

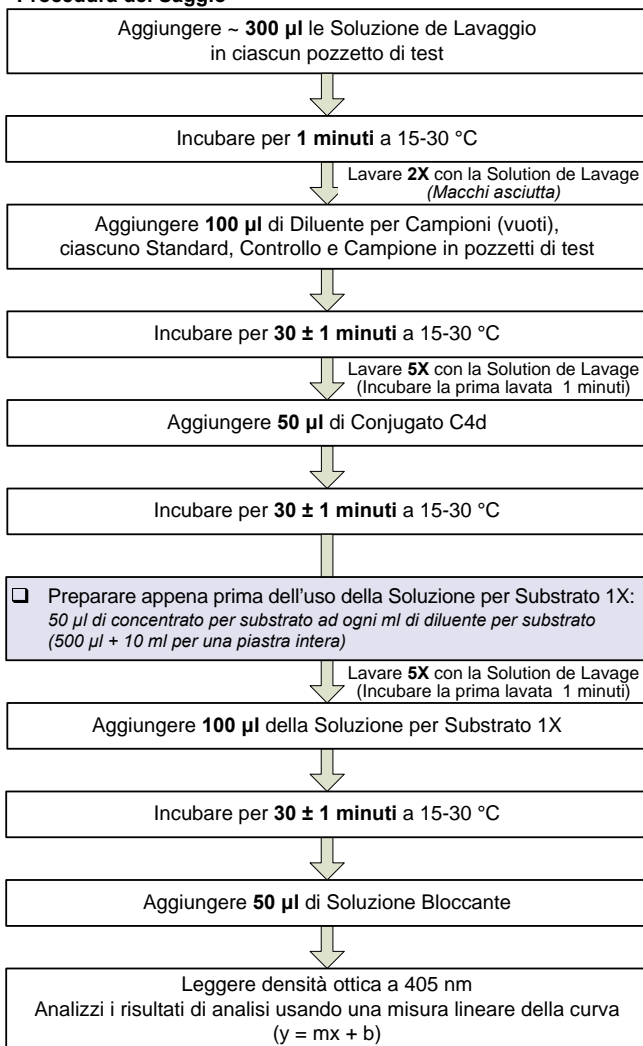
Saggio immunoenzimatico per la quantizzazione di
C4d-contenente frammenti di C4 attivato del percorso classico del complemento

MicroVue™ C4d Fragment EIA Sommario

Preparato di il Campione ed il reagente

- Diluire la Soluzione di Lavaggio Concentrato **1:20** con acqua deionizzata
- Reidrati ogni Standard e Controllo con **2,0 ml** di Reagente Idratante (*miscela delicatamente ed lasciare reidratare 15 minuti*)
- Diluire il Campioni **1:70** con il Diluente per Campioni di Complemento (*10 µl + 690 µl*) (*Aggiungere in pozzetti di test entro 30 minuti*)

Procedura del Saggio



SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il saggio immunoenzimatico MicroVue C4d Fragment misura la quantità di frammenti di attivazione contenenti C4d di C4 (C4b, iC4b e C4d) presenti nel siero umano, plasma EDTA ed altri campioni biologici o sperimentali.

Il quarto componente del complemento è una delle proteine del plasma specifica del percorso classico di attivazione del complemento.¹ L'attivazione del percorso classico avviene dopo il legame del subcomponente C1q di C1 agli immunocomplessi contenenti IgG o IgM. Inoltre, C1 viene legato ed attivato tramite diverse altre sostanze comprendenti retrovirus, alcuni batteri, parassiti, cellule trasformate, membrane subcellulari, polianioni (DNA) e proteina C reattiva nei complessi con fosforilcolina.² Dal legame di C1 a questi attivatori del percorso classico deriva la conversione del sub-componente C1s zimogeno in un enzima proteolitico attivo (C1s). C1s scinde la catena C4 α al legame peptidico 77, cosa che produce frammenti C4a e C4b con pesi molecolari rispettivamente pari a 9.000 e 191.000. Il frammento C4a è una delle anafilossine del complemento.³ Il frammento C4b presenta numerose attività biologiche importanti.⁴ Tali attività comprendono la mediazione di fagocitosi avanzata di target di attivazione del complemento tramite globuli bianchi (opsonizzazione) e la partecipazione al raggruppamento convertase C3 e C5 del percorso classico, che porta all'attivazione del componente terminale e alla conseguente lisi mediata dal complemento di micro-organismi target e di altre cellule.

L'espressione delle attività biologiche di C4b è strettamente regolata. Pertanto, la partecipazione di C4b all'attivazione del percorso classico e alle reazioni di opsonizzazione viene inibita dal clivaggio di un solo sito della catena C4b α tramite il Fattore I.⁵ Come cofattore, questa reazione necessita della proteina di legame C4 (C4bp)⁶ o del recettore di complemento CR1.^{7,8} C4bp è una proteina di controllo del complemento⁹ e CR1 è il recettore C3b/C4b presente su eritrociti, granulociti, monociti e macrofagi.⁸ Il clivaggio di Fattore I di C4b produce C4b inattivo, definito iC4b.⁷⁻¹⁰ iC4b può venire ulteriormente degradato dal Fattore I, con la collaborazione di C4bp o CR1, a frammenti C4c e C4d.⁶⁻¹⁰ I frammenti C4c e C4d, che possono essere prodotti nella fase liquida e sulle superfici target, risultano essere i prodotti di degradazione fisiologica finale di C4b.^{1,6-10}

C4d è stato quantizzato in campioni di siero e plasma umano. I livelli di C4d, quando sono normalizzati per la presenza di C4 endogeno, possono essere significativamente elevati nei campioni di plasma ottenuti da alcuni pazienti affetti da artrite reumatoide, angioedema ereditario, lupus eritematoso sistemico o orticaria cronica con ipocomplementemia.^{11,12} I livelli di C4d possono essere elevati anche nei campioni di liquidi corporei¹³ e plasma ottenuti da altri pazienti in cui sia nota l'attivazione del percorso classico di complemento, ad esempio pazienti affetti da diverse malattie autoimmuni umorali,¹⁴ setticemia, lesioni termiche, traumi a più organi, infarti miocardici, angioedema ereditario, glomerulonefrite e sindrome di embolia polmonare.

acuta. Rimane ancora da determinare la correlazione tra i livelli di frammenti di attivazione C4d e lo stato clinico o la prognosi di pazienti affetti da queste o altre patologie.

Il saggio immunoenzimatico MicroVue C4d Fragment offre una procedura rapida, non radioattiva, altamente specifica e quantitativa per la misurazione dell'attivazione C4.

Questo test è quindi progettato per indagini che studiano il ruolo o lo stato dell'attivazione del percorso classico di complemento in numerose strutture di ricerca e cliniche, nonché per il monitoraggio della generazione di frammenti contenenti C4d *in vitro* o *in vivo*.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA DEL SAGGIO

Il saggio immunoenzimatico MicroVue C4d Fragment per la quantizzazione di C4d in campioni umani di siero, plasma o sperimentalmente rappresenta una procedura a tre fasi che utilizza (1) una piastra per microsaggio rivestita con anticorpo monoclonale di topo che si lega specificamente ai frammenti di attivazione contenenti C4d di C4 umano, (2) un C4d anti umano di capra coniugato con perossidasi estratto da radice di rafano (HRP) e (3) un substrato cromogeno.

Nella prima fase, gli standard, i campioni di controllo e i campioni di test vengono aggiunti in pozzetti per microsaggio pre-rivestiti con anticorpo monoclonale specifico anti-C4d. Il C4d presente negli standard, nei controlli o nei campioni si lega all'anti-C4d immobilizzato. Dopo l'incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove il materiale non legato.

Nella seconda fase, l'anticorpo anti-C4d capra coniugato con perossidasi estratto da radice di rafano (HRP) viene aggiunto in ogni pozzetto di test. L'anti-C4d coniugato con enzimi si lega al C4d che era stato catturato dall'anti-C4d monoclonale legato sulla superficie dei pozzetti per microsaggio. Dopo l'incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove il coniugato in eccesso non legato.

Nella terza fase, a ciascun pozzetto del microsaggio viene aggiunto un substrato dell'enzima cromogeno. Il coniugato con perossidasi estratto da radice di rafano (HRP) reagisce con il substrato, formando un colore verde. Dopo l'incubazione, la reazione dell'enzima si arresta chimicamente e l'intensità del colore viene misurata dallo spettrofotometro a 405 nm. L'intensità del colore della miscela della reazione è proporzionale alla concentrazione di C4d presente nei campioni del test, standard e campioni di controllo.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

96 saggi per C4d Fragment

MicroVue C4d Fragment EIA Kit contiene i seguenti materiali:

A

B Standard C4d: Codici A4638–A4642 5 x 2 ml

C (Liofilizzato) Contiene siero umano con quantità note di frammenti

D contenenti C4d in PBS, stabilizzatori per proteine

E

H Campioni di controllo superiori Codice A9572 2 x 2 ml

(Liofilizzato) Contiene siero umano con frammenti contenenti C4d diluiti in PBS, stabilizzatori per proteine

L Campioni di controllo inferiori Codice A9573 2 x 2 ml
(Liofilizzato) Contiene siero umano con frammenti contenenti C4d diluiti in PBS, stabilizzatori per proteine

1 Strisce rivestite Codice A9567 12 ciascuno
12 strisce da otto pozzetti ciascuna, rivestite con anticorpo monoclonale di topo specifico per C4d umano in una busta protettiva risigillabile

2 Soluzione bloccante Codice A3673 6 ml
Contiene 250 mM di acido ossalico

3 Soluzione di lavaggio concentrata 20X Codice A9957 2 x 50 ml
Contiene soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), 1,0 % di Tween-20® e 0,035 % di ProClin® 300

4 Diluente per campioni Codice A3670 50 ml
Contiene PBS, 0,05 % di stabilizzatori per proteine Tween-20, 0,035 % di ProClin 300

5 Diluente per substrato Codice A3672 25 ml
Contiene 0,1 M di tampone citrato e 0,05 % di H₂O₂

6 Concentrato per substrato Codice A3671 1,5 ml
Contiene 0,7 % di 2-2'-Azino-di-(3-etilbenzotiazoline acido sulfonico), sale di diammonio

7 Coniugato C4d Codice A9945 2 x 3 ml
Contiene C4d anti-umano (capra) coniugato con perossidasi in tampone stabilizzante di perossidasi estratto da radice di rafano con conservante

8 Reagente di idratazione Codice A3675 25 ml
Contiene 0,035 % di ProClin 300

Tween-20® è un marchio di fabbrica di ICI Americas Inc.
ProClin® è un marchio registrato di Rohm and Haas Company.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Timer (60 minuti)
- Calcolatrice o altro metodo di calcolo per la convalida del saggio
- Piastre per microsaggio pulite e non utilizzate e/o provette e cestelli
- Contenitore per la diluizione del tampone di lavaggio
- Flacone di lavaggio o altro sistema di lavaggio per saggio immunologico
- Pipetta multicanale regolabile (8 o 12 canali) o micropipette a ripetizione (opzionale)
- Pipette pulite, 1 ml, 5 ml e 10 ml
- Micropipette e punte per pipette
- Lettore per piastra in grado di effettuare letture ad una densità ottica fra 0,0 e 2,0
- Acqua deionizzata o distillata

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Per l'impiego a solo scopo di ricerca negli Stati Uniti. Non previsto per l'uso in procedure diagnostiche (solo Stati Uniti).
2. Trattare i campioni come materiale a potenziale rischio biologico. Seguire le precauzioni generali durante la manipolazione del contenuto di questo kit e di qualunque campione paziente.
3. Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con le normative federali, statali e locali.
4. Usare i reagenti forniti come un'unità integrale prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.

5. Indossare adeguati indumenti di protezione, guanti e protezioni per occhi/viso durante la manipolazione del contenuto di questo kit.
6. Conservare i reagenti del saggio come indicato.
7. Non usare le strisce rivestite se la busta protettiva è danneggiata.
8. Sottoporre a test ciascun campione in duplicato.
9. Come conservante viene utilizzato ProClin 300. Il contatto o l'ingestione accidentale di tamponi o reagenti contenenti ProClin può causare irritazioni alla cute, agli occhi o alla bocca. Adottare una buona pratica di laboratorio per ridurre l'esposizione. In presenza di sintomi, consultare un medico.
10. Ciascuna unità donatore utilizzata nella preparazione degli standard e dei sieri di controllo di questo prodotto è stata esaminata tramite un metodo approvato dall'FDA per verificare la presenza di anticorpi contro il virus dell'immunodeficienza umana (HIV1 e HIV2), contro il virus dell'epatite C e contro l'antigene di superficie dell'epatite B. Poiché nessun metodo di test è in grado di assicurare definitivamente l'assenza di agenti infettivi, questi reagenti devono essere manipolati conformemente al livello di biosicurezza 2, come consigliato per qualsiasi campione di siero o di sangue umano potenzialmente infetto nel manuale "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2007 del Centers for Disease Control/National Institutes of Health.
11. Si consiglia l'uso di pipette multicanale o di pipettatori a ripetizione per garantire la fornitura veloce dei reagenti.
12. Per una misurazione accurata dei campioni, aggiungere accuratamente i campioni e gli standard. Pipettare attentamente, usando esclusivamente apparecchiature calibrate.
13. L'adeguata raccolta e conservazione dei campioni per il test sono essenziali per ottenere risultati accurati (fare riferimento alla sezione *PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI*).
14. Evitare la contaminazione microbica o crociata di campioni o reagenti.
15. Non utilizzare un pozzetto per microsaggio per più di un test.
16. Disinfettare tutti i campioni, i reagenti ed i materiali immergendoli per almeno 30 minuti in una soluzione di 1:10 di candeggina per uso domestico (ipoclorito di sodio) o in autoclave a 121 °C per 30 minuti a 15 psi.
17. L'impostazione di tempi e temperature di incubazione diversi da quelli indicati nella sezione Procedura del saggio può fornire risultati errati.
18. Il concentrato per substrato deve essere protetto dall'esposizione alla luce diretta.
19. Dopo l'inizio del saggio, evitare che i pozzetti per microsaggio si asciughino.
20. Quando si rimuove il liquido dai pozzetti per microsaggio, non raschiare né toccare il fondo dei pozzetti.
21. I campioni inattivati a caldo possono produrre risultati errati.
22. I campioni iperlipemici o contaminati possono fornire risultati errati.
23. Per evitare la formazione di aerosol durante il lavaggio, utilizzare un'apparecchiatura per aspirare il liquido di lavaggio in un flacone contenente candeggina per uso domestico.
24. Lavare la piastra utilizzando un flacone di lavaggio o un dispositivo di riempimento automatico (*PROCEDURA DEL SAGGIO*, fase 6). Per ottenere risultati ottimali, la piastra per microsaggio non deve essere lavata con una pipetta multicanale.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE

Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i materiali a 15–30 °C.

Dopo avere prelevato i reagenti ed i materiali necessari, riportare gli elementi inutilizzati alle rispettive temperature di conservazione (fare riferimento alla sezione *CONSERVAZIONE*).

Per le quantità di reagenti e materiali necessari per ciascun numero di pozzetti, fare riferimento alla Tabella 1.

Soluzione di lavaggio

Miscelare la soluzione di lavaggio concentrata 20X capovolgendo il flacone diverse volte. Se la soluzione di lavaggio concentrata 20X è stata conservata a 2–8 °C, possono essersi formati dei cristalli. Per dissolvere i cristalli, scaldare il flacone a bagnomaria ad una temperatura di 37–50 °C fino allo scioglimento di tutti i cristalli, quindi miscelare completamente. Preparare la soluzione di lavaggio diluendo l'intero contenuto di un flacone di soluzione di lavaggio concentrata 20X fino a raggiungere un totale di un litro, con acqua distillata o deionizzata. Miscelare completamente. La soluzione di lavaggio è stabile per 30 giorni se conservata in un contenitore pulito a 2–8 °C. In caso di alterazione del colore o di intorbidimento, gettare il reagente.

Selezione delle strisce per microsaggio

Determinare il numero di pozzetti necessari per il saggio. Si consiglia di effettuare un doppio test per i pozzetti vuoti, i controlli e gli standard. Togliere il fissatore di strisce dalla piastra montata. Togliere le strisce non necessarie e riportarle nel contenitore di conservazione, risigillare il contenitore e riportarlo ad una temperatura di 2–8 °C. Fissare le strisce da usare nel saggio.

Ricostituzione di standard C4d e controlli

Aggiungere 2,0 ml di reagente idratante a ciascuno standard (A–E) e al controllo inferiore e superiore. Lasciare reidratare le fiale ricostituite per almeno 15 minuti a 15–30 °C e miscelare accuratamente. Evitare la formazione di schiuma o bolle durante la miscelazione. Gli standard e i campioni di controllo ricostituiti sono stabili per 30 giorni se conservati 2–8 °C.

Diluizione dei campioni

Attenzione: manipolare tutti i campioni seguendo le precauzioni generali. Non utilizzare campioni inattivati a caldo, contaminati o non correttamente conservati.

Preparare una diluizione adeguata per ciascun campione usando il diluente per campioni di complemento (fare riferimento alla sezione Calcolo dei risultati). Per i campioni normali è consigliata una diluizione di 1:70. Miscelare completamente evitando la formazione di schiuma o bolle. Non conservare né riutilizzare i campioni diluiti.

Aggiunta di campioni diluiti ai pozzetti di

microtitolazione: Per aggiungere dei campioni diluiti, degli standard, dei campioni di controllo e dei tamponi ai pozzetti è possibile utilizzare uno dei due metodi (fare riferimento alla fase 4 della sezione *PROCEDURA DEL SAGGIO*). In caso di piccole corse, in cui vengono esaminati solo pochi campioni, è possibile aggiungere i campioni diluiti e gli altri reagenti direttamente ai pozzetti assegnati tramite l'uso di una micropipetta (100 µl/pozzetto). In caso di corse piccole o grandi, ma soprattutto per corse di maggiori dimensioni, è opportuno utilizzare un pipettatore multicanale per l'aggiunta dei campioni come indicato di seguito. **(Il pipettatore multicanale può essere utilizzato anche per aggiungere comodamente il coniugato, il substrato e la soluzione bloccante.)**

Al fine di caricare gli standard, i campioni di controllo e i campioni diluiti nei pozzetti per microscaggio nel modo più rapido consentito, è possibile adottare una procedura chiamata "replicazione delle piastre". Invece di aggiungere 100 µl di ogni standard, campione di controllo o diluito nei singoli pozzetti rivestiti con anticorpo, è possibile aggiungere 120–130 µl di ogni soluzione ai singoli pozzetti in una piastra vuota (non fornita) in base al tipo saggio immunoenzimatico finale desiderato. Dopo avere aggiunto tutte le soluzioni da esaminare nei pozzetti per microscaggio nella piastra vuota, trasferire rapidamente 100 µl da ogni pozzetto vuoto ai pozzetti rivestiti con anticorpo usando un micropipettatore multicanale. Per eliminare la possibilità di contaminazione crociata, è necessario sostituire le punte delle pipette ogni volta che cambia la composizione dei campioni da trasferire.

Preparazione della soluzione per substrato

Preparare immediatamente prima dell'uso. Determinare il volume necessario di soluzione per substrato conformemente alla Tabella 1. (È necessario 1 ml di soluzione per substrato per striscia o 125 µl/pozzetto). Preparare la soluzione per substrato aggiungendo 50 µl di concentrato per substrato ad ogni ml di diluente per substrato. Miscelare completamente. Non preparare la soluzione per substrato fino alla fase 8 della procedura del saggio. Se la soluzione per substrato muta in verde scuro prima dell'uso, gettarla ed eseguire una nuova soluzione in un contenitore pulito.

TABELLA 1
REQUISITI DEI REAGENTI

Pozzetti ¹	Strisce da 8 pozzetti	Volume soluzione per substrato (ml)	Concentrato per substrato (µl)
16	2	2,0	100
24	3	3,0	150
32	4	4,0	200
40	5	5,0	250
48	6	5,0	250
56	7	6,0	300
64	8	7,0	350
72	9	8,0	400
80	10	9,0	450
88	11	9,0	450
96	12	10,0	500

¹ Determinare il numero di campioni da esaminare ed aggiungere quindici (15) pozzetti per i cinque standard ed i campioni di controllo inferiori e superiori da esaminare (in duplicato) ed un pozzetto vuoto. Se possibile, si consiglia di esaminare gli standard ed i controlli in duplicato in strisce per microscaggio separate.

CONSERVAZIONE

I kit chiusi devono essere conservati a 2–8 °C.

Prima dell'uso, equilibrare i reagenti ed i materiali a 15–30 °C.

Mettere le strisce per microscaggio inutilizzate nel contenitore di conservazione, sigillarlo e conservare a 2–8 °C.

INDICAZIONE DI INSTABILITÀ O DETERIORAMENTO DEI REAGENTI

1. Il concentrato per substrato può subire una variazione di colore che va dalla mancanza di colore a verde pallido o scuro. Tuttavia, la soluzione per substrato appena preparata deve essere incolore oppure tendere al verde pallido. Un colore verde scuro indica che il reagente ha subito un deterioramento, pertanto è necessario eliminarlo e preparare una nuova soluzione per substrato in un contenitore in vetro pulito.
2. L'intorbidamento della soluzione di lavaggio indica un deterioramento del reagente. Se ciò accade, gettare la soluzione.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Manipolare e smaltire tutti i campioni seguendo le precauzioni generali.

È essenziale eseguire correttamente le operazioni di prelievo, elaborazione e conservazione dei campioni poiché C4d può essere soggetto a proteolisi in campioni raccolti o conservati in modo inadeguato.

I valori normali dei campioni di siero sono leggermente maggiori di quelli ottenuti con campioni di plasma EDTA corrispondenti. I livelli C4d nel plasma EDTA possono quindi rappresentare in modo più esatto le concentrazioni *in vivo*.

I campioni di siero o plasma EDTA devono essere prelevati in modo asettico utilizzando tecniche standard. I campioni devono essere esaminati immediatamente oppure conservati a 4 °C o nel ghiaccio fino all'esecuzione del saggio. Tuttavia, la conservazione a breve termine nel ghiaccio non deve superare le quattro ore.

Per una conservazione a lungo termine, il siero o il plasma devono essere congelati a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a temperature inferiori entro due ore dal prelievo. Dopo il decongelamento, i campioni congelati devono essere esaminati nel più breve tempo possibile oppure devono essere conservati nel ghiaccio (non oltre quattro ore) fino all'esecuzione del saggio.

Per preparare la conservazione dei campioni di siero e plasma umano è anche possibile utilizzare una **Soluzione Stabilizzante per Campioni** (codice A9576). Per un uso adeguato del prodotto, disponibile solo da Quidel, è necessario che il campione venga miscelato 1:1 con la soluzione prima del congelamento. A richiesta sono disponibili ulteriori informazioni tecniche sulla soluzione.

Dopo il decongelamento, i campioni congelati devono essere esaminati nel più breve tempo possibile oppure devono essere conservati nel ghiaccio (non oltre quattro ore) fino all'esecuzione del saggio. Non è consigliato eseguire ripetuti congelamenti e decongelamenti.

PROCEDURA DEL SAGGIO

Prima di iniziare il saggio, leggere completamente l'inserto fornito con il prodotto.

Fare riferimento alle sezioni PREPARAZIONE DEL REAGENTE e AVVERTENZE E PRECAUZIONI.

1. Registrare le posizioni dei pozzetti per microsaggio corrispondenti ai pozzetti vuoti, tutti i campioni per test, gli standard ed i controlli nonché i numeri di lotto indicati sulle etichette delle fiale. Etichettare un angolo della piastra per microsaggio al fine di stabilirne l'orientamento.
2. Preparare le strisce per microsaggio come indicato di seguito:
 - a. Reidratare i pozzetti per microsaggio aggiungendo circa 250–300 μl di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto usando un flacone di lavaggio o un dispositivo di riempimento automatico.
 - b. Incubare a $15\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ per un minuto.
 - c. Rimuovere il liquido da ogni pozzetto.
 - d. Aggiungere circa 250–300 μl di soluzione di lavaggio a ciascun pozzetto.
 - e. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto.
 - f. Ripetere nuovamente le fasi d–e.
 - g. Capovolgere la piastra e picchiare energicamente due volte sulla carta assorbente per eliminare eventuali residui di liquido.
3. Selezionare uno o più pozzetti da utilizzare come vuoti. Aggiungere 100 μl di diluente per campioni nei pozzetti che verranno usati per confronto con il vuoto del lettore delle piastre.
4. Aggiungere 100 μl di ciascuno standard C4d (A, B, C, D, E), campione di controllo o campione diluito ricostituito ai pozzetti assegnati.
5. Incubare a $15\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 30 ± 1 minuti.

6. Lavare i pozzetti per microsaggio come indicato di seguito:
 - a. Dopo l'incubazione descritta nella fase 5 (o nella seguente fase 8) rimuovere il liquido da ciascun pozzetto.
 - b. Aggiungere circa 300 μl di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto usando un flacone di lavaggio o un dispositivo di riempimento automatico.
 - c. Incubare i pozzetti per 1 minuto a $15\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - d. Rimuovere il liquido da ogni pozzetto.
 - e. Aggiungere a ciascun pozzetto 300 μl di soluzione di lavaggio.
 - f. Rimuovere il liquido da ogni pozzetto.
 - g. **Ripetere le fasi e–f per altre tre volte.**
 - h. Dopo il quinto ciclo di lavaggio, capovolgere la piastra e picchiare energicamente due volte sulla carta assorbente per eliminare eventuali residui di liquido.
7. Utilizzando una pipetta multicanale o a ripetizione, dispensare 50 μl di coniugato C4d in ogni pozzetto di test lavato, compresi i pozzetti vuoti.
8. Incubare le strisce per microsaggio a $15\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 30 ± 1 minuti. Durante questo periodo di incubazione, preparare la soluzione per substrato (fare riferimento alla sezione *PREPARAZIONE DEL REAGENTE*).
9. Lavare i pozzetti per microsaggio dopo l'incubazione di 30 minuti (fase 8), come descritto nella fase 6 della sezione *PROCEDURA DEL SAGGIO*.
10. Immediatamente dopo il lavaggio, dispensare 100 μl della soluzione per substrato appena preparata in ciascun pozzetto, compresi quelli vuoti.
11. Incubare le strisce per microsaggio a $15\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 30 ± 1 minuti.
12. Aggiungere 50 μl di soluzione bloccante a ciascun pozzetto per arrestare la reazione enzimatica. La soluzione bloccante deve essere aggiunta nei pozzetti secondo lo stesso ordine e lo stesso tasso della soluzione per substrato. Picchiare delicatamente sulla piastra per spargere lo sviluppo del colore in modo uniforme.
13. Determinare la lettura dell'assorbanza a 405 nm (valore A_{405}) per ogni pozzetto di test entro un'ora dall'aggiunta della soluzione bloccante (fase 12), effettuando la correzione in base ai vuoti necessaria.
14. Determinare la concentrazione dei campioni e dei campioni di controllo dalla curva standard.
15. Smettere i residui di campioni diluiti e di controlli e le strisce per microsaggio usate (fare riferimento alla sezione *AVVERTENZE E PRECAUZIONI*).

CONTROLLO DI QUALITÀ

Una buona pratica di laboratorio consiglia l'uso di campioni di controllo per garantire l'esecuzione adeguata del saggio. Ciascun kit C4d contiene campioni di controllo superiori e inferiori che possono essere utilizzati a questo scopo. Questi campioni di controllo devono essere esaminati almeno una volta per ciascun kit. Inoltre, l'inserto richiede che la curva standard generata con gli standard del kit soddisfi i rigorosi requisiti di convalida. Se il saggio non è conforme a questi requisiti, ripetere il saggio o contattare l'assistenza tecnica Quidel.

Il certificato di analisi compreso in questo kit è specifico per il lotto e deve essere usato per verificare che i risultati ottenuti dal laboratorio siano simili a quelli ottenuti da Quidel. Vengono forniti valori della densità ottica che sono da usare esclusivamente come direttiva. È possibile che i risultati ottenuti dal laboratorio differiscano.

Vengono forniti i valori di gamma per il controllo di qualità. I valori di controllo sono destinati a verificare la validità della curva e i risultati del campione. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca i propri parametri per la definizione dei limiti di accettazione del saggio. Se i valori di controllo NON sono all'interno dei limiti di accettazione del laboratorio, i risultati del saggio devono essere considerati discutibili e si dovranno ripetere i campioni.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolo dei risultati

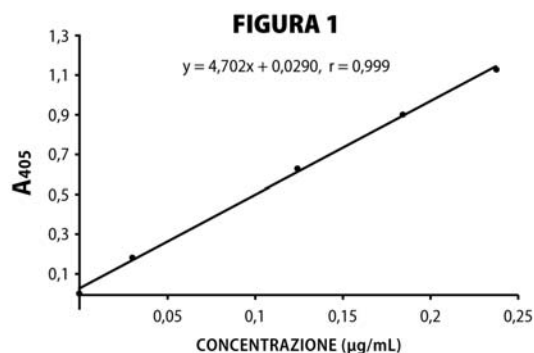
In genere, si è scoperto che una diluizione di 1:70 di plasma o siero umano normale funziona in modo ottimale con il C4d EIA Kit. I campioni interi di plasma o siero possono essere diluiti da 1:40 a 1:100 con quantizzazione completa ed accurata dell'analita C4d. I campioni normali di plasma o siero diluiti ad un rapporto maggiore di 1:100 possono produrre valori A_{405} inferiori a 0,1, cosa che può produrre risultati inesatti.

In base alla concentrazione del campione e al design sperimentale, può essere necessario diluire nuovamente i campioni (ad esempio a diluizioni maggiori) per produrre valori A_{405} entro i limiti degli standard del kit al fine di calcolare la concentrazione di analita C4d. In alternativa, il livello C4d può essere indicato come maggiore o uguale al valore massimo calcolabile per la particolare diluizione esaminata.

Utilizzo della curva standard: la curva standard per il saggio C4d EIA viene generata utilizzando i valori A_{405} da cui sono stati sottratti quelli vuoti di ogni standard (sull'asse y) e la concentrazione assegnata a ciascuno standard (lungo l'asse x). Al termine della regressione lineare, la curva standard generata deve soddisfare i requisiti di convalida (vedere di seguito). La maggior parte dei computer e delle calcolatrici è in grado di eseguire tali calcoli.

In alternativa, i dati possono essere tracciati manualmente ed i valori ($\mu\text{g/ml}$) dei campioni di test possono essere letti direttamente dalla linea best-fit della curva standard. Un esempio di curva standard tipica è mostrato in Figura 1.

Curva standard rappresentativa



Convalida

Determinare la pendenza, l'intersezione e il coefficiente di correlazione della linea best-fit derivata per gli standard del kit C4d. I valori devono essere compresi negli intervalli specificati per qualificare il saggio:

Coefficiente di correlazione (r) > 0,95
Pendenza (m): tra 3,32 e 6,50
Intersezione y (b): tra (-) 0,056 e 0,063

Fare riferimento alle etichette delle fiale per i limiti di concentrazione C4d accettabili per i controlli inferiori e superiori.

LIMITI

1. Il presente kit ha solo scopo di ricerca e non è previsto per l'uso in procedure diagnostiche.
2. Il saggio immunoenzimatico MicroVue C4d Fragment è stato usato per esaminare i campioni prelevati come siero o plasma in EDTA. Non sono stati verificati test su altri tipi di anticoagulanti.

VALORI DI ESEMPIO

Ottanta (80) campioni di plasma EDTA (diluiti 1:70 in diluente per campioni) e cinquantaquattro (54) campioni di siero (diluiti 1:70 in diluente per campioni) sono stati esaminati con il saggio immunoenzimatico MicroVue C4d Fragment. Di seguito vengono forniti i valori limite relativi ai campioni di plasma e siero.

	n	media	Limiti	
			$\pm 2 \text{ SD}$	$\pm 3 \text{ SD}$
Plasma EDTA	80	3,5	0,7 $\mu\text{g} - 6,3 \mu\text{g/ml}$	0 - 7,7 $\mu\text{g/ml}$
Siero	54	4,6	1,2 $\mu\text{g} - 8,0 \mu\text{g/ml}$	0 - 9,7 $\mu\text{g/ml}$

PRESTAZIONI DEL TEST

Limiti

LOD: il limite di rilevamento (LOD) per il saggio C4d è 0,001 $\mu\text{g/ml}$, determinato dal limite superiore 3SD in uno studio a standard zero.

LLOQ: il limite inferiore di quantizzazione (LLOQ) per il saggio C4d è 0,022 $\mu\text{g/ml}$, la concentrazione più bassa sulla curva standard che soddisfa i criteri NCCLS di esattezza e precisione.

Sostanze interferenti

Il citrato di sodio e il tetrasodio EDTA sono stati esaminati a concentrazioni rispettivamente di 1000 mg/dL e 800 mg/dL e non hanno mostrato interferenze con il saggio.

Precisione

La precisione all'interno di una corsa e tra le corse è stata determinata esaminando 20 ripetizioni di 3 campioni di plasma in 9 diverse corse.

C4d ($\mu\text{g/ml}$)	All'interno di una stessa corsa ¹ C.V. (%)	Fra le corse ² C.V. (%)
4,4	9,7	11,2
4,7	7,4	8,8
7,9	6,1	8,5

¹ n = 20 ripetizioni ² n = 9 corse

Linearità

La linearità è stata eseguita miscelando un campione ad elevato contenuto di plasma con un campione a basso contenuto di plasma, con vari rapporti per creare livelli intermedi di analiti. Il recupero medio è stato del 92,7 % con una gamma assoluta di 87,0–99,0 %.

ASSISTENZA

Per servizi al di fuori degli Stati Uniti, contattare il distributore locale. Le ulteriori informazioni circa Quidel, i nostri prodotti ed i nostri distributori possono essere trovate sul nostro Web site a www.quidel.com.

BIBLIOGRAFIA

1. Müller-Eberhard, H.J. 1975. Complement. *Annu. Rev. Biochem.* 44:697.
2. Cooper, N.R. 1985. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol.* 37:151
3. Gorski, J.P., Hugli, T.E., and Müller-Eberhard, H.J. 1979. C4a: The third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76:5299.
4. Bokisch, V.A. and Sobel, A.T. 1974. Receptor for the fourth component of complement on human B lymphocytes and cultured human lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* 140: 1336.
5. Fearon, D.T. 1977. Purification of C3b inactivator and demonstration of its two polypeptide chain structure. *J. Immunol.* 119: 1248.
6. Scharfstein, J., Ferreira, A., Gigli, I., and Nussenzweig, V. 1978. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J. Exp. Med.* 148:207.
7. Medof, M.E., and Nussenzweig, V. 1984. Control of the function of substrate-bound C4b-C3b by the complement receptor Cr1. *J. Exp. Med.* 159:1669.
8. Ross, G.D., and Medof, M.E. 1985. Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3. *Adv. Immunol.* 37:217.
9. Fujita, T., Gigli, I., and Nussenzweig, V. 1978. Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b inactivator. *J. Exp. Med.* 148: 1044.
10. Nagasawa, S., Ichihara, C., and Stroud, R.M. 1980. Cleavage of C4b by C3b inactivator: production of a nicked form of C4b, C4b', as an intermediate cleavage product of C4b by C3b inactivator. *J. Immunol.* 125:578.
11. Milgrom, H., Curd, J.G., Kaplan, R.A., Müller-Eberhard, H.J., and Vaughan, J.H. 1980. Activation of the fourth component of complement (C4): assessment by rocket immunoelectrophoresis and correlation with the metabolism of C4. *J. Immunol.* 124:2780.
12. Nitsche J. F., Tucker, E.S., Sugimoto, S., Vaughan, J.H., and Curd, J.G. 1981. Rocket immunoelectrophoresis of C4 and C4d. A simple sensitive method for detecting complement activation in plasma. *Am. J. Clin. Path.* 76:679.
13. Perrin, L.H., Shiraishi, S., Stroud, R.M., and Lambert, P.H. 1975. Detection and quantitation in plasma and synovial fluid of a fragment of human C4 with a mobility generated during the activation of the complement system. *J. Immunol.* 115:32.
14. Tucker, E.S. 1984. Complement activation in autoimmune disease. *J. Clin. Immunol.* 7:310.
15. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
16. Centers for Disease Control/National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. U.S. *Department of Health and Human Services*, 2007.

GLOSSARIO



Consulti le istruzioni per uso sul CDROM

REF A008 – **MICROVUE** Complement C4d Fragment EIA Kit



RESEARCH TO RAPIDS®

Quidel Corporation | 10165 McKellar Court
San Diego, CA 92121 USA | www.quidel.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany