específicos em um método sanduíche. A superfície do poço da microplaca está revestida com um anticorpo específico contra epítomos da α_1 -antitripsina humana.

Uma suspensão da amostra fecal a analisar é pipetada no poço da microplaca e incubada. Depois disso, segue-se uma lavagem e uma segunda incubação com um anticorpo policlonal anti- α_1 -antitripsina que está conjugado com peroxidase de raiz-forte. Existindo α_1 -antitripsina na amostra, forma-se um complexo tipo sanduíche constituído pelo anticorpo imobilizado, pelo antígeno α_1 -antitripsina e pelo anticorpo conjugado. Os anticorpos marcados com enzimas não-ligados são removidos em uma lavagem seguinte. Depois da adição de substrato, a enzima ligada em amostras positivas transforma a solução incolor nos poços da microplaca em uma solução azul. Mediante adição do reagente de parada esta cor muda de azul para amarelo. A extinção é proporcional à concentração de α_1 -antitripsina existente na amostra.

4. Conteúdo da embalagem

Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 96 testes

Plate	96 testes	Microplaca; 12 tiras (divisíveis) no suporte; revestidas com anticorpos policlonais (de coelho) contra α_1 -antitripsina humana
Extract 10x	100 ml	Tampão de extração e diluição (para extração e diluição primária de fezes); solução de NaCl tamponada com fosfato; contém 0,1 % NaN_3 ; 10x concentrado
Diluent 3	100 ml	Tampão de diluição de amostras (para diluição final); solução de NaCl tamponada com proteínas; contém 0,1 % NaN_3 ; pronto para uso; coloração vermelha
Wash 10x	100 ml	Tampão de lavagem; solução de NaCl tamponada com fosfato; contém 0,1 % Thimerosal; 10x concentrado
Calibrator	1 ml	1 calibrador; contém 0,1 % NaN_3 ; pronto para uso; tampa branca
Control +	1 ml	1 controle positivo; contém 0,1 % NaN_3 ; pronto para uso; tampa vermelha
Low control +	1 ml	1 controle Low-Positiv ; contém 0,1 % NaN_3 ; pronto para uso; tampa verde
Conjugate	12 ml	Anticorpo policlonal (de coelho) conjugado com peroxidase contra α_1 -antitripsina humana em solução proteica estabilizada; pronto para uso; tampa vermelha
SeroSC	12 ml	Peróxido de hidrogênio / tetrametilbenzidina (TMB); pronto para uso
Stop	12 ml	Reagente de parada; 1 N ácido sulfúrico; pronto para uso

Detalhes sobre substâncias perigosas de acordo com as obrigações de rotulagem. Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com.

5. Reagentes e seu armazenamento

Os reagentes devem ser armazenados entre 2 - 8 °C e podem ser utilizados até a expiração da data de validade impressa nas etiquetas. O tampão de lavagem e extração diluído pode ser utilizado 4 semanas quando armazenado entre 2 - 8 °C. Evitar a contaminação com micróbios! Após expiração da data de validade a qualidade não é garantida. Abrir a embalagem de alumínio com uma tesoura de modo a não cortar o fecho. As tiras de microtitulação que não são necessárias devem voltar a ser guardadas imediatamente na embalagem de alumínio entre 2 - 8 °C. Evitar a incidência de luz direta sobre o substrato incolor para prevenir a degradação ou o azulamento devido a auto-oxidação. Quando o substrato apresentar uma cor azulada, já não deve ser utilizado.

6. Reagentes adicionais necessários e equipamento acessório

6.1. Reagentes

- Água destilada ou desionizada

6.2. Equipamento acessório

- Tubos de teste
- Pipetas descartáveis (art. nº: Z 0001)
- Mixer Vortex (opcional, ver 9.4.)
- Micropipeta para volumes de 50 - 100 µl e 1 ml
- Proveta (1000 ml)
- Cronômetro
- Lavadora para microplacas ou pipetas multicanais (300 µl)
- Fotômetro para microplacas (450 nm, filtro de referência 620 nm)
- Papel filtro (panos de laboratório)
- Recipiente para lixo com uma solução de 0,5 % de hipoclorito

7. Medidas de precaução

Somente para diagnóstico *in vitro*.

Este ensaio só deve ser realizado por profissionais de laboratório treinados. As diretrizes para trabalhar em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções relativo ao procedimento de ensaio deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com a pele ferida ou membranas mucosas. Ao manusear reagentes ou amostras, use roupas de segurança adequadas (luvas apropriadas, jaleco,

óculos de segurança) e lave suas mãos após o término do procedimento de ensaio. Não fume, coma ou beba nas áreas onde estão sendo usadas amostras ou reagentes. Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com.

O calibrador, o controle positivo e o controle "Low-Positiv" contêm substâncias de sangue humano que foi testado quanto a HIV e hepatite com resultados negativos. Contudo, tanto estes componentes como as amostras fecais devem ser tratados como potencialmente infecciosos nos termos dos regulamentos de segurança nacionais.

O tampão de lavagem contém 0,1 % de Thimerosal como conservante. O contato com a pele ou com as mucosas deve ser evitado.

O calibrador, o controle positivo, o controle "Low-Positiv" e o tampão de extração e diluição de amostras contêm 0,1 % de NaN_3 . O contato com a pele ou com as mucosas deve ser evitado.

Peróxido de hidrogênio/TMB pode provocar corrosão. Manuseá-lo com cuidado!

O reagente de parada contém 1 N ácido sulfúrico. Evitar o contato com a pele e com o vestuário! No caso de contato com a pele, lavá-la com água.

Todos os reagentes e materiais que entrarem em contato com amostras potencialmente infecciosas, têm de ser tratados com desinfetantes adequados ou então autoclavados a 121 °C durante pelo menos uma hora. CUIDADO: para evitar a formação de gases tóxicos, o dejetos líquido que incluir reagente de parada tem de ser neutralizado antes de ser colocado em uma solução de hipoclorito.

Todos os reagentes e materiais utilizados devem ser descartados corretamente após o uso. Consulte os regulamentos nacionais relevantes para a eliminação.

8. Coleta e armazenamento das amostras

O material a analisar deve ser armazenado entre 2 - 8 °C até ser processado. Se o material não puder ser testado dentro de 3 dias, recomendamos um armazenamento a - 20 °C ou mais. O congelamento e descongelamento repetidos da amostra devem ser evitados. Amostras fecais ou secreções/amostras retais recolhidas não devem ser guardadas em recipientes de transporte que contenham fluidos de transporte com conservantes, soros animais, íons de metal nem agentes ou detergentes oxidantes uma vez que estas substâncias podem interferir no teste RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin.

9. Realização do teste

9.1. Generalidades

Antes de serem utilizados, todos os reagentes e a microplaca **Plate** têm de estar a temperatura ambiente (20 - 25 °C). As tiras de microtitulação não devem ser retiradas da embalagem de alumínio antes de atingirem a temperatura ambiente. Os reagentes devem ser bem misturados pouco antes de serem utilizados. As tiras de microtitulação que não são necessárias devem ser guardadas novamente (na embalagem fechada) com os reagentes entre 2 - 8 °C. As tiras de microtitulação usadas uma vez não devem voltar a ser utilizadas. Os reagentes e as tiras de microtitulação não devem ser utilizados quando a embalagem estiver danificada ou os frascos apresentarem derrames. Evitar o contato direto das amostras com os componentes do kit para excluir a contaminação cruzada.

Evitar a incidência de luz solar direta durante a realização do teste. Recomendamos cobrir a microplaca ou vedá-la com fita adesiva para evitar perdas por evaporação.

Nota: O calibrador e o controle positivo têm de ser adicionados em cada ciclo do teste. A aplicação do controle Low-Positiv é opcional.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

1 parte do tampão de lavagem **Wash 10x** é misturada com 9 partes de água destilada. Os cristais eventualmente existentes no concentrado devem ser dissolvidos previamente mediante aquecimento (em banho-maria a 37°C).

9.3. Preparação do tampão de extração

1 parte do tampão de extração **Extract 10x** é misturada com 9 partes de água destilada (1:10). Os cristais eventualmente existentes no concentrado devem ser dissolvidos previamente mediante aquecimento (em banho-maria a 37°C).

9.4. Preparação das amostras

9.4.1. Pesagem e suspensão da amostra

Pesar 100 mg de amostra fecal em um tubo de teste devidamente marcado e em seguida adicionar-lhe com a pipeta 5 ml de tampão de extração diluído (1:50).

Opcionalmente pode-se pesar entre 80 - 130 mg e adicionar um volume proporcionalmente menor ou maior (ver tab.1) de tampão de extração diluído (para assegurar a diluição a uma proporção constante).

Tab.1: Volume do tampão de extração diluído que é necessário em função do peso da amostra fecal

Peso de amostra [mg]	Volume [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

Independentemente do método de pesagem, a homogeneização da suspensão das fezes é efetuada mediante mistura minuciosa em um misturador Vortex. Quando de fezes líquidas, são aspirados exatamente 100 µl das mesmas com uma pipeta e pipetados em exatamente 5 ml de tampão de extração diluído.

De seguida, este homogeneizado tem de ser centrifugado durante 10 minutos a pelo menos 3000 g para sedimentação das partículas fecais maiores.

9.4.2. Diluição manual da amostra

50 µl do sobrenadante clarificado são diluídos com 950 µl de tampão de extração diluído e misturados no Vortex (1:20). Depois disto, procede-se à diluição final da amostra diluindo-se novamente 50 µl da primeira diluição com 950 µl de RIDASCREEN® tampão de diluição de amostras **Diluent | 3** (1:20) e misturando-se de novo no Vortex. Esta diluição final da amostra fecal é utilizada em seguida para o teste (ver 9.5.).

9.4.3. Diluição automática da amostra

Se o teste for realizado com o sistema DSX-ELISA completamente automático da marca Dynex, a amostra pode ser diluída nos passos seguintes. Também neste caso é necessário aplicar sobrenadante livre de partículas. Se utilizar outros sistemas automáticos de pipetagem ELISA, contate a R-Biopharm para obter instruções.

O sistema automático ELISA pipeta 25 µl do sobrenadante em uma placa Deppwell. Este é diluído com 975 µl de tampão de extração diluído (1:40). Seguem-se dois ciclos de mistura.

Depois coloca-se no suporte da microplaca **Plate** RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin a quantidade de tiras de microtitulação que são necessárias.

Em seguida transfere-se aliquotas de 10 µl de amostra diluída da placa Deepwell para a microplaca **Plate** RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin e procede-se a sua nova diluição com 90 µl de RIDASCREEN® tampão de diluição de amostras **Diluent | 3** (1:10).

9.5. Primeira incubação

Depois de se encaixar uma quantidade de tiras/poços suficientes no suporte, adiciona-se aos respectivos poços 100 µl de calibrador **Calibrator** (duplamente), 100 µl de tampão de diluição de amostras **Diluent | 3** (= controle negativo) e 100 µl de controle positivo **Control | +** bem como 100 µl da amostra fecal diluída a analisar. Sendo necessário, pode-se adicionar 100 µl de controle Low-Positiv **Low control | +**. Em seguida, a placa é incubada durante 1 hora a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.6. Primeira lavagem

A lavagem cuidadosa é importante para obtenção de resultados corretos pelo que deve ser realizada seguindo-se as instruções rigorosamente. A solução da incubação que se encontra nos poços deve ser esvaziada primeiro para um recipiente de lixo com hipoclorito para desinfecção. Depois disso, bate-se na placa sobre papel absorvente para remover o resto da umidade. Em seguida, lava-se a placa 5 vezes com 300 µl de tampão de lavagem de cada vez. Assegurar que ela é esvaziada completamente batendo-lhe depois de cada uma das lavagens sobre uma parte do papel ainda seca e por usar.

Utilizando-se uma lavadora de microplacas deve-se verificar se ela está corretamente programada para o tipo de placa em questão. Além disso, as suspensões de fezes que não estiverem completamente livres de partículas devem ser removidas dos poços manualmente antes da primeira lavagem para evitar o entupimento das agulhas de lavagem. Durante os passos de lavagem, é importante assegurar que o líquido é aspirado completamente. Depois da lavagem final, deve-se bater na placa cuidadosamente sobre papel ou toalhas de laboratório para remover restos de umidade.

9.7. Segunda incubação

Adicionar 100 µl de conjugado **Conjugate** em todos os poços. Em seguida, incubar a placa 1 hora a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.8. Segunda lavagem

Depois da segunda incubação, lava-se de novo 5 vezes com 300 µl de tampão de lavagem de cada vez. Assegurar que ela é esvaziada completamente batendo-lhe depois de cada uma das lavagens sobre uma parte do papel ainda seca e por usar.

9.9. Terceira incubação

Adicionar 100 µl de substrato **SeroSC** em todos os poços. Em seguida, incubar a placa 15 minutos ao escuro a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Depois disto, adicionar 50 µl de reagente de parada **Stop** em todos os poços para terminar a reação. Depois de misturá-lo cuidadosamente (batendo-se suavemente na beira da placa), medir a extinção a 450 nm e um comprimento de onda de referência de 620 nm.

Nota: Amostras de pacientes fortemente positivas podem causar precipitados de substrato pretos.

10. Controle de qualidade - Sinais de caducidade do reagente

Para fins de controle da qualidade, devem ser utilizados em cada realização do teste o calibrador (duplamente) bem como o controle positivo e eventualmente o controle "Low-Positiv" para assegurar a estabilidade dos reagentes e a realização correta do teste. O teste foi realizado corretamente quando os controles estiverem na gama dos valores teóricos indicados na folha de dados específica do lote que acompanha o kit. Se os valores estipulados não forem atingidos, há que verificar os pontos seguintes antes da repetição do teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento utilizado (calibração, por exemplo)
- Realização correta do teste
- Controle visual dos componentes do kit quanto a contaminação ou má vedação; uma solução de substrato com coloração azulada já não deve ser utilizada.

Se as condições após repetição do teste ainda não forem satisfatórias, contate o fabricante ou o seu distribuidor R-Biopharm local.

11. Avaliação e interpretação

11.1. Quantificação de um ponto mediante o modelo logistic-log de 4 parâmetros

O teste RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin ELISA utiliza o modelo logistic-log de 4 parâmetros (4PL) para determinar a concentração de α_1 -antitripsina nas fezes em unidades de µg/g.

Para apuramento dos resultados, é necessário o software de avaliação RIDA® SOFT Win.net. Este software RIDA® SOFT Win.net ou sua atualização pode ser obtido na R-Biopharm AG ou através do distribuidor R-Biopharm local.

Os parâmetros (A - D) da curva padrão bem como os valores teóricos para o calibrador, controle positivo e controle Low-Positiv que são necessários para o cálculo 4PL estão

indicados na folha de dados específica do lote que acompanha o kit e têm de ser comparados com os respectivos valores no software de avaliação antes de cada medição.

No controle final de qualidade, a R-Biopharm AG apura para cada lote de kits em condições de teste ideais a curva padrão (inclusive os parâmetros A - D) bem como um valor teórico e uma gama de desvio padrão para o calibrador, controle positivo e controle Low-Positiv. O calibrador destina-se à avaliação quantitativa das amostras. O controle positivo e o controle Low-Positiv destinam-se à validação interna do teste no laboratório.

Do valor médio da determinação dupla do calibrador e seu valor teórico, o software RIDA[®] SOFT Win.net calcula internamente um fator de correção F e compensa-o com as extinções das amostras fecais. A avaliação segura e fiável dos resultados do teste é possível dentro dos limites da curva padrão.

Em vez do software RIDA[®] SOFT Win.net também é possível utilizar outro software de avaliação que disponibilize o modelo logistic-log de 4 parâmetros.

11.2. Resultado do teste

Até um valor de medição < 400 µg/g nas fezes os resultados são considerados negativos.

Recomendamos a cada laboratório que estabeleça uma gama de valores padrão própria.

12. Limites do método

O teste RIDASCREEN[®] α_1 -Antitrypsin detecta epítomos de α_1 -antitripsina em amostras fecais. Dos testes não se pode concluir uma relação entre um valor de extinção apurado e a gravidade de sintomas clínicos. Os resultados apurados devem ser sempre interpretados em associação com o quadro clínico.

13. Características de desempenho

13.1. Qualidade do teste

O teste RIDASCREEN[®] α_1 -Antitrypsin ELISA foi testado quanto à sensibilidade e especificidade em um estudo realizado por um laboratório externo com 153 amostras fecais e comparado com o teste de imunoquimioluminescência (α_1 -antitripsina ILMA) ali habitualmente utilizado. Os resultados deste estudo foram os seguintes:

Sensitividade: 96,3%
Especificidade: 83,0%

13.2. Limite da detecção

O limite de detecção do teste RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin ELISA foi calculado da soma do valor B_0 e do dobro do desvio padrão de B_0 . O valor B_0 em si é o valor médio de determinações múltiplas (n=36) do controle negativo (=Diluent | 3).

Consequentemente, o limite de detecção para α_1 -antitripsina é de 30,8 $\mu\text{g/g}$ de fezes.

13.3. Linearidade dos resultados do teste

Para verificar a linearidade dos resultados do teste RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin ELISA, foram elaboradas séries de diluição de várias amostras fecais com α_1 -antitripsina positiva e negativa. A pesagem e a suspensão das amostras bem como o primeiro passo da diluição foram realizados de acordo com as instruções contidas neste manual (ver ponto 9.4.). Os passos de diluição seriais foram efetuados em seguida com RIDASCREEN® tampão de diluição de amostras Diluent | 3. As concentrações iniciais das extinções de cada diluição foram restauradas mediante cálculo com o respectivo fator de diluição. As séries de diluição representativas de uma amostra com α_1 -antitripsina positiva e de uma amostra negativa estão representadas na tabela 2.

Tab. 2: Determinação da linearidade dos resultados do teste

Diluição	RIDASCREEN® α_1 - Antitrypsin	
	Amostra positiva [$\mu\text{g/g}$ de fezes]	Amostra negativa [$\mu\text{g/g}$ de fezes]
1:12500	526	241
1:20000	484	235
1:25000	525	255
1:30000	518	252
MW	513	246
SD	19,8	9,4
VK %	3,9	4,8

13.4. Precisão

A reprodutibilidade intra-teste e inter-teste do RIDASCREEN® α_1 - Antitrypsin ELISA foi apurada em determinações múltiplas realizadas em dias diferentes e sob condições de teste ideais. Os resultados estão representados nas tabelas 3 e 4.

Tab. 3: Reprodutibilidade intra-teste (n=20)

Intra-teste	RIDASCREEN® α_1 - Antitrypsin	
	1ª concentração [10 ng/ml]	2ª concentração [30 ng/ml]
MW (OD)	0,404	1,081
SD	0,020	0,051
VK %	4,9	4,8

Tab. 4: Reprodutibilidade inter-teste (n=16)

Inter-teste	RIDASCREEN® α_1 - Antitrypsin	
	1ª concentração [10 ng/ml]	2ª concentração [30 ng/ml]
MW (OD)	0,409	1,080
SD	0,032	0,057
VK %	7,9	5,3

14. Literatura

1. Arndt et al., 1993, *Crohn; Clin. Lab.* 11: 867-876
2. Stein, J., 1996, 3. *Post-graduiertenkurs 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.