

Determinazione turbidimetrica quantitativa del C4 nel siero o plasma

REF TB1113 R1: 2x25 mL + R2: 1x10 mL

PRINCIPIO DEL METODO

Anti C4 umano (Anticorpo) è aggiunto a campioni contenenti C4 (Antigene) e sviluppa complessi insolubili. La soluzione incrementa la propria assorbanza che è misurabile fotometricamente a 340 nm. La quantità di questo incremento di assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione di C4 presente nel campione. L'uso di una curva di calibrazione a valori noti consente di determinare la concentrazione di C4 nel campione incognito.

SIGNIFICATO CLINICO

Il complemento è un insieme di proteine che fanno parte del Sistema Immunitario che vengono attivate in seguito ad infezioni batteriche, oppure in seguito a infiammazioni o altre patologie. Lo scopo fondamentale del complemento è quello di proteggere l'organismo attraverso la rimozione degli agenti patogeni (batteri, virus, ecc) facilitando la loro eliminazione o il loro controllo da parte di altri sistemi biologici, sierici o cellulari.

Il C3 e il C4 sono usati allo scopo di stabilire se una malattia o una particolare condizione di un paziente sono causate del tutto o in parte da deficit o anomalie del sistema del complemento. La frazione C3 è una proteina del complemento che viene attivata quando l'organismo riconosce la presenza di cellule batteriche, oppure di immunocomplessi. Può venire attivata a sua volta dalla frazione C4. In seguito all'attivazione del complemento si ha risposta immunitaria da parte dell'organismo. La misura del complemento può essere richiesta per facilitare la diagnosi della causa di infezioni microbiche ricorrenti, di angioedema o di infiammazione. Può essere anche usato per aiutare nella diagnosi e per monitorare l'attività di malattie autoimmuni acute e croniche, come il Lupus Sistemico Eritematoso (SLE). Può essere dosato e monitorato in relazione a malattie correlate a immunocomplessi come: glomerulo nefriti (un disordine renale), malattia da siero, artrite reumatoide e vasculiti (infiammazione dei vasi sanguigni). Quando si formano gli immunocomplessi, il complemento contribuisce a eliminarli dal sangue, di conseguenza i suoi livelli ematici si abbassano.

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 C4 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.

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 emolizzati 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 /H₂O 12 µL

Miscelare and 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/H₂O 10µL

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 10-40 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 = 14,1; D.S. = 0,33; CV = 2,34%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 20,3; D.S. = 0,32; CV = 1,60%

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

$$y = 1,002x - 0,71 \quad \text{con } r = 0,999$$

SENSIBILITA': 1 mg/dL

LINEARITA': da 1 a 90 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 istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
REF	Numero di catalogo		Scadenza
LOT	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)
 Burtis C.A. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis. 5th Ed. Elsevier Inc. (2012)*