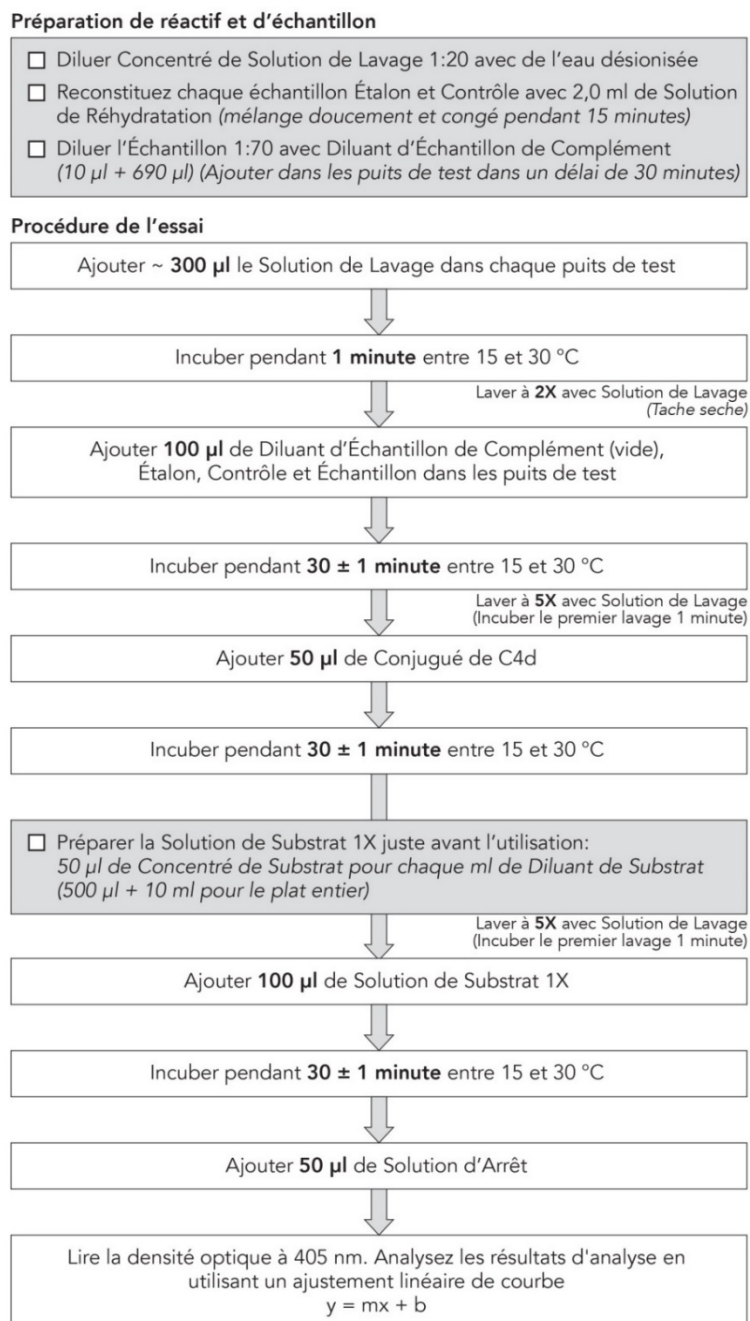


Essai immunoenzymatique portant sur la quantitation des fragments contenant du C4d dans le C4 activé de la voie classique du complément

À des fins de diagnostic in vitro uniquement. Réservé à l'export. Non destiné à la vente aux États-Unis ou au Canada.

Un glossaire des symboles est disponible sur le site quidel.com/glossary.

RÉSUMÉ



RÉSUMÉ ET EXPLICATION

L'essai immunoenzymatique MicroVue C4d Fragment permet de mesurer la quantité de fragments d'activation contenant du C4d dans le C4 (C4b, iC4b et C4d) présent dans le sérum humain, le plasma sur EDTA et d'autres échantillons biologiques ou expérimentaux.

Le quatrième composant du complément est une protéine plasmatique unique, propre à la voie classique d'activation du complément.¹ L'activation de la voie classique est déclenchée par la liaison du sous-composant C1q du C1 aux complexes immunitaires contenant des IgG ou des IgM. De plus, le C1 est fixé et activé par diverses autres substances, notamment les rétrovirus, certaines bactéries, des parasites, des cellules transformées, des membranes subcellulaires, des polyanions (ADN) et la protéine C-réactive formant un complexe avec la phosphorylcholine.² La liaison du C1 avec ces activateurs de la voie classique entraîne une conversion du sous-composant proenzymatique C1s en enzyme protéolytique active (C1s). La C1s segmente la chaîne α du C4 au niveau de la liaison peptidique 77, donnant naissance aux fragments C4a et C4b d'un poids moléculaire respectif de 9 000 et 191 000. Le fragment C4a est l'une des anaphylatoxines du complément.³ Le fragment C4b assure de nombreuses activités biologiques importantes.^{1,4} Ces activités sont notamment la médiation de la stimulation de la phagocytose par les leucocytes des cibles activant le complément (opsonisation) et la participation à l'assemblage des C3 et C5 convertases de la voie classique, aboutissant à l'activation du composant terminal et à la lyse médiée par le complément de micro-organismes et autres cellules cibles.

L'expression des activités biologiques du C4b est strictement régulée. Ainsi, la capacité du C4b à participer à l'activation de la voie classique et aux réactions d'opsonisation est inhibée par le clivage en un site unique de la chaîne α du C4b par le facteur I.⁵ Cette réaction nécessite l'intervention de la protéine de liaison C4 (C4bp)⁶ ou du récepteur du complément CR1 comme cofacteur.^{7,8} Le C4bp est une protéine de contrôle du complément⁹ et le CR1 est le récepteur des C3b/C4b présent sur les érythrocytes, les granulocytes, les monocytes et les macrophages.⁸ Le clivage du C4b par le facteur I entraîne la formation d'un C4b inactivé dénommé iC4b.⁷⁻¹⁰ L'iC4b peut être encore dégradé par le facteur I, avec l'aide du C4bp ou du CR1, en fragments C4c et C4d.⁶⁻¹⁰ Ces derniers fragments, qui peuvent être produits en phase liquide comme sur les surfaces cibles, semblent constituer les produits physiologiques finaux de la dégradation du C4b.^{1,6-10}

Le C4d a été quantifié dans des échantillons de sérum et de plasma humain. Les taux de C4d, normalisés en fonction de la présence de C4 endogène, peuvent être significativement élevés dans les échantillons de plasma prélevés chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde, d'œdème angioneurotique héréditaire, de lupus érythémateux disséminé ou d'urticaire chronique avec hypocomplémentémie.^{11,12} Les taux de C4d peuvent également être élevés dans les liquides organiques¹³ et les échantillons de plasma prélevés sur des patients qui connaissent une activation de la voie classique du complément, par exemple ceux atteints de diverses pathologies auto-immunes humorales¹⁴, de septicémie, de lésions thermiques, de traumatismes d'organes multiples, d'infarctus du myocarde, d'œdème angioneurotique héréditaire, de glomérulonéphrite et de syndrome de détresse respiratoire aiguë. La corrélation entre les taux de fragments d'activation C4d et le statut ou pronostic des patients atteints de ces pathologies ou d'autres affections reste à déterminer.

L'essai immunoenzymatique MicroVue C4d Fragment propose une procédure rapide, non radioactive, fortement spécifique et quantitative de mesure de l'activation du C4. Ce test est donc conçu pour les études de recherche portant sur le rôle ou statut de l'activation de la voie classique du complément, menées dans le cadre de nombreux environnements cliniques ou de recherche, ainsi que pour la surveillance de la production de fragments contenant le C4d *in vitro* ou *in vivo*.

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE DE L'ESSAI

L'essai immunoenzymatique MicroVue C4d Fragment, destiné à la quantification du C4d dans le sérum, le plasma humain ou les échantillons expérimentaux est une procédure à trois étapes utilisant (1) une microplaque enduite d'un anticorps monoclonal de souris qui se lie de façon spécifique aux fragments

d'activation contenant du C4d du C4 humain, (2) un anticorps de chèvre anti-C4d humain conjugué à de la HRP et (3) un substrat chromogène.

La première étape consiste à ajouter les étalons, les témoins et les échantillons à analyser dans les micropuits pré-enduits d'un anticorps monoclonal anti-C4d spécifique. Le C4d présent dans les étalons, les contrôles ou les échantillons se lie à l'anti-C4d immobilisé. Après incubation, les matériaux non liés sont éliminés au cours d'un cycle de lavage.

Lors de la deuxième étape, un anticorps de chèvre anti-C4d conjugué à de la peroxydase de raifort (HRP) est ajouté dans chaque puits de test. L'enzyme conjuguée anti-C4d se lie au C4d capturé par l'anti-C4d monoclonal fixé à la surface des micropuits. Après incubation, un cycle de lavage permet d'éliminer le surplus de conjugué non lié.

Au cours de la troisième étape, un substrat enzymatique chromogène est ajouté dans chaque micropuits. La réaction de la HRP et du conjugué liés avec le substrat se traduit par une coloration verte. Après incubation, la réaction enzymatique est interrompue chimiquement et l'intensité de la coloration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 405 nm. L'intensité de la coloration du mélange est proportionnelle à la concentration en C4d dans les échantillons, étalons et contrôles.

RÉACTIFS ET MATÉRIAUX FOURNIS

96 essais pour C4d Fragment

Le kit d'essai immunoenzymatique MicroVue C4d Fragment contient les composants suivants:

A	Étalons C4d	Articles A4638 – A4642	5 x 2 ml
	(Lyophilisé) Contient du sérum humain comportant des quantités connues de fragments contenant du		
E	C4d dans un tampon phosphate et des stabilisants protéiques		
H	Contrôles haut	Articles A9572	2 x 2 ml
	(Lyophilisé) Contient du sérum humain comportant des fragments contenant du C4d dilué dans un tampon phosphate et des stabilisants protéiques		
L	Contrôles bas	Articles A9573	2 x 2 ml
	(Lyophilisé) Contient du sérum humain comportant des fragments contenant du C4d dilué dans un tampon phosphate et des stabilisants protéiques		
1	Plaques enduites	Articles A9567	12 chacun
	12 plaques de huit puits enduits d'un anticorps monoclonal de souris spécifique du C4d humain dans une pochette d'aluminium refermable		
2	Solution d'arrêt	Articles A3673	6 ml
	Contient de l'acide oxalique 250 mM		
3	Concentré de solution de lavage 20X	Articles A9957	2 x 50 ml
	Contient une solution saline de tampon phosphate (PBS), 1,0% de Tween-20® et 0,035% de ProClin® 300		
4	Diluant d'échantillon	Articles A3670	50 ml
	Contient un tampon phosphate, 0,05% de stabilisants protéiques Tween-20, 0,035% de ProClin 300		
5	Diluant de substrat	Articles A3672	25 ml
	Contient un tampon citrate 0,1 M et 0,05% de H2O2		
6	Concentré de substrat	Articles A3671	1,5 ml
	Contient 0,7% de sel diammonium 2-2'-azino-di-(3-éthylbenzthiazoline-acide sulfonique)		
7	Conjugué de C4d	Articles A9945	2 x 3 ml
	Contient de l'anti-C4d humain (de chèvre) conjugué à de la peroxydase dans un tampon stabilisant de HRP contenant un conservateur		

Tween-20® est une marque d'ICI Americas Inc.
ProClin® est une marque déposée de Rohm and Haas Company.

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES NON FOURNIS

- Minuterie (60 minutes)
- Calculateur ou tout autre équipement informatique permettant de valider l'essai.
- Plaques de micropuits et/ou tubes à essais propres et non utilisés, supports de tests.
- Récipient pour dilution du tampon de lavage
- Flacon de lavage ou tout autre système de lavage adapté aux dosages immunologiques.
- Pipette multi-canaux réglable (8 ou 12 canaux) ou micropipettes automatiques (facultatives)
- Pipettes propres de 1 ml, 5 ml et 10 ml
- Embouts de micropipettes et de pipettes
- Lecteur de plaque permettant de mesurer la densité optique entre 0,0 et 2,0
- Eau désionisée ou distillée

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Pour la recherche uniquement aux États-Unis. Ne pas utiliser à des fins diagnostiques (aux États-Unis uniquement).
- Traiter les échantillons comme du matériel potentiellement contaminant. Suivre les précautions standards lors de la manipulation du contenu de ce kit et de tous les échantillons de patients
- Éliminer les récipients et leur contenu inutilisé conformément aux dispositions réglementaires nationales et locales.
- Utiliser les réactifs fournis d'un seul kit avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Porter un vêtement, des gants et un appareil de protection des yeux /du visage appropriés lors de la manipulation du contenu de ce trousseau.
- Stocker les réactifs de l'essai conformément aux indications.
- Ne pas utiliser les plaques enduites si la pochette est percée.
- Tester chaque échantillon en double.
- Le ProClin 300 est utilisé comme conservateur. Tout contact ou toute ingestion accidentelle de tampons ou de réactifs contenant du ProClin peut provoquer une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Le respect des bonnes pratiques de laboratoire permet de réduire l'exposition. Consulter un médecin en cas d'observation de ces symptômes.
- Chacun des prélèvements de donneurs utilisés pour préparer les sérums étalons et témoins (contrôles) de ce produit a été testé selon une méthode agréée par la FDA pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH1 et VIH2) et le virus de l'hépatite C, ainsi que de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B. Aucune méthode de test ne pouvant garantir totalement l'absence d'agents infectieux, ces réactifs doivent être manipulés selon le niveau 2 de sécurité biologique comme le recommande, pour tout prélèvement sérique ou sanguin humain potentiellement infectieux, le manuel des Centers for Disease Control/National Institutes of Health intitulé "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 2007.
- L'utilisation de pipettes multi-canaux ou de robots pipetteurs est recommandée pour assurer la distribution rapide des réactifs.
- Pour une mesure exacte des échantillons, ajouter les échantillons et les solutions étalon avec précision. Pipetter avec soin, en utilisant uniquement un équipement étalonné.
- Il est essentiel de prélever et de conserver les échantillons avec soin pour obtenir des résultats corrects (voir la section *PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS*).
- Éviter toute contamination microbienne ou croisée des échantillons ou des réactifs.
- Ne pas réutiliser un micropuits pour un deuxième test.

- Décontaminer tous les échantillons, réactifs et matériaux en les trempant pendant au moins 30 minutes dans une solution à 1/10 d'eau de javel (hypochlorite de sodium) ou en les passant à l'autoclave à 121°C pendant 30 minutes à 103 kPa (15 psi).
- Le non-respect des durées et températures d'incubation indiquées dans la procédure est susceptible de provoquer des résultats erronés.
- Le concentré de substrat doit être protégé de toute exposition à une lumière forte ou directe.
- Ne pas laisser sécher les micropuits quand l'essai est commencé.
- Ne pas gratter ni toucher le fond des puits lors de l'élimination du liquide hors des micropuits.
- Les échantillons inactivés par la chaleur peuvent entraîner des résultats inexacts.
- Les échantillons hyperlipémiques ou contaminés peuvent entraîner des résultats inexacts.
- Afin d'éviter la production d'aérosols pendant le lavage, utiliser un appareil pour aspirer le liquide de lavage et le déverser directement dans un flacon contenant de l'eau de Javel.
- Utiliser un flacon de lavage ou un dispositif de remplissage automatique pour laver la plaque (*PROCÉDURE DE L'ESSAI*, étape 6). Pour obtenir des résultats optimaux, ne pas utiliser de pipette multi-canaux pour laver la microplaque.
- Le test doit être effectué dans une zone suffisamment ventilée.
- Lavez-vous soigneusement les mains après manipulation.
- Pour en savoir plus sur les symboles de danger, la sécurité, la manipulation et l'élimination des composants de ce kit, veuillez vous référer à la Fiche de données de sécurité (FDS) que vous trouverez sur quidel.com.

CONSERVATION

Conserver le kit non ouvert entre 2°C et 8°C. Stabiliser les réactifs et produits de l'essai à température ambiante (entre 15°C à 30°C) avant utilisation. Remettre toutes les plaques non utilisées dans la pochette de conservation, la refermer hermétiquement et la stocker entre 2°C et 8°C.

SIGNES D'INSTABILITÉ ET DE DÉTÉRIORATION DES RÉACTIFS

La couleur du concentré de substrat peut aller de l'incolore au vert pâle, ou même foncé. Cependant, la solution de substrat qui vient d'être préparée doit être incolore à vert pâle. Une coloration vert foncé indique une détérioration du réactif; celui-ci doit alors être éliminé et une nouvelle solution de substrat préparée dans un récipient propre en verre.

Toute turbidité de la solution de lavage indique une détérioration du réactif. Le cas échéant, la solution doit être éliminée.

PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Manipuler et éliminer tous les échantillons en suivant les précautions standards.

Il est très important de prélever, traiter et conserver les échantillons avec soin parce que le C4d est sensible à la protéolyse dans les échantillons prélevés ou conservés de façon inappropriée.

Les valeurs normales pour les échantillons sériques sont légèrement supérieures à celles obtenues pour les échantillons correspondants de plasma sur EDTA. Les taux de C4d dans le plasma sur EDTA peuvent par conséquent plus exactement correspondre aux concentrations *in vivo*.

Les échantillons sériques ou de plasma sur EDTA doivent être prélevés dans des conditions d'asepsie à l'aide des techniques standards. Les échantillons doivent être testés immédiatement ou conservés à 4°C ou sur de la glace jusqu'au moment du test. Cette conservation à court terme sur la glace ne doit toutefois pas dépasser quatre heures.

Pour une conservation plus longue, le sérum ou le plasma doit être congelés à -70°C (ou à température inférieure) dans les deux heures suivant le prélèvement. Les échantillons congelés doivent être testés dès

que possible après avoir été décongelés ou bien conservés sur de la glace (pendant quatre heures maximum) avant d'être testés.

On peut également utiliser une **Solution Stabilisante d'Échantillon** (article n° A9576) pour préparer les échantillons sériques ou plasmatiques humains en vue d'une conservation. Pour utiliser convenablement ce produit, disponible uniquement auprès de Quidel, mélanger l'échantillon avec la solution dans la proportion 1/1 avant de le congeler. Des informations techniques supplémentaires concernant la solution stabilisante sont disponibles sur demande.

Les échantillons congelés doivent être testés dès que possible après avoir été décongelés ou bien conservés sur de la glace (pendant quatre heures maximum) avant d'être testés. Il est déconseillé de répéter les congélations et décongélations.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Amener tous les réactifs et matériaux à une température de 15°C à 30°C avant utilisation.

Après avoir sélectionné les réactifs et les matériaux nécessaires, replacer immédiatement les produits inutilisés aux températures de conservation appropriées (voir la section *CONSERVATION*).

Se reporter au Tableau 1 pour connaître les quantités de réactifs et matériaux nécessaires en fonction du nombre de puits.

Solution de lavage

Mélanger le concentré de solution de lavage 20 x en retournant plusieurs fois le flacon. Si le concentré de solution de lavage 20 x a été conservé entre 2°C et 8°C, il est possible que des cristaux se soient formés. Pour les dissoudre, réchauffer le flacon au bain-marie entre 37°C et 50°C jusqu'à dissolution complète, puis bien mélanger. Préparer la solution de lavage en diluant tout le contenu d'un flacon de concentré de solution de lavage 20 x avec de l'eau distillée ou désionisée jusqu'à obtention d'un litre de produit. Bien mélanger. La solution de lavage reste stable pendant 30 jours quand elle est conservée dans un récipient propre entre 2°C et 8°C. Si le réactif devient trouble ou se décolore, il doit être éliminé.

Sélection des microplaques

Déterminer le nombre de puits nécessaire pour l'essai. Il est recommandé de tester en double les blancs, les contrôles et les étalons. Retirer le support pour plaques de la plaque assemblée. Remettre les plaques inutilisées dans la pochette de conservation, refermer la pochette et la stocker entre 2°C et 8°C. Fixer solidement les plaques utilisées pour l'essai.

Reconstitution des étalons et contrôles C4d

Ajouter 2,0 ml de solution de réhydratation dans chaque flacon d'étalon (A-E) et dans les flacons des contrôles haut et bas. Laisser les flacons reconstitués se réhydrater pendant au moins 15 minutes entre 15°C et 30°C. Bien mélanger. Éviter la formation de mousse ou de bulles en mélangeant. Les étalons et les contrôles reconstitués restent stables pendant 30 jours lorsqu'ils sont conservés entre 2°C et 8°C.

Dilution de l'échantillon

Avertissement: Manipuler tous les échantillons en suivant les précautions standards. Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur, contaminés ou conservés dans des conditions inappropriées.

Préparer une dilution adéquate de chaque échantillon avec du diluant d'échantillon de complément (voir la section Calcul des résultats). Pour les échantillons normaux, la dilution recommandée est de 1/70. Bien mélanger, mais éviter la formation de mousse ou de bulles. Ne pas conserver ni réutiliser les échantillons dilués.

Ajout des échantillons dilués dans les micropuits

Il existe deux méthodes pour ajouter le tampon, les échantillons, les étalons et les contrôles dilués dans les puits (voir l'étape 4 de la section *PROCÉDURE DE L'ESSAI*). Pour les petites séries de dosage, quand seuls quelques échantillons sont testés, les échantillons dilués et les autres réactifs peuvent être ajoutés directement dans les puits qui leur ont été attribués à l'aide d'une micropipette (100 µL/puits). Pour les petites et grandes séries, en particulier pour ces dernières, nous recommandons d'utiliser une pipette multi-canaux pour ajouter les échantillons comme indiqué ci-après. (Une pipette multi-canaux peut également servir à ajouter facilement le conjugué, le substrat et la solution d'arrêt.)

Afin de déposer les échantillons, les étalons et les contrôles dilués dans les micropuits le plus rapidement possible, on peut utiliser la méthode de la "double plaque". Au lieu d'ajouter individuellement 100 µL de chaque échantillon, étalon et contrôle dilué dans les puits enduits d'anticorps, il est possible d'ajouter entre 120 et 130 µL de chaque solution dans les différents puits d'une plaque de blanc (non fournie) correspondant au schéma d'essai immunoenzymatique final souhaité. Quand toutes les solutions à analyser ont été déposées dans les micropuits de la plaque de blanc, on peut transférer rapidement 100 µL de chaque puits blanc dans les puits enduits d'anticorps, à l'aide d'une micropipette multi-canaux. Pour éviter toute contamination croisée, les embouts des pipettes doivent être changés chaque fois que la composition des échantillons à transférer change.

Préparation de solution de substrat

À préparer juste avant l'utilisation. Déterminer le volume de solution de substrat nécessaire d'après le Tableau 1. (Il faut 1 ml de solution de substrat par plaque ou 125 µL/puits.) Préparer la solution de substrat en ajoutant 50 µL de concentré de substrat pour chaque ml de diluant de substrat. Bien mélanger. Ne pas préparer la solution de substrat avant l'étape 8 de la procédure de l'essai. Si la solution de substrat prend une coloration vert foncé avant utilisation, l'éliminer et en préparer une nouvelle dans un récipient propre.

Tableau 1. Réactifs Nécessaires

Puits ¹	Plaques de 8 puits	Volume de solution de substrat (ml)	Concentré de substrat (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 Déterminer le nombre d'échantillons à tester, et ajouter quinze (15) puits supplémentaires pour les cinq étalons, les contrôles (témoin) haut et bas à analyser (en double), et un puits de blanc. Il est conseillé de tester les étalons et les contrôle en double sur des microplaques différentes si possible.

PROCÉDURE DE L'ESSAI

Lire la notice du produit dans son intégralité avant de commencer l'essai.

Voir les sections PRÉPARATION DES RÉACTIFS et AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS.

1. Noter les emplacements de micropuits correspondant au(x) puits des blancs, aux échantillons, étalons et contrôles ainsi que les numéros de lot indiqués sur les étiquettes des flacons. Sur l'un des coins de la microplaque, coller une étiquette qui servira de point de repère pour l'orientation.
2. Préparer les microplaques comme indiqué ci-après:
 - a. Réhydrater les micropuits en ajoutant environ 250 à 300 μL de solution de lavage dans chaque puits à l'aide d'un flacon de lavage ou d'un dispositif de remplissage automatique.
 - b. Incuber entre 15°C et 30°C pendant une minute.
 - c. Vider chaque puits.
 - d. Ajouter environ 250 à 300 μL de solution de lavage dans chaque puits.
 - e. Aspirer le contenu de chaque puits.
 - f. **Répéter les étapes "d" à "e" une fois supplémentaire.**
 - g. Retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant à deux reprises afin d'éliminer toute trace de liquide.
3. Sélectionner un ou plusieurs puits pour servir de blanc. Ajouter 100 μL de diluant d'échantillon dans le(s) puits qui sera/seront utilisé(s) comme blanc(s) pour le lecteur de plaque.
4. Ajouter 100 μL de chaque étalon reconstitué de C4d (A, B, C, D, E), de contrôle ou d'échantillon dilué dans les puits attribués.
5. Incuber entre 15°C et 35°C pendant 30 ± 1 minutes.
6. Laver les micropuits comme suit:
 - a. Après l'incubation de l'étape 5 (ou de l'étape 8 ci-après), vider chaque puits.
 - b. Ajouter environ 300 μL de solution de lavage dans chaque puits à l'aide d'un flacon de lavage ou d'un dispositif de remplissage automatique.
 - c. Incuber les puits pendant 1 minute entre 15°C et 30°C.
 - d. Vider chaque puits.
 - e. Ajouter environ 300 μL de solution de lavage dans chaque puits.
 - f. Vider chaque puits.
 - g. **Répéter les étapes "e" à "f" trois fois supplémentaires.**
 - h. Après le cinquième cycle de lavage, retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant à deux reprises afin d'éliminer toute trace de liquide.
7. Déposer 50 μL de conjugué de C4d dans chaque puits lavé, y compris dans le(s) puits de blanc, à l'aide d'une pipette multi-canaux ou automatique.
8. Incuber les microplaques entre 15°C et 30°C pendant 30 ± 1 minutes. Préparer la solution de substrat pendant cette incubation (voir la section *PRÉPARATION DES RÉACTIFS*).
9. Laver les micropuits après l'incubation de 30 minutes (étape 8), comme décrit dans la section *PROCÉDURE DE L'ESSAI*, étape 6.
10. Immédiatement après le lavage, déposer 100 μL de la solution de substrat fraîchement préparée dans chaque puits, y compris dans le(s) puits de blanc.
11. Incuber les microplaques entre 15°C et 30°C pendant 30 ± 1 minutes.
12. Ajouter 50 μL de solution d'arrêt dans chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique. La solution d'arrêt doit être ajoutée dans les puits dans le même ordre et au même rythme que l'a été la solution de substrat. Tapoter doucement la plaque pour que la couleur se développe uniformément.
13. Déterminer le degré d'absorbance à 405 nm (valeur A_{405}) pour chaque puits de test dans l'heure suivant l'ajout de la solution d'arrêt (étape 12), en effectuant la correction de blanc nécessaire.
14. Déterminer la concentration des échantillons et des contrôles à partir de la courbe étalon.
15. Éliminer les échantillons et les contrôles dilués restants, ainsi que les microplaques utilisées (voir la section *AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS*).

CONTRÔLE QUALITÉ

Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'utilisation de contrôles afin de garantir le bon fonctionnement de l'essai. Chaque kit C4d contient des contrôles haut et bas qui peuvent être utilisés à cet effet. Ces contrôles (témoins) doivent être testés au moins une fois pour chaque kit. En outre, la notice du produit exige que la courbe étalon générée à l'aide des étalons du kit corresponde à des critères de

validation rigoureux. Si l'essai ne remplit pas ces critères, le recommencer, ou contacter le service technique de Quidel.

Le certificat d'analyse compris dans ce kit est spécialement conçu pour le lot, et doit être utilisé pour vérifier que les résultats obtenus par votre laboratoire sont semblables à ceux obtenus chez Quidel. Les valeurs de densité optique sont fournies, et elles doivent être utilisées comme référence uniquement. Les résultats obtenus par votre laboratoire peuvent être différents.

Les plages de contrôle de qualité sont fournies. Les valeurs de contrôle sont destinées à vérifier la validité de la courbe et des résultats d'échantillon. Chaque laboratoire devrait établir ses propres paramètres en matière de limites d'essais acceptables. Si les valeurs de contrôle ne sont PAS dans les limites d'acceptation de votre laboratoire, les résultats de l'essai doivent être remis en question, et il faut retester les échantillons.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Calcul des résultats

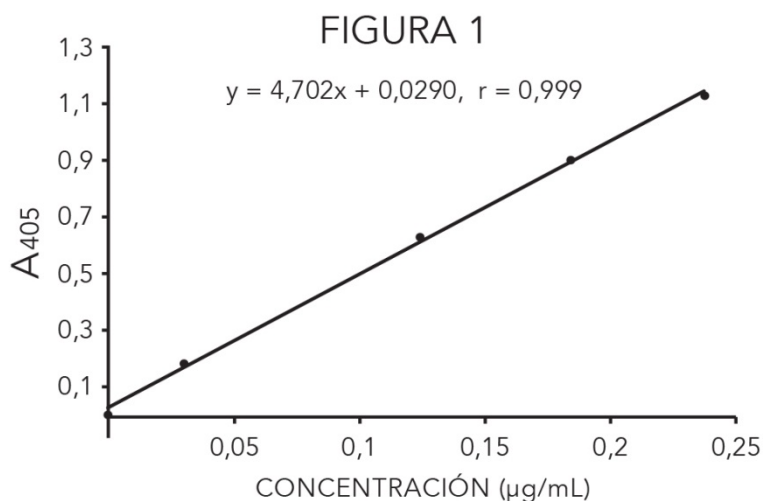
De façon générale, il a été montré qu'une dilution à 1/70 du sérum ou plasma humain normal donnait un résultat optimal avec le kit d'essai immunoenzymatique C4d. Les échantillons de sérum ou de plasma complet peuvent être dilués à des concentrations de 1/40 à 1/100 pour permettre une quantification précise et complète de l'analyte C4d. Les échantillons sériques ou plasmatiques normaux dilués à plus de 1/100 risquent de fournir des valeurs de A_{405} inférieures à 0,1, ce qui peut entraîner des résultats inexacts.

Selon la concentration de l'échantillon et la conception expérimentale, il peut être nécessaire de diluer d'avantage les échantillons (c.-à-d. une dilution plus grande) pour obtenir des valeurs de A_{405} comprises dans la plage des étalons du kit et permettant ainsi de calculer la concentration en analyte C4d. Il est également possible de reporter le taux de C4d comme étant supérieur ou égal à la valeur maximale calculable pour la dilution particulière testée.

Utilisation de la courbe étalon: On obtient la courbe étalon pour l'essai immunoenzymatique C4d en utilisant en ordonnées les valeurs A_{405} pour chaque étalon (auxquelles on a soustrait le blanc), et en abscisse, la concentration attribuée à chaque étalon. Après régression linéaire, la courbe étalon obtenue doit répondre aux critères de validation (voir ci-dessous). La plupart des ordinateurs et des calculateurs sont capables d'exécuter ces calculs.

Les données peuvent aussi être obtenues par graphique réalisé à la main et les valeurs ($\mu\text{g/ml}$) de l'échantillon à analyser peuvent être lues directement à partir de la courbe étalon la plus adaptée. La Figure 1 est un exemple de courbe étalon type.

Courbe étalon représentative



Validation

Déterminer la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation de la meilleure courbe dérivée obtenue pour les étalons du kit C4d. Les valeurs doivent être comprises entre les limites indiquées pour que l'essai soit valide.

coefficient de corrélation(r): > 0,95
pente (m): entre 3,32 et 6,50
ordonnée à l'origine (b): entre (-)0,056 et 0,063

Consulter les étiquettes des flacons pour connaître la plage de concentrations en C4d acceptable pour les contrôles haut et bas.

LIMITES DE LA PROCEDURE

Ce kit est destiné à la recherche uniquement et ne vise pas pour une utilisation dans les procédures de diagnostic.

Le MicroVue C4d Fragment immuno-enzymatique a été utilisé pour tester des échantillons de sérum ou de plasma EDTA. Autres anticoagulants n'a pas été testée.

EXEMPLE DE VALEURS

Quatre-vingt (80) échantillons de plasma sur EDTA (dilués à 1/70 dans le diluant d'échantillon) et cinquante-quatre (54) échantillons sériques (dilués à 1/70 dans le diluant d'échantillon) ont été testés avec l'essai immunoenzymatique MicroVue C4d Fragment. Les plages de valeurs correspondant aux échantillons sériques et plasmatiques sont indiquées ci-dessous.

	n	Moyenne	Plage	
			± 2 ET	± 3 ET
Plasma sur EDTA	80	3,5	0,7 µg-6,3 µg/ml	0-7,7 µg/ml
Serum	54	4,6	1,2 µg-8,0 µg/ml	0-9,7 µg/ml

PERFORMANCES DU TEST

Limites

LDD: La limite de détection (LDD) du dosage du C4d, déterminée par la limite supérieure de 3 écarts-types d'un essai utilisant zéro comme étalon, est de 0,001 µg/ml.

LIDQ: La limite inférieure de quantification (LIDQ) du dosage du C4d est de 0,022 µg/ml, concentration la plus basse de la courbe étalon remplissant les critères d'exactitude et de précision du NCCLS.

Substances interférantes

Le citrate de sodium et l'EDTA tétrasodique ont été testés à des concentrations de respectivement 1000 mg/dl et 800 mg/dl, et se sont révélés ne pas interférer avec l'essai.

Précision

Les précisions intra-cycle et inter-cycles ont été déterminées en testant trois échantillons plasmatiques en 20 répliques au cours de 9 cycles différents.

C4d (µg/ml)	CV Intra-cycle ¹ (%)	CV Inter-cycle ² (%)
4,4	9,7	11,2
4,7	7,4	8,8
7,9	6,1	8,5

¹n=20 répliques ²n=9 cycles

Linéarité

La linéarité a été établie par mélange d'un échantillon plasmatique riche avec un échantillon plasmatique pauvre en diverse proportions de façon à créer des taux d'analyte intermédiaires. La récupération moyenne était de 92,7% avec une plage absolue de 87,0-99,0%.

ASSISTANCE

Pour toute commande ou assistance technique, veuillez contacter un représentant Quidel au +1 800 874 1517 (aux États-Unis) ou +1 858 552 1100 (hors des États-Unis), du lundi au vendredi, de 8h00 à 17h00, heure de l'Est. Les commandes peuvent également être passées par fax au +1 740 592 9820. Pour obtenir de l'aide par e-mail, veuillez écrire à customerservice@quidel.com ou à technicalsupport@quidel.com.

Pour les services depuis les autres pays, veuillez contacter votre distributeur local. Vous trouverez les informations sur Quidel, ses produits et ses distributeurs sur le site www.quidel.com.

RÉFÉRENCES

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 α 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.

REF A008 – MicroVue C4d Fragment EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PIA008002FR00 (08/19)

GLOSSAIRE

REF

Référence catalogue



Conformité Européenne

EC REP

Représentant autorisé dans
la Communauté Européenne

LOT

Référence du lot



Date d'expiration



Fabricant



Conditions de stockage



Utilisation prévue



Consulter les instructions
électroniques



Risques biologiques

IVD

Pour utilisation *in vitro*



Contenu suffisant pour 96 déterminations

CONT

Contenu

CONTROL

Contrôle
