

Determinazione turbidimetrica quantitativa delle IgM nel siero o plasma

REF TB1073 R1: 2x25 mL + R2: 1x10 mL

PRINCIPIO DEL METODO

Anticorpi anti IgM umani, aggiunti a campioni contenenti IgM (Antigene), si legano sviluppando complessi insolubili, incrementando l'assorbanza che è misurabile fotometricamente a 340 nm. L'incremento è direttamente proporzionale alla quantità di IgM presente nel campione. L'uso di una curva di calibrazione a valori noti consente di determinare la concentrazione di IgM nel campione incognito.

SIGNIFICATO CLINICO

Le immunoglobuline giocano un ruolo chiave del sistema immunitario dell'organismo. Esse sono proteine prodotte da specifiche cellule immunitarie chiamate plasmacellule, in risposta a batteri, virus e altri microrganismi, così come all'esposizione ad altre sostanze che sono riconosciute dall'organismo come antigeni estranei ("non-self") e pericolosi. Esistono cinque classi di immunoglobuline e molte sottoclassi. Ogni classe rappresenta un gruppo di anticorpi e ha un ruolo leggermente differente.

Immunoglobuline M (IgM). Sono prodotte alla prima risposta dell'organismo ad un antigene estraneo, fornendo una protezione a breve termine. La concentrazione di IgM aumenta per alcune settimane e poi diminuisce quando inizia la produzione di IgG.

Immunoglobuline G (IgG). Sono circa il 70-80% delle immunoglobuline del sangue. Esse sono prodotti durante una prima infezione o all'esposizione di antigeni, aumentando di concentrazione dopo qualche settimana dal contatto, per poi diminuire e stabilizzarsi. L'organismo mantiene la memoria delle diverse IgG, che possono essere riprodotte ad ogni esposizione allo stesso antigene. Gli anticorpi IgG sono la base della protezione a lungo termine contro i microrganismi. In coloro che hanno un sistema immunitario normale, vengono prodotte sufficienti IgG per prevenire una nuova infezione. Le IgG sono le uniche immunoglobuline che possono passare attraverso la placenta, fornendo protezione al feto durante la gravidanza e al neonato durante il primo mese di vita.

Immunoglobuline A (IgA). Esse costituiscono circa il 15 % delle immunoglobuline totali nel sangue ma sono presenti anche in saliva, lacrime, secrezioni gastriche e respiratorie e latte materno. Le IgA forniscono protezione contro le infezioni delle mucose (tratto respiratorio, alte e basse vie e tratto gastrointestinale, stomaco e intestino). Passando con l'allattamento dalla madre al neonato, forniscono una protezione al tratto gastrointestinale del bambino. Significative concentrazioni di IgA vengono prodotte dal sesto mese del bambino in poi, perciò ogni IgA presente prima nel sangue del neonato deriva dal latte materno.

Immunodeficienze congenite e acquisite causano un deficit di tutte le immunoglobuline il cui dosaggio è importante per il monitoraggio della terapia immunoglobulinica e del decorso clinico del mieloma multiplo.

Le IgA incrementano nelle risposte a malattie infettive renali, di pelle, respiratorie, in corso di cirrosi, di mieloma e di disordini proliferativi di plasmacellule.

Le IgG incrementano nelle risposte a malattie infettive, in corso di epatite, di cirrosi, di mieloma, di disordini proliferativi di plasmacellule, di patologie autoimmuni. In particolare, incrementi di IgG monoclonali (paraproteine) sono stati trovati in mielomi multipli, leucemia linfoide, macroglobulinemia di Waldenstrom.

Le IgM incrementano in risposta a malattie infettive virali, in corso di malaria, di epatite cronica, di cirrosi biliare, di mieloma, di disordini proliferativi di plasmacellule. In particolare, incrementi di IgM monoclonali (paraproteine) sono trovati in mielomi multipli, leucemia linfoide, macroglobulinemia di Waldenstrom.

COMPOSIZIONE REAGENTI

R1 (Tampone):

Tampone TRIS, pH 7,5	100 mmol/L
Cloruro di Sodio	150 mmol/L

R2 (Antisiero):

Tampone TRIS, pH 7,5	100 mmol/L
Cloruro di Sodio	150 mmol/L
Anticorpi anti IgM umano (da capra)	

PREPARAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

Reagenti liquidi e pronti all'uso, stabili fino alla data di scadenza riportata, se conservati come riportato in etichetta e si evitano contaminazione, evaporazioni ed esposizione prolungata alla luce diretta. Non congelare i reagenti.

Scartare il reagente se appaiono segni di deterioramento come presenza di particelle e torbidità oppure mancato recupero dei valori di sieri di controllo certificati oppure Assorbanza (Abs) Bianco Reagente a 340 nm > 0,300 in cuvette da 1 cm contro acqua.

Dopo l'apertura dei flaconi, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente i flaconi e di riporli in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione.

Procedura Antisiero Start (Bi-Reagente):

I Reagenti R1 ed R2 sono liquidi e pronti all'uso.

Procedura Campione Start (Mono-Reagente):

Preparare una Soluzione di Lavoro con 5 parti di R1+ 1 parte di R2 (p. es. 10 mL di R1 + 2 mL di R2). Agitare delicatamente evitando la formazione di schiuma. Stabile: 6 mesi a 2-8°C, 5 giorni a 15-25°C, 30 giorni a bordo di strumenti con comparto refrigerato.

CAMPIONI

Siero, Plasma da EDTA o da Litio Eparina.

Evitare campioni emolisati o lipemici. Separare il siero dal coagulo rapidamente. Effettuare un solo scongelamento.

Stabilità: 4 giorni a 2-8°C, 1 giorno a 20-25°C, 3 mesi a -20°C.

PROCEDURA

Lunghezza d'onda:	340 nm
Temperatura:	+37°C
Bianco:	acqua distillata

ANTISIERO START (BI-REAGENTE)

Pipettare come segue:

Reagente (R1)	700 µL
Campione / Calibratore /H ₂ O	17 µL

Miscelare, dopo 30" leggere l'Assorbanza (Abs₁) e poi aggiungere:

Reagente (R2)	140 µL
---------------	--------

Miscelare, dopo altri 300" leggere di nuovo l'Assorbanza (Abs₂).

Calcolare il Δ Abs (Abs₂ – Abs₁) sia per campioni che per calibratori

CAMPIONE START (MONO-REAGENTE)

Pipettare come segue:

SOLUZIONE LAVORO	700 µL
CAMPIONE / CALIBRATORE	14 µL

Miscelare, attendere 30", leggere l'Assorbanza Abs₁ e dopo altri 300" leggere l'Assorbanza Abs₂.

Calcolare il Δ Abs (Abs₂ – Abs₁) sia per campioni che per calibratori

CALIBRAZIONE

I risultati dipendono dalla accuratezza della calibrazione, dal corretto settaggio del test sullo strumento, dal giusto rapporto volumetrico reagente/campione e dalla corretta temperatura di analisi.

Utilizzare il seguente prodotto MTD Diagnostics:

Plasma Protein Multicalibrator REF TUC1030 (3x1 mL)

Diluire il calibratore in NaCl 9g/L (soluzione fisiologica) come segue:

Diluizione	1	2	3	4	5	6
CAL (µL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	--
Fattore	0.0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0

Moltiplicare la concentrazione del Calibratore per il corrispondente fattore per ottenere la concentrazione dell'analita di ogni diluizione.

Per evitare le diluizioni manuali del calibratore, è possibile utilizzare

Plasma Protein Multicalibrator Set REF TUC1035 (5x1 mL)

un set di calibrazione composto da flaconi di calibratori pre diluiti, con esatto valore indicato in etichetta.

CALCOLO

La seduta analitica non può essere validata se il Δ Abs (Abs2 - Abs1) del Bianco Reagente è > 0,300 a 340 nm in cuvetta da 1 cm di cammino ottico. Calcolare per ogni campione in esame e per ogni calibratore il Δ Abs (Abs2 - Abs1). Costruire una curva di calibrazione (Δ Abs contro concentrazioni dei singoli calibratori) e su di essa riportare i valori del Δ Abs (Abs2 - Abs1) dei campioni in esame per ricavarne le concentrazioni. Per calcoli automatici (previsti dagli analizzatori automatici), il metodo di elaborazione dati consigliato è la Curva SPLINE ma altri metodi possono essere utilizzati (Punto-Punto, Logit-Log 4P, etc.).

Fattore di Conversione: mg/dL x 0,01 = g/L ; mg/Lx0,1 = mg/dL

CONTROLLO QUALITA'

Sieri di controllo normali e patologici a concentrazione nota, devono essere analizzati regolarmente in ogni seduta analitica.

Utilizzare i seguenti prodotti MTD Diagnostics:

Plasma Protein Control Level 1 REF: TUC1040 (3 x 1 mL)

Plasma Protein Control Level 2 REF: TUC1050 (3 x 1 mL)

Il range dei valori dei controlli deve essere valutato come una linea guida potendo esso essere determinato dall'applicazione del metodo o dalla manualità dell'utente o da altri fattori. I valori ottenuti devono essere utilizzati ai fini della valutazione della Precisione del metodo (Ripetibilità). Per la valutazione della Accuratezza del metodo (Riproducibilità) è necessario aderire ad un programma di Valutazione Esterna Qualita' (VEQ) gestito da enti certificati.

VALORI DI RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICI

Adulti	40 - 230 mg/dL
Bambini <1 mese	10 - 30 mg/dL
Bambini 1 - 3 mesi	10 - 70 mg/dL
Bambini 3 - 12 mesi	20 - 100 mg/dL
Bambini 1 - 2 anni	40 - 140 mg/dL
Bambini 2 - 5 anni	40 - 180 mg/dL
Bambini 5 - 9 anni	40 - 160 mg/dL
Bambini 9 - 13 anni	40 - 150 mg/dL

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire un range di valori attesi in base alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare il proprio intervallo di riferimento. A fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati insieme alla storia medica del paziente, all'esame clinico e ad altri risultati.

PRESTAZIONI

PRECISIONE:

Livello basso: Campioni= 20; Media = 81; D.S. = 1,42; CV = 1,73%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 138; D.S. = 1,76; CV = 1,27%

ACCURATEZZA: Una comparazione tra questo metodo (x) ed un metodo certificato del commercio (y) ha dato la seguente correlazione

$$y = 0.99 x + 3.5 \quad r = 0.99$$

SENSIBILITA': 3 mg/dL

LINEARITA': da 3 a 300 mg/dL.

INTERFERENZE E SPECIFICITA'

Non interferiscono: la Bilirubina fino a 20 mg/dL, l'Emoglobina fino a 1000 mg/dL, i Trigliceridi fino a 800 mg/dL. Altre sostanze possono interferire.

PRECAUZIONI

R1 ed R2 contengono TRIS BUFFER 100 mmol/L - pH 7.5 - CAS 1185-53-1

H315: Provoca irritazione cutanea

H319: Provoca gravi irritazioni oculari

H335: Può irritare le vie respiratorie

L'anticorpo presente nel reagente è di origine animale e non è in grado di trasmettere malattie infettive all'uomo. Tuttavia, poiché non ci sono metodi per garantire la totale assenza di tali agenti infettivi o di altri microbi, questo prodotto deve essere maneggiato come se fosse rischioso e potenzialmente in grado di trasmettere malattie infettive di qualsiasi tipo, in conformità con gli standard della Buona Pratica di Laboratorio.

Il prodotto non contiene altre sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 ovvero le loro concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT). Il prodotto non è soggetto ad etichettatura secondo le direttive CE o le corrispondenti normative nazionali. Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorchè maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 - P351 - P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 - P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 - P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.

S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali.

S63 (P304 - P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare le istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
	Numero di catalogo		Scadenza
	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

Narayanan S. *Clin.Chem* 128: 1528-1531 (1982)

Stevens, C.D. *Clinical immunology and serology: a laboratory perspective*. 3rd. Edition. FA Davis Company. (2010)

Price CP et al. *Ann Clin.Biochem* 20: 1-14 (1983)

Dati F et al. *Eur J Clin.Chem. Clin. Biochem.* 34 : 517-520 (1996)