



TURB IgA - Imunoglobulina A IgA

Finalidade:

Reagente utilizado na determinação quantitativa de Imunoglobulina A (IgA) no soro ou plasma humanos por imunoturbidimetria. Somente para uso diagnóstico "in vitro".

Princípio:

A turbidimetria baseia-se na detecção ótica de partículas muito pequenas suspensas em líquido. Quando o anticorpo específico para a Imunoglobulina A reage com o IgA presente na amostra (antígeno) formam-se os imunocomplexos insolúveis que induzem uma turbidez, medida por espectrofotometria a 340 nm ou excepcionalmente a 600nm. Essa turbidez é diretamente proporcional à concentração da Imunoglobulina A na amostra.

Metodologia:

Imunoturbidimetria

Significado Clínico:

A IgA representa cerca de 10 a 15% das imunoglobulinas totais. É a imunoglobulina predominante nas secreções: saliva, lágrimas, secreções nasais, colostro, leite, secreções traqueobrônquicas e gastrointestinais. Sua estrutura pode variar, dando origem a duas subclasses: IgA1 e IgA2. A maior parte das IgAs é da subclasse IgA1, a mais encontrada no soro, e a IgA2, mesmo em menor quantidade, tem um papel importante, por se tratar da subclasse dominante nas secreções, nas quais tem a função de proteger a mucosa de agressões. Não atravessa a barreira placentária, mas, por sua grande concentração no colostro, tudo indica que contribua para a proteção dos recém-natos contra infecções, principalmente do tubo gastrointestinal. Existe uma outra forma de apresentação da IgA, chamada de IgA secretória (sIgA), na qual a imunoglobulina A apresenta-se associada a uma outra proteína, que é o componente secretório, sintetizado pelas células epiteliais, servindo de receptor para a ligação da IgA. Devido à sua presença nas membranas externas, os constituintes secretores da IgA formam uma primeira linha de defesa contra agressões do ambiente externo. Aparentemente, não conseguem ativar o complemento pela via clássica, fazendo-o pela via alternativa.

Reagentes:

Reagente 1- Diluente: Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: Tampão Tricine pH 8, PEG, cloreto de sódio, azida de sódio (<1g/l)

Reagente 2 - Anticorpo: Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: O Anti anticorpo IgA anti-humano (título ± 4 mg/ml) em pH 7.4 Tampão de HEPES, estabilizadores e azida de sódio (<1g/l)

Os reagentes estão prontos para uso e quando não abertos são estáveis até a data de vencimento impressa no rótulo do produto. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e Cuidados Requeridos:

Este reagente deve ser usado somente para uso diagnóstico "in vitro".

Os produtos de origem humana foram testados e estão livres de HBsAg e anticorpos para HCV e HIV, porém este material deve ser tratado cuidadosamente como potencialmente infeccioso. Não pipetar com a boca. Evitar contato com a pele e roupa. No caso de contato com os olhos, lavar com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

O reagente contém azida sódica como conservante. Este componente pode reagir com cobre e chumbo podendo tornar-se um metal explosivo. Ao descartá-lo, adicionar grande quantidade de água.

Deve-se monitorar a temperatura do ambiente de trabalho bem como o tempo de reação para obtenção de resultados corretos. Não usar se o reagente apresentar turbidez, presença de precipitado e se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco.

Material Necessário não Fornecido:

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C.
2. Espectrofotômetro ou fotômetro capaz de medir absorvância em 340 nm ou 600nm.
3. Pipetas de vidro e/ou automáticas.
4. Calibrador e controles Ebram.
5. Medidor de tempo.
6. Tubo de ensaio

Amostra:

É recomendado soro livre de hemólise ou plasma (EDTA). O IgA é estável no soro por 48 horas se for refrigerado entre 2 - 8°C. Para período mais prolongado, congelar a amostra (-20°C) por no máximo 3 meses (congelar somente uma vez). Todas as amostras e controles são considerados potencialmente infectantes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

Preparo do Paciente:

Não é necessário jejum. Todavia, poderá ser modificado segundo orientação médica

Interferências:

Triglicérides até 2500 mg/dL, bilirrubina até 20 mg/dL, hemoglobina até 1000 mg/L, citrato de sódio até 1000 mg/dL não interferem significativamente no resultado. Algumas drogas e substâncias afetam a concentração da Imunoglobulina A, sugerimos consultar Young et al.

Parâmetros do Sistema:

Temperatura: 37°C
Comprimento de Onda: 340 nm ou 600nm.
Tipo de Reação: Ponto final
Direção: Crescente
Pré-diluição da amostra: 1:5
Vol. Amostra diluída: 15µL
Vol. do Diluente : 250µL
Vol. do Anticorpo: 50µL
Tempo de Incubação: 10min

Calibração:

Utilizar o calibrador Turbcalib - Calibrador Turbidimétrico Ebram - Cód. 1042. A concentração da Imunoglobulina A no calibrador é rastreável ao material de referência CRM470 (Preparação de referência para proteínas séricas humanas, certificada em conjunto pelo Colégio Americano de Patologistas, Communal office of Reference e Federação Internacional de Química Clínica (IFCC)

Procedimento Automatizado:

Vide manual para utilização do equipamento, protocolo específico e instruções de uso do reagente.

Para analisadores onde não seja possível o preparo automático da curva de calibração, deve-se seguir orientação do preparo dos pontos de calibração descrito, em Preparo da Curva de Calibração para Analisadores Automáticos, no verso dessa instrução de uso.

Procedimento Manual:

Pré-diluir as amostras e os controles, em fisiológica, na razão 1:5 (100µl de amostra + 400µl de solução fisiológica).

PREPARO DOS PONTOS DE CALIBRAÇÃO

Identificar 6 tubos de ensaios (1 a 6).
Adicionar ao tubo 1, 400µl de solução fisiológica + 100µl de calibrador. Homogeneizar.
Adicionar aos tubos 2 a 6, 250µl de solução fisiológica.
Transferir 250µl do conteúdo do tubo 1 para o tubo 2. Homogeneizar.
Transferir 250µl do conteúdo do tubo 2 para o tubo 3. Homogeneizar.
Transferir 250µl do conteúdo do tubo 3 para o tubo 4. Homogeneizar.
Transferir 250µl do conteúdo do tubo 4 para o tubo 5. Homogeneizar.

	Tubo1	Tubo2	Tubo3	Tubo4	Tubo5	Tubo6
Fator de diluição	1.0	0.5	0.25	0.125	0.063	0

Obs: a concentração de cada ponto é obtida multiplicando-se a concentração do calibrador pelo fator de diluição

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Separar tubos de ensaio para cada ponto de calibração, branco, amostra / soro controle e realizar os procedimentos conforme tabela abaixo:

	Branco	Calibrador	Amostra/S.C.
Água destilada	15µL	-	-
Pontos de Calibração	-	15µL	-
Amostra/S.C. dil 1:5	-	-	15µL
Reagente R1	250µL	250µL	250µL
Incubar todos os tubos a 37°C por 5 minutos. Realizar leitura (A1) à 600nm zerando o aparelho com água destilada.			
Reagente R2	50µL	50µL	50µL
Incubar todos os tubos a 37°C por 5 minutos. Realizar leitura (A2) à 600nm zerando o aparelho com água destilada.			

Cálculos:

Abs.= Absorbância

1.A Abs final dos pontos de calibração = (A2 - A1) dos pontos de calibração - (A2 - A1) branco do reagente

2. Confeção da Curva de calibração

-Em um papel milimetrado plotar as absorvâncias finais, dos pontos de calibração no eixo das ordenadas. (eixo y)

-Plotar as concentrações de cada ponto de calibração, na ordem crescente, no eixo das abscissas. (eixo x)

3.A Abs final de amostra =

(A2 - A1) amostra - (A2 - A1) branco do reagente

-Interpoler as absorvâncias finais de cada amostra / soro controle, na curva de calibração para determinar a respectiva concentração.

Exemplo:

1.Abs.Final do ponto de calib.= (A2 - A1)calib - (A2 - A1)branco
Abs.Final do ponto de calib.= (0,525 - 0,050) - (0,120 - 0,080)
Abs.Final do ponto de calib.= 0,435

obs: realizar esse cálculo para todos os pontos da curva de calibração.

2.Abs.Final de amostra = (A2 - A1) amostra - (A2 - A1)branco

Abs.Final de amostra = (0,437 - 0,024) - (0,100 - 0,070)

Abs.Final de amostra = 0,383

Utilizar a curva de calibração no papel milimetrado para obter as concentrações das amostras.

Linearidade:

Quando executado de acordo com o recomendado o teste é linear até 1300mg/dL. Valores superiores, diluir a amostra com solução salina, repetir a medição e multiplicar o resultado pela fator de diluição. A linearidade pode variar consideravelmente dependendo do instrumento utilizado. O limite da linearidade depende da relação de amostra/reagente. Aumenta reduzindo o volume da amostra, enquanto que a sensibilidade do ensaio diminuirá proporcionalmente.

Controle de Qualidade:

Cada laboratório deve manter um programa interno de qualidade que defina objetivos, procedimentos, normas, limites de tolerância e ações corretivas. Deve-se manter também um sistema definido para se monitorar a variação analítica do sistema de medição seguindo as Boas Práticas de Laboratório Clínico. Aconselhamos o uso do Turbcontrol - Controle Turbidimétrico Ebram - cód.1043.

Valores Esperados:

Adultos: 40 - 350 mg/dL.
Crianças de 1 mês a 12 meses: 20 - 90 mg/dL.
Crianças de 1 ano a 12 anos: 15 - 250 mg/dL.

Estes valores são dados unicamente como título orientativo. É recomendado que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

Estudos Comparativos:

A comparação com Nefelometria nos proporcionou os seguintes resultados: y = 0.8978x - 0.8368; r = 0.9903

Precisão:

* Intra - Precisão analisada

3 amostras de soro foram consecutivamente dosadas 20 vezes no Cobas Mira.

Valores Esperados	n	Média	S.D.	C.V.
Baixo	20	37	1.12	3.04
Médio	20	192	4.92	2.56
Alto	20	560	19.71	3.97

* Inter-Precisão de exame

2 soro controle foram dosados diariamente no Cobas Mira depois da calibração.

Valores Esperados	n	Média	S.D.	C.V.
Ortho	64	139.1	3.24	2.33
Ortho	64	78.0	3.15	4.05

Exatidão:

Os controles são analisados em duplicidade no Cobas Mira.

Controle	Valores analisados	Valores das Medidas (mg/dl)
Ebram	264 (224 - 303)	264
Liquicheck 1	123 (98 - 147)	124
Liquicheck 2	383 (307 - 460)	329
Seronorm L	117 (99 - 135)	127
Seronorm N	258 (219 - 297)	270
Seronorm H	445 (379 - 511)	386

Sensibilidade Metodológica:

2,0 mg/dL

Especificidade:

Nos estudos comparativos realizados apresentamos dados determinados em um analisador. A comparação com soros controles já validados mostrou uma especificidade analítica adequada.

Observações:

1. A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥1 mega ohm ou condutividade ≤1 microsiemens e concentração de silicatos < 0,1 mg/L (água tipo II). Para o enxágue da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade ≥ 0,1 megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágue final utilizar água tipo II.

Apresentação:

Linha Turbidimetria Geral: R1= 1 x 25mL + R2= 1 x 3mL

Linha Hitachi 917: R1= 1 x 60mL + R2= 1 x 13mL

Linha SAT450 = R1= 1 x 45mL + R2= 1 x 9mL

Para mais informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM - tel. (011) 2291-2811, sac@ebram.com ou www.ebram.com.

Referência Bibliográfica:

- 1.Tietz Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders, Philadelphia, (1994).
- 2.Roitt, I., Essential Immunology, Blackwell, Oxford, (1991).
- 3.Watchel M et al. Creation and Verification of Reference Intervals, Laboratory Medicine, 1996; 26:593-7.

