



TURB IgM - Imunoglobulina M IgM

Finalidade:

Reagente utilizado na determinação quantitativa de Imunoglobulina M (IgM) 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 M reage com o IgM presente na amostra (antígeno) formam-se os imunocomplexos insolúveis que induzem uma turbidez, medida por espectrofotometria a 340nm. Essa turbidez é diretamente proporcional à concentração da Imunoglobulina M na amostra.

Metodologia:

Imunoturbidimetria

Significado Clínico:

Representa 5 a 10% das imunoglobulinas totais. Apresenta-se na forma de um pentâmero e não possui subclasses. É reconhecida como o anticorpo precoce, visto ser a primeira imunoglobulina encontrada na resposta a um estímulo antigênico. Por isso, é útil no diagnóstico diferencial das infecções virais ou parasitárias agudas. Diferentemente da IgG, não atravessa a barreira placentária e é a única que o neonato sintetiza. Níveis séricos aumentados em recém-nascidos indicam que a imunoglobulina M foi produzida pelo feto, sugerindo uma infecção pré-natal. Como a IgM é pentamérica, ou seja, possui 10 sítios de ligação com o antígeno, é mais eficiente em ligar-se aos antígenos e ao sistema complemento. Essas características, aliadas ao aparecimento precoce durante a evolução da infecção, fazem dela um potente agente de combate às infecções.

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: Anticorpo de IgM anti-humano (título ± 10 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 absorbância em 340nm.
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 IgM 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 seguindo orientação médica.

Interferências:

Triglicérides até 1000 mg/dL, bilirrubina direta até 70 mg/dL, hemoglobina até 1000 mg/L não interferem significativamente no resultado. Algumas drogas e substâncias afetam a concentração da Imunoglobulina M, sugerimos consultar Young et al.

Parâmetros do Sistema:

Temperatura: 37°C
Comprimento de Onda: 340 nm.
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 M 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 340 nm 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 340 nm 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. Confecção da Curva de calibração
-Em um papel milimetrado plotar as absorbâncias 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 abcissas. (eixo x)

3.A Abs final de amostra = (A2 - A1) amostra - (A2 - A1) branco do reagente
-Interpolar as absorbâncias 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.= (0,325 - 0,042) - (0,120 - 0,025)
Abs.Final do ponto de calib.= 0,188

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 = (0,283 - 0,053) - (0,106 - 0,030)
Abs.Final de amostra = 0,154

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 350mg/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: 10 - 230 mg/dL.
Crianças de 1 mês a 12 meses: 20 - 150 mg/dL.
Crianças de 1 ano a 12 anos: 45 - 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 = 1.2714x - 16.662; r = 0.9880

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	29	35,4	1,54	4,35
Médio	20	128,78	3,82	2,96
Alto	20	249,8	6,26	2,5

* Inter-Precisão de exame

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

Valores Esperados	n	Média	S.D.	C.V.
Ortho	68	70,3	2,17	3,08
Ortho	68	37,2	2,12	5,70

Exatidão:

Os controles são analisados em duplicidade no Cobas Mira. Controle Valores analisados Valores das Medidas (mg/dl)

Ebram	134 (113 - 154)	132
Liquicheck 1	57 (46 - 68)	56,6
Liquicheck 2	199 (159 - 239)	165,2
Seronorm L	42 (36 - 48)	47,5
Seronorm N	131 (121 - 151)	124,4
Seronorm H	219 (186 - 252)	184,5

Sensibilidade Metodológica:

15 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:

R1= 1 x 25mL + R2= 1 x 3mL
R1= 1 x 90mL + R2= 1 x 12mL
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.Watchel M et al. Creation and Verification of Reference Intervals, Laboratory Medicine, 1996; 26:593-7.

