

Determinazione quantitativa delle catene leggere Kappa nel siero o nelle urine. Metodo Turbidimetrico

REF TB1140 R1: 2x25 mL + R2: 1x6 mL

PRINCIPIO DEL METODO

Test quantitativo turbidimetrico per la misurazione delle catene leggere Kappa totali nel siero umano (catene totali = bound + free) o delle catene libere nelle urine (catene free). Gli anticorpi anti-Catene Leggere Kappa umane formano complessi insolubili se miscelati con campioni contenenti catene leggere Kappa dando torbidità alla soluzione. La torbidità sviluppata dipende dalla concentrazione delle catene leggere Kappa nel campione del paziente e può essere misurata fotometricamente a 340 nm. L'uso di una curva di calibrazione consente di quantizzare le catene leggere Kappa presenti nel campione.

SIGNIFICATO CLINICO

Le molecole di immunoglobuline (anticorpi) sono proteine composte da due identiche catene peptidiche "pesanti" unite da due identiche catene peptidiche "leggere".

Esistono cinque diversi tipi di catene pesanti (che determinano la classe di immunoglobuline, IgG, IgA, IgM, IgE, IgD) ma solo due tipi di catene leggere, K (Kappa) e λ (Lambda).

La capacità di riconoscere e legare l'antigene è dovuta alla parte terminale (regione variabile) di entrambe le catene pesanti e leggere. Normalmente, una piccola quantità di catene leggere in eccesso rispetto a quelle pesanti viene prodotta dai linfociti del sistema immunitario: queste catene, che non si combinano per formare immunoglobuline complete, vengono rilasciate nel sangue e lasciate passare in piccole quantità dai reni nelle urine.

L'aumento della concentrazione ematica delle catene leggere K (Kappa) o λ (Lambda) può essere di due tipi: policlonale o monoclonale (Proteina di Bence Jones). Policlonalità significa che le catene leggere presenti sono quelle prodotte da tutti gli insiemi (cloni) dei linfociti che producono tutto il repertorio anticorpale. Un aumento delle catene leggere policlonali può essere dovuto al danno renale, che diminuisce la capacità del rene di metabolizzarle ed eliminarle: entrambi i tipi K (Kappa) e λ (Lambda) aumentano, quindi il loro rapporto (ratio) rimane invariato. Al contrario, un aumento della concentrazione di catene leggere monoclonali deriva da un eccesso di produzione di catene di un singolo tipo da parte di un singolo clone di linfociti, che prolifera oltre i suoi limiti normali (come nel caso del mieloma multiplo, della macroglobulinemia di Waldstrom, linfoma non Hodgkin, ecc.). La determinazione quantitativa della presenza delle catene K (Kappa) e λ (Lambda) nel siero e nelle urine, ha una grande importanza nel monitoraggio della terapia.

L'indicazione clinica di questo dosaggio è legata all'approfondimento diagnostico in presenza di una componente monoclonale rilevata mediante elettroforesi; accoppiando questo dosaggio a quello delle catene λ (Lambda), il rapporto K (Kappa) / λ (Lambda) può essere utilizzato per lo screening di gammopatie monoclonali rilevanti.

COMPOSIZIONE REAGENTI

R1 (Tampone):

Tampone TRIS, pH 7,5	100 mmol/L
Sodio Azide	0,1%

R2 (Antisiero):

Tampone TRIS, pH 7,5	100 mmol/L
Anticorpi anti catene leggere Kappa (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.

CAMPIONI

Siero:

Utilizzare siero fresco. Se il test non può essere eseguito nello stesso giorno, il siero può essere conservato a 2-8° C per 48 ore. Se è necessario conservarlo per un periodo più lungo, il campione deve essere congelato. Centrifugare i campioni contenenti precipitato prima di eseguire il test. I campioni con presenza di fibrina devono essere centrifugati prima del test. Evitare campioni emolisati o lipemici. Separare il siero dal coagulo rapidamente. Effettuare un solo scongelamento.

Urina:

La raccolta del campione di urina delle 24 ore comporta l'acidificazione dell'urina stessa. L'acidificazione viene effettuata versando nel contenitore, prima di iniziare la raccolta, circa 5 mL di HCl 5 M (disponibile presso il laboratorio dove si porterà il campione) per ogni litro di urina o 4 cucchiaini di acido muriatico del commercio.

Prelevare un'aliquota di circa 10 mL di urina 24 ore acidificata, annotare la diuresi totale e consegnare al laboratorio.

Urina 24h: inizia la raccolta al mattino, dopo aver svuotato la vescica al solito orario (ad esempio alle 7.00) e, da quel momento in poi, raccogliere tutte le urine successive emesse il giorno e la notte fino alle 7.00 del giorno successivo, inclusa l'ultima minzione.

PROCEDURA

Lunghezza D'onda:	340 nm
Temperatura:	+37°C
Misura:	contro acqua distillata

	<u>Procedura per siero</u>	<u>Procedura per Urine</u>
Reagente (R1)	350 μ L	250 μ L
Campione / Calibratore/H ₂ O	2 μ L	4 μ L

Miscelare e dopo 120" leggere l'Assorbanza (Abs1). Poi aggiungere:
Reagente (R2) 75 μ L 30 μ L

Miscelare, dopo altri 300" leggere di nuovo l'Assorbanza (Abs 2).
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.

Calibrazione per dosaggio su siero:

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 di ogni diluizione.

Per evitare diluizioni manuali del calibratore, è possibile utilizzare un set di calibrazione composto da flaconi di calibratori pre diluiti, con esatto valore indicato in etichetta.

Plasma Protein Multicalibrator Set REF TUC1035 (5x1 mL)

Calibrazione per dosaggio su urine:

Utilizzare il seguente prodotto MTD Diagnostics:

Kappa / Lambda Urine Calibrator REF TUC1037 (1x1 mL)

Diluire utilizzando la stessa tabella sopra indicata per il siero.

Calcolare le concentrazioni ottenute come per il siero.

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:

- REF TUC1040 PLASMA PROTEIN CONTROL LEVEL 1 – 3x1 mL
- REF TUC1050 PLASMA PROTEIN CONTROL LEVEL 2 – 3x1 mL
- REF TUC1038 Kappa / Lambda Urine Control – 1x1 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

Siero: 200 – 440 mg/dL (IFCC) (catene totali = bound + free)

Urine: < 1 mg/dL (10 mg/L) (catene free)

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 (n) = 20 : Media 233 – DS 5,53 – CV% 2,37

Livello Alto: Campioni (n) = 20 : Media 711 – DS 8,32 – CV% 1,17

Urine (n)= 20 : Media 43 – DS 0,9 – CV% 2,09

ACCURATEZZA (CORRELAZIONE):

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

Siero $y = 1.002 x - 0.71$ $r = 0.999$

Urine $y = 1.18 x - 0.43$ $r = 0.998$

LINEARITA': Siero 40 – 800 mg/dL. ; Urine 1-34 mg/dL

SENSIBILITA': Siero 40 mg/dL ; Urine 1 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
	Numero di catalogo		Scadenza
	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

Lievens, M. M., J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **27**, 519-523 (1989)

Boege, F. et al., Lab. Med. **13**, 369-374 (1989)

Dati, F. et al., Lab. Med. **13**, 87-90 (1989)