

Quantitative determination of human immunoglobulin G (IgG) IVD

Store 2 - 8°C.

INTENDED USE

The IgG is a quantitative turbidimetric test for the measurement of IgG in human serum or plasma.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Anti-human IgG antibodies when mixed with samples containing IgG, form insoluble complexes. These complexes cause an absorbance change, dependent upon the IgG concentration of the patient sample, that can be quantified by comparison from a calibrator of known IgG concentration.

CLINICAL SIGNIFICANCE

IgG is the most important immunoglobulin produced by plasma cells, and represents about 75% of the total immunoglobulins. Its main function is to neutralize toxins in tissue spaces.

IgG deficit may be due to a congenital primary disturbance (immunodeficiency congenital and acquired) and is a special risk in children.

Polyclonal hyperimmunoglobulinemia is the normal response to infections, especially in hepatitis and cirrhosis as well as autoimmune diseases.

Increases of monoclonal IgG are found in multiple myeloma, lymphocytic leukemia, and Waldenström macroglobulinemia.

REAGENTS

Diluent (R1)	Tris buffer 20 mmol/L, PEG 8000, pH 8.3. Sodium azide 0.95 g/L.
Antibody (R2)	Goat serum, anti-human IgG, pH 7.5. Sodium azide 0.95 g/L.
Optional	Cod: 1102003 PROT CAL.

CALIBRATION

The assay is calibrated to the Reference Material CRM 470/RPPHS (Institute for Reference Materials and Measurements). It must be used the PROT CAL Calibrator to calibrate the reagent. The reagent (both monoreagent and bireagent) should be recalibrated every month, when the controls are out of specifications, and when changing the reagent lot or the instrument settings.

PREPARATION

Reagents: Ready to use.

Calibration Curve: Prepare the following PROT CAL Calibrator dilutions in NaCl 9 g/L as diluent. Multiply the concentration of the IgG calibrator by the corresponding factor stated in table below to obtain the IgG concentration of each dilution.

Calibrator dilution	1	2	3	4	5	6
Calibrator (µL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date.

Reagent deterioration: The presence of particles and turbidity.

Do not freeze; frozen Antibody or Diluent could change the functionality of the test.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Thermostatic bath at 37°C.
- Spectrophotometer or photometer thermostatable at 37°C with a 600 nm filter (580 - 620 nm).

SAMPLES

Fresh serum or plasma. EDTA or heparin should be used as anticoagulant. Stable 7 days at 2-8°C or 3 months at -20°C.

The samples with presence of fibrin should be centrifuged.

Do not use highly hemolyzed or lipemic samples.

PROCEDURE

1. Bring the reagents and the photometer (cuvette holder) to 37°C.
2. Assay conditions:

Wavelength : 600
Temperature : 37 °C
Cuvette length path : 1cm

3. Adjust the instrument to zero with distilled water.

4. Pipette into a cuvette:

Reagent R1	800 µL
Sample or Calibrator	10 µL

5. Mix and read the absorbance (A₁) after the sample addition.

6. Immediately, pipette into cuvette:

Reagent R2	200 µL
------------	--------

7. Mix and read the absorbance (A₂) of calibrators and sample exactly 2 minutes after the R2 addition.

Spinreact has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

CALCULATIONS

Calculate the absorbance difference (A₂-A₁) of each point of the calibration curve and plot the values obtained against the IgG concentration of each calibrator dilution. IgG concentration in the sample is calculated by interpolation of its (A₂-A₁) in the calibration curve.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of manual and automated assay procedures. Spinreact PROT CONTROL (Cod.:1102004). Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES⁴

Between 700 - 1600 mg/dL. Each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Measurement range: Up to 3000 mg/dL under the described assay conditions. Samples with higher concentrations, should be diluted 1/5 in NaCl 9 g/L and re-tested again. The linearity limit and measurement range depends on the sample to reagent / ratio. It will be higher by decreasing the sample volume, although the sensitivity of the test will be proportionally decreased.
2. Detection Limit: Values less than 10.3 mg/dL give non-reproducible results.
3. Prozone effect: No prozone effect was detected upon 8000 mg/dL
4. Sensitivity: Δ 0.6 mA. mg/dL at 359 mg/dL:
5. Precision: The reagent has been tested for 20 days, using three levels of serum in a EP5-based study.

EP5	CV (%)		
	340.3 mg/dl	801.96 mg/dl	1517.5 mg/dl
Total	2.1%	2.8%	4.8%
Within Run	0.9%	0.7%	1%
Between Run	1.5%	1.5%	1.8%
Between Day	1%	2.2%	4.4%

6. Accuracy: Results obtained using this reagent (y) were compared to those obtained using the Elecsys method from Roche. 79 samples ranging from 450 to 2600 mg/dL of IgG were assayed. The correlation coefficient (r) was 0.94 and the regression equation $y = 0.957x + 105.67$.

The results of the performance characteristics depend on the used analyzer.

INTERFERENCES⁵⁻⁶

Hemoglobin (10 g/L), bilirubin (20 mg/dL) and lipemia (10 g/L), do not interfere. Rheumatoid factors may interfere at 300 IU/mL. Other substances may interfere^{5,7}.

NOTES

1. Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

BIBLIOGRAPHY

1. Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
2. Skoug Jonh W et al. Clin Chem 1988; 34/2: 309 - 315
3. Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
4. Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1966; 14: 401-406.
5. Young DS. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997
6. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PACKAGING

Ref.: 1103004

Cont.	R1. Diluent: 1 x 40 mL R2. Antibody: 1 x 10 mL
-------	---

**Determinación cuantitativa de inmunoglobulina G (IgG)
IVD**

Conservar a 2 - 8°C.

USO RECOMENDADO

Ensayo turbidimétrico para la cuantificación de IgG en suero o plasma humano.

PRINCIPIO DEL METODO

Los anticuerpos anti-IgG forman compuestos insolubles cuando se combinan con la IgG de la muestra del paciente, ocasionando un cambio de absorbancia proporcional a la concentración de IgG en la muestra, y que puede ser cuantificada por comparación con un calibrador de IgG de concentración conocida.

SIGNIFICADO CLINICO

La IgG es la inmunoglobulina más importante producida por células plasmáticas, y representa un 75% del total de inmunoglobulinas. Su principal función es neutralizar toxinas en el espacio tisular.

El déficit de IgG puede ser debido a problemas congénitos primarios (inmunodeficiencia congénita y adquirida) y supone un riesgo especial en niños.

La hiperglobulinemia policlonal es la respuesta normal a infecciones, especialmente en hepatitis y cirrosis así como enfermedades autoinmunes.

Incrementos de IgG monoclonal se observan en el mieloma múltiple, leucemia linfocítica y la macroglobulinemia de Waldenström.

REACTIVOS

Diluyente (R1)	Tampón tris 20 mmol/L, PEG 8000, pH, 8,3. Azida sódica 0,95 g/L.
Anticuerpo (R2)	Suero de cabra, anti-IgG humana, pH 7,5. Azida sódica 0,95 g/L.
Opcional:	Cod: 1102003 PROT CAL.

CALIBRACION

El ensayo está estandarizado frente al Material de Referencia CRM 470/RPHS (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM). Debe utilizarse el Calibrador PROT CAL para la calibración. El reactivo (tanto monoreactivo como birectivo) se debe recalibrar cada mes, cuando los controles están fuera de especificaciones, y cuando el lote de reactivo o la configuración del instrumento cambia.

PREPARACION

Reactivos: Listos Para el uso.

Curva de Calibración: Preparar las siguientes diluciones del Calibrador PROT CAL en ClNa 9 g/L como diluyente. Para obtener las concentraciones de cada dilución de IgG, multiplicar la concentración de IgG del calibrador por el factor correspondiente indicado en la tabla:

Dilución calibrador	1	2	3	4	5	6
Calibrador (µL)	--	10	25	50	75	100
ClNa 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, y se evita la contaminación durante su uso. No utilizar reactivos que hayan sobrepasado la fecha de caducidad.

Indicadores de deterioro: Presencia de partículas y turbidez.

No congelar; la congelación del Anticuerpo o Diluyente puede afectar la funcionalidad de los mismos.

MATERIAL ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C.
- Espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatable a 37°C para lecturas a 600 nm (580-620 nm).

MUESTRAS

Suero o plasma fresco, recogido con heparina o EDTA como anticoagulantes. Estable 7 días a 2-8°C o 3 meses a -20°C.

Las muestras con restos de fibrina deben ser centrifugadas.

No utilizar muestras altamente hemolizadas o lipémicas.

PROCEDIMIENTO

1. Calentar los reactivos y el fotómetro (portacubetas) a 37°C.
2. Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 600 nm
 - Temperatura: 37°C
 - Paso de luz de la cubeta: 1 cm
3. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
4. Pipetear en una cubeta:

Reactivo R1	800 µL
-------------	--------

Muestra o Calibrador	10 µL
----------------------	-------

5. Mezclar y leer la absorbancia (A₁) después de la adición de la muestra.

6. Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:

Reactivo R2	200 µL
-------------	--------

7. Mezclar y leer la absorbancia (A₂) exactamente después de 2 minutos de añadir el reactivo R2.

Spinreact dispone de adaptaciones detalladas a la mayoría de analizadores automáticos del mercado. Solicite la información a su distribuidor.

CALCULOS

Calcular la diferencia de absorbancias (A₂ - A₁) obtenidas para los distintos calibradores, y construir la curva de calibración de los valores obtenidos frente a las concentraciones de IgG de cada dilución del Calibrador. La concentración de IgG en la muestra se calcula por interpolación de su diferencia (A₂ - A₁) en la curva de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar sueros control para controlar los ensayos tanto en procedimiento manual como en automático. Spinreact dispone del PROT CONTROL cod: 1102004.

Cada laboratorio debería establecer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

VALORES DE REFERENCIA⁴

Entre 700 - 1600 mg/dL. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

1. Rango de medida: hasta 3000 mg/dL en las condiciones descritas del ensayo. Las muestras con valores superiores deben diluirse 1/5 con ClNa 9 g/L y ensayarse de nuevo. El intervalo de medida depende de la relación muestra/reactivo. Disminuyendo el volumen de muestra, se aumenta el límite superior del intervalo de medida, aunque se reduce la sensibilidad.
2. Límite de detección: valores por debajo de 10,3 mg/dL dan lugar a resultados poco reproducibles.
3. Sensibilidad: Δ 0,6 mA / mg/dL (359 mg/dL).
4. Efecto prozona: No se observa efecto prozona hasta valores de 8000 mg/dL.
5. Precisión: El reactivo ha sido probado durante 20 días con tres niveles diferentes de suero en un estudio basado en las normas EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	340.3 mg/dl	801.96 mg/dl	1517.5 mg/dl
Total	2.1%	2.8%	4.8%
Within Run	0.9%	0.7%	1%
Between Run	1.5%	1.5%	1.8%
Between Day	1%	2.2%	4.4%

6. Exactitud: El comportamiento de este método (y) fue comparado con el método Elecsys (Roche). 79 muestras de concentraciones de IgG entre 450 y 2600 mg/dL fueron analizadas con ambos métodos. El coeficiente de regresión (r) fue de 0,94 y la ecuación de la recta de regresión $y = 0.957x + 105.67$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS⁵⁻⁶

Bilirrubina (20 mg/dL), hemoglobina (10 g/L) y los lípidos (10 g/L), no interfieren. Los factores reumatóides interfieren a concentraciones superiores a 300 UI/mL. Otras sustancias pueden interferir.^{5,6}

NOTAS

1. El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

BIBLIOGRAFIA

1. Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
2. Skoug Jonh W et al. Clin Chem 1988; 34/2: 309 - 315
3. Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
4. Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34: 517-520.
5. Young DS. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997
6. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PRESENTACION

Ref.: 1103004	Cont.	R1. Diluyente: 1 x 40 mL
		R2. Anticuerpo: 1 x 10 mL

