

## Saggio immunoenzimatico per la misurazione dell'attività totale del percorso classic del complement nel siero umano

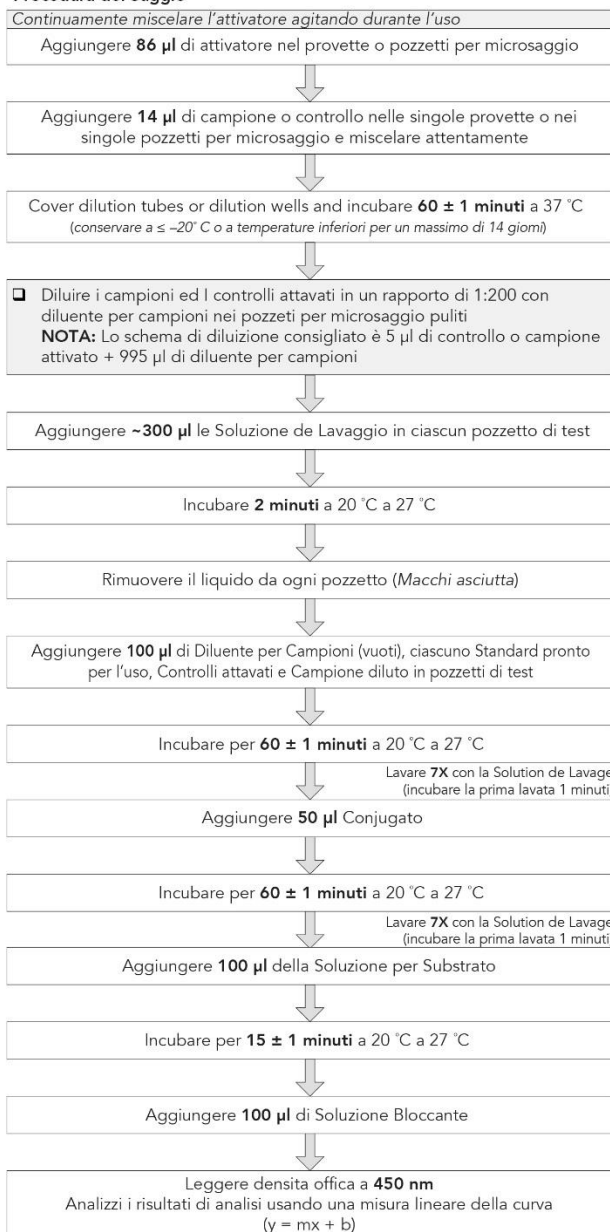
Per uso diagnostico *In Vitro*

### SOMMARIO

#### Preparato di il Campione ed il reagents

- Diluire la Soluzione di Lavaggio Concentrato 1:20 con acqua deionizzata
- Reidrati ogni Controlli con 100 µl acqua deionizzata  
*(lasciare reidratare 15 minuti. Passare nuovamente su vortex e riporre nei ghiaccio)*

#### Procedura del Saggio



Il saggio immunoenzimatico MicroVue CH50 Eq misura l'attività totale del percorso classico del complemento nel siero umano e consente il rilevamento della mancanza di uno o più componenti del complemento da C1 a C9.

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il legame del componente C1q di C1 agli immunocomplessi attiva il percorso classico del complemento. Tale attivazione produce una serie di reazioni enzimatiche e non enzimatiche, che culminano nella formazione dei complessi del complemento terminali (TCC). In condizioni standard, il livello di TCC che può essere generato in un siero rappresenta l'espressione quantitativa dell'attività totale classica del complemento nel siero.

Il metodo tradizionale per la misurazione dell'attività totale classica del complemento nel siero è rappresentato dal test CH50.<sup>1</sup> Si tratta di un saggio litico che utilizza gli eritrociti di ovino sensibilizzati tramite anticorpo (EA) come attivatori del percorso classico del complemento e varie diluizioni del siero di test per determinare la quantità necessaria per ottenere la lisi al 50 %. La percentuale di emolisi viene determinata tramite spettrofotometro. Il test CH50 rappresenta una misura indiretta del TCC, in quanto il TCC stesso è direttamente responsabile dell'emolisi misurata.

Il saggio immunoenzimatico MicroVue CH50 Eq fornisce una misura diretta dell'attività totale classica del complemento nel siero quantificando la quantità di TCC generato in condizioni standard. Il saggio immunoenzimatico MicroVue CH50 Eq si serve di un anticorpo monoclonale ad un unico neoantigene per la cattura dell'analite TCC. Dal momento che sia il saggio immunoenzimatico CH50 Eq che il test CH50 si basano sulla generazione dei TCC e correlati, i risultati del saggio immunoenzimatico CH50 Eq sono espressi in equivalenti di unità CH50 per millilitro.

## PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il saggio immunoenzimatico CH50 Eq per la quantificazione dell'attività totale classica del complemento nel siero umano prevede tre procedure di base: (1) attivazione del complemento, (2) diluizione del campione e (3) saggio per complessi del complemento terminali (TCC).

Per attivare il percorso classico del complemento, nei pozzetti per microsaggio o nelle provette contenenti l'attivatore vengono aggiunti campioni di siero umano non diluiti e controlli. Durante l'incubazione viene attivato il percorso classico del complemento e vengono generati i TCC.

Nella seconda fase, i sieri attivati vengono diluiti nei pozzetti per microsaggio o nelle provette e dispensati, insieme agli standard per kit, direttamente in una piastra per microsaggio. I TCC presenti nei campioni attivati si legano agli anticorpi monoclonali che rivestono la superficie dei pozzetti per microsaggio.

Nella terza fase, la piastra per microsaggio per TCC viene lavata e caricata con un coniugato con perossidasi estratto da radice di rafano, che aderisce ai TCC legati. Dopo il lavaggio, la micropiastra per TCC viene caricata con un substrato enzimatico cromogeno. Dopo l'incubazione viene aggiunto un reagente per interrompere lo sviluppo del colore. Le assorbanze (valori  $A_{450}$ ) generate con i controlli, gli standard per kit ed i campioni di test vengono misurate tramite spettrofotometro. L'intensità del colore della miscela della reazione è proporzionale alla concentrazione di TCC presente e alle unità CH50. In base alla curva standard del kit, i risultati del saggio vengono espressi in equivalenti di unità CH50 per millilitro (CH50 U Eq/ml).

## REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Il kit per saggio immunoenzimatico CH50 Eq contiene quanto segue:

<b>A Standards</b>		
<b>B Standard</b>	<b>Codici A3719–A3723</b>	<b>1 ogni x 1.5 ml</b>
<b>C</b>	Ognuno di essi contiene siero umano con equivalenti di unità CH50 per ml (U Eq/ml), stabilizzatori per	
<b>D</b>	proteine	
<b>E</b>		
<b>N Normal Controls</b>		
<b>Controllo normale</b>	<b>Codice A3724</b>	<b>3 ogni x 100 µl</b>
(liofilizzato) Dopo la ricostituzione, ognuno di essi contiene siero umano		
<b>L Low Controls</b>		
<b>Controllo inferiore</b>	<b>Codice A3725</b>	<b>3 ogni x 100 µl</b>
(liofilizzato) Dopo la ricostituzione, ognuno di essi contiene siero umano		
<b>1 Microassay Plate</b>		
<b>Piastra per microsaggio</b>	<b>Codice A3840</b>	<b>1 pezzi</b>
per 96 pozzetti, con fissatore e supporto contenente 12 strisce da otto pozzetti rivestiti con anticorpo monoclonale di topo in una busta protettiva risigillabile		
<b>2 Stop Solution</b>		
<b>Soluzione bloccante</b>	<b>Codice A9947</b>	<b>12 ml</b>
Contiene 1N (4 %) acido cloridrico		
<b>3 20X Wash Solution Concentrate</b>		
<b>Soluzione di lavaggio concentrata 20X</b>	<b>Codice A9957</b>	<b>2 ogni x 50 ml</b>
Ogni liquido ottenuto contiene soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), lo 1,0 % di Tween-20® e lo 0,035 % di ProClin® 300		
<b>4 Complement Specimen Diluent</b>		
<b>Diluyente per campioni di complemento</b>	<b>Codice A3670</b>	<b>50 ml</b>
Contiene PBS, lo 0,05 % di Tween-20, il 2,5 % di stabilizzatori per proteine e lo 0,035 % di ProClin 300		
<b>5 TMB Substrate</b>		
<b>TMB substrato</b>	<b>Codice 5059</b>	<b>12 ml</b>
Contiene 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) e Perossido di Idrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).		
<b>6 Conjugate</b>		
<b>Coniugato</b>	<b>Codice A3726</b>	<b>7 ml</b>
Contiene anticorpi (capra) coniugati con perossidasi estratto da radice di rafano anti TCC		
<b>7 Activator</b>		
<b>Attivatore</b>	<b>Codice A3718</b>	<b>10 ml</b>
Contiene gammaglobuline umane e anticorpi monoclonali murini in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) con lo 0.02% di azide di sodio		
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 alla densità ottica di A<sub>450</sub> tra 0,0 e 3,0
- Acqua deionizzata o distillata
- Incubatore o riscaldatore per piastra per microsaggio (37 °C)
- Bagnomaria (37 °C)

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *In Vitro*.
- Seguire le precauzioni generali durante la manipolazione del contenuto di questo kit e di qualunque campione paziente.<sup>4</sup>
- Indossare adeguati indumenti di protezione, guanti e protezioni per occhi/viso durante la manipolazione del contenuto di questo kit.
- Usare i reagenti forniti come un'unità integrale prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.
- Conservare i reagenti del saggio come indicato.
- Non usare le strisce rivestite se la busta protettiva è danneggiata.
- 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.
- Il Soluzione bloccante è considerato corrosivo e può causare irritazioni alla cute. Non ingerirlo. Evitare il contatto con la cute, gli occhi o gli indumenti. Se avviene il contatto, lavare con acqua. Se ingerito, consultare un medico.
- 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.
- Si consiglia l'uso di pipette multicanale o di pipettatori a ripetizione per garantire la fornitura veloce dei reagenti.
- Per una misurazione accurata dei campioni, aggiungere accuratamente i campioni e gli standard. Pipettare attentamente, usando esclusivamente apparecchiature calibrate.
- 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*).
- Evitare la contaminazione microbica o crociata di campioni, reagenti o materiali. In caso di contaminazione si possono ottenere risultati errati.
- Sottoporre a test ciascun campione in duplicato.
- Non utilizzare un pozzetto per microsaggio per più di un test.
- L'impostazione di tempi e temperature di incubazione diversi da quelli indicati nella sezione relativa alle procedure può fornire risultati errati.
- Il concentrato per substrato è sensibile alla luce. Evitare l'esposizione prolungata alla luce diretta. Quando non sono in uso, conservare i reagenti in un luogo buio.
- Dopo l'inizio del saggio, evitare che i pozzetti per microsaggio si asciughino.
- Quando si aggiungono o si aspirano i liquidi dai pozzetti per microsaggio, non raschiare né toccare il fondo dei pozzetti.
- Campioni inattivati a caldo, iperlipemici o contaminati possono fornire risultati errati.
- 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.
- Lavare la piastra utilizzando un flacone di lavaggio o un dispositivo di riempimento automatico (*PROCEDURA DEL SAGGIO*, fase 9). Per ottenere risultati ottimali, la piastra per microsaggio non deve essere lavata con una pipetta multicanale.
- Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con le normative federali, statali e locali.

## CONSERVAZIONE

I kit chiusi devono essere conservati a 2 °C a 8 °C. Dopo l'apertura del kit, la soluzione di lavaggio concentrata 20X può essere conservata a 2 °C a 30 °C.

Dopo avere scelto i reagenti o i materiali da usare nel saggio, riportare immediatamente i reagenti inutilizzati alle rispettive temperature di conservazione. Prima dell'uso portare i reagenti ed i materiali a temperatura ambiente (20 °C a 27 °C).

## INDICAZIONE DI INSTABILITÀ O DETERIORAMENTO DEI REAGENTI

L'intorbidamento o l'alterazione del colore della soluzione di lavaggio diluita indica un deterioramento del reagente. Se ciò accade, gettare la soluzione.

L'attivatore può contenere delle particelle. Ciò è normale e non influenza le prestazioni del saggio.

## PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

*Usare il siero come campione per questo saggio. Il plasma non è accettato.*

**Manipolare e smaltire tutti i campioni seguendo le precauzioni generali.**

È essenziale eseguire correttamente le operazioni di prelievo, elaborazione, conservazione e spedizione dei campioni in quanto il complemento può essere attivato in campioni manipolati in modo inadeguato. Ciò può portare a risultati errati.

È necessario raccogliere e preparare i campioni di siero in modo asettico, utilizzando tecniche standard per i test in laboratorio. I campioni possono essere conservati fino a 2 ore a temperatura ambiente, fino a 4 ore nel ghiaccio, fino a 3 giorni a 4 °C e -70 °C o inferiore per conservazione a lungo termine. Non sottoporre i campioni a più di 6 cicli di congelamento/ decongelamento. 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.

In caso di spedizione, confezionare i campioni con abbondante ghiaccio secco. I campioni che giungono decongelati al laboratorio di analisi possono risultare compromessi. Una volta giunti a destinazione, i campioni possono essere conservati ad una temperatura di -70 °C o inferiore.

## PREPARAZIONE DEL REAGENTE

Dopo avere prelevato i reagenti ed i materiali necessari, riportare gli elementi inutilizzati alle rispettive temperature di conservazione (fare riferimento alla sezione *CONSERVAZIONE*). Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i materiali per il saggio a temperatura ambiente (20 °C a 27 °C).

### 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 °C a 8 °C, possono essersi formati dei cristalli. Per dissolvere i cristalli, scaldare il flacone a bagnomaria ad una temperatura di 37 °C a 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 °C a 8 °C. In caso di alterazione del colore o di intorbidimento, gettare il reagente.

### 2. 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 riporle nel contenitore di conservazione, risigillare il contenitore e riportarlo ad una temperatura di 2 °C a 8 °C. Fissare le strisce da usare nel saggio.

### 3. Diluizione dei campioni

**ATTENZIONE: tutti i campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infetto. Non utilizzare campioni inattivati a caldo, contaminati o non correttamente conservati. Per questo saggio sono richiesti campioni di siero.**

I campioni di siero devono essere scongelati velocemente a bagnomaria a 37 °C. Subito dopo il scongelamento, conservare i campioni nel ghiaccio fino alla fase di attivazione (ved. la sezione *PROCEDURA DEL SAGGIO*). Non diluire i campioni di test prima dell'attivazione.

### 4. Preparazione dei controlli normali e inferiori

Ad ogni fiala di controllo normale e inferiore liofilizzato aggiungere 100 µl di acqua deionizzata o distillata. Miscelare brevemente per consentire la ricostituzione e lasciare riposare per quindici (15) minuti a temperatura ambiente. Passare nuovamente su vortex e riporre nel ghiaccio fino alla fase di attivazione.

## PROCEDURA DEL SAGGIO

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

Prima di procedere, fare riferimento alle sezioni *PREPARAZIONE DEL REAGENTE E AVVERTENZE E PRECAUZIONI*.

- Attivazione di campioni e controlli.** Miscelare l'attivatore, contenente particelle a pronta sospensione, agitando il flacone prima dell'uso. Agitare frequentemente durante questa fase per consentire la sospensione delle particelle. Aggiungere 86 µl di attivatore nel numero previsto di provette o pozzetti per microsaggio.\* Quindi aggiungere 14 µl di campione di siero non diluito, controllo normale o controllo inferiore nelle singole provette o nei singoli pozzetti per microsaggio contenenti l'attivatore. Miscelare attentamente. Coprire per ridurre al minimo l'evaporazione. Incubare a 37 °C per sessanta (60) minuti. **(PER MAGGIORE COMODITÀ:** se si desidera raggruppare i campioni, dopo l'attivazione sarà possibile conservare i campioni attivati non diluiti a -20 °C o a temperature inferiori per un massimo di 14 giorni prima di passare alle fasi successive).
- \* Il numero di provette o pozzetti per microsaggio necessari per l'attivazione corrisponde al numero di campioni di test più due (2) addizionali per l'attivazione dei due controlli.
- Diluizione dei campioni e dei controlli attivati.** Al termine dell'attivazione, diluire i campioni ed i controlli attivati in un rapporto di 1:200 con diluente per campioni nei pozzetti per microsaggio puliti e non utilizzati oppure nelle provette.  
**NOTA:** Lo schema di diluizione consigliato è 5 uL di controllo o campione attivato + 995 uL di diluente per campioni.
- Preparare le strisce per microsaggio come indicato di seguito:
  - Reidratare i pozzetti per microsaggio riempiendoli con soluzione di lavaggio (250–300 µl/pozzetto) usando un flacone di lavaggio o un dispositivo automatico.
  - Incubare a temperatura ambiente (20 °C a 27 °C) per due minuti.
  - Rimuovere il liquido da ogni pozzetto.
  - Capovolgere la piastra e picchiettare energicamente più volte sulla carta assorbente per eliminare eventuali residui di liquido.
- Aggiungere 100 µl di diluente per campioni nei pozzetti duplicati che verranno usati per confronto con il vuoto del lettore delle piastre.
- Aggiungere 100 µl di ciascuno standard pronto per l'uso (A–E) nei pozzetti duplicati. **Notare che gli standard sono già stati diluiti e sono pronti per l'uso.**
- Aggiungere 100 µl di controlli normali e inferiori diluiti e attivati nei pozzetti duplicati.
- Aggiungere 100 µl di ciascun campione diluito in duplicato nei pozzetti per microsaggio assegnati.
- Incubare a temperatura ambiente (20 °C a 27 °C) per 60 ± 1 minuti.
- Lavare i pozzetti per microsaggio come indicato di seguito: **NOTA: In questa fase non è consigliato l'uso di una pipetta multicanale.**
  - Dopo l'incubazione descritta nella fase 8 (o nella seguente fase 12) rimuovere il liquido da ciascun pozzetto.
  - Riempire ciascun pozzetto con la soluzione di lavaggio (250–300 µl/pozzetto) utilizzando un flacone di lavaggio, un dispositivo di lavaggio automatico per piastra o un altro dispositivo di lavaggio.
  - Incubare i pozzetti per 1 minuto a temperatura ambiente (20 °C a 27 °C).
  - Rimuovere il liquido da ogni pozzetto.

- e. Riempire ciascun pozzetto con la soluzione di lavaggio (250–300 µl/pozzetto).
  - f. Rimuovere il liquido da ogni pozzetto.
  - g. **Ripetere le fasi e–f altre cinque volte.**
  - h. Dopo il settimo ciclo di lavaggio, capovolgere la piastra e picchiettare energicamente più volte sulla carta assorbente per eliminare eventuali residui di liquido.
10. Utilizzando una pipetta multicanale o a ripetizione, dispensare 50 µl di coniugato in ogni pozzetto di test lavato, compresi i pozzetti vuoti.
  11. Incubare le strisce per microsaggio a temperatura ambiente (20 °C a 27 °C) per 60 ± 1 minuti.
  12. Lavare i pozzetti per microsaggio dopo l'incubazione di 60 minuti, come descritto nella fase 9.
  13. Immediatamente dopo il lavaggio, dispensare 100 µl della soluzione per TMB substrato in ciascun pozzetto, compresi quelli vuoti.
  14. Incubare le strisce per microsaggio a temperatura ambiente (20 °C a 27 °C) per 15 ± 1 minuti.
  15. Aggiungere 100 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. Picchiettare delicatamente sulla piastra per spargere lo sviluppo del colore in modo uniforme.
  16. Determinare la lettura dell'assorbanza a 450 nm (valore  $A_{450}$ ) per ogni pozzetto di test entro un'ora dall'aggiunta della soluzione bloccante, effettuando la correzione in base ai vuoti necessaria. Non è richiesto alcun filtro di riferimento.
  17. Smaltire i residui di campioni diluiti, di attivatore e di controlli e le strisce per microsaggio usate (fare riferimento *AVVERTENZE E PRECAUZIONI*). Conservare il supporto e il fissatore per strisce per uso futuro.

## CONTROLLO DI QUALITÀ

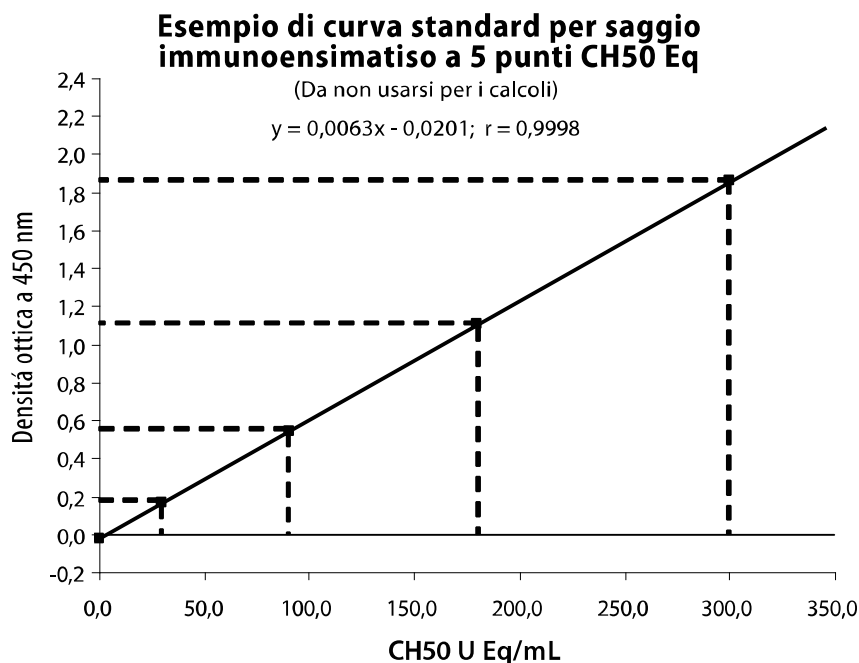
Le buone pratiche di laboratorio consigliano l'uso di controlli per garantire l'esecuzione adeguata del dosaggio. Ciascun kit CH50 Eq EIA contiene campioni di controllo normali e bassi che possono essere utilizzati a questo scopo. Questi controlli dovrebbero essere esaminati almeno una volta per ciascun gruppo di campioni, ovvero per ogni singolo ciclo di attivazione. I controlli, quando usati come indicato nelle istruzioni, dovrebbero fornire valori equivalenti all'unità di CH50 rientranti negli intervalli specificati sul certificato di analisi. Poiché questi controlli devono essere attivati, diluiti e analizzati esattamente come un tipico campione, fungono sia da controlli sia da standard di riferimento per ciascuna attivazione e ciascun ciclo di CH50 Eq EIA. È inoltre possibile utilizzare controlli esterni, preparati in laboratorio, per garantire che il dosaggio sia eseguito correttamente.

Oltre a ciò, l'inserito del prodotto richiede che la curva standard generata con gli standard del kit A–E adempia a rigidi requisiti di convalida (fare riferimento a *INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI*). È necessario esaminare gli standard in duplicato per ciascuna corsa del saggio. Se il saggio non è conforme a questi requisiti, ripetere il saggio o contattare l'assistenza tecnica Quidel.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

**Utilizzo della curva standard:** la curva standard per il saggio immunoenzimatico CH50 Eq viene generata utilizzando i valori  $A_{450}$  da cui sono stati sottratti quelli vuoti di ogni standard (sull'asse y) e la concentrazione assegnata a ciascuno standard (lungo l'asse x). È necessario che la curva standard sia conforme ai requisiti di convalida. La maggior parte dei computer e delle calcolatrici è in grado di eseguire tale calcolo. Un esempio di curva standard tipica è mostrato in Figura 1.

**Figura 1.**  
**Esempio di curva standard**



**Calcolo del livello attuale di CH50 U Eq nei campioni dei pazienti:** i valori dei campioni vengono calcolati dalla curva standard attraverso l'analisi di regressione lineare. Per quanto riguarda i campioni di test attivati e diluiti in un rapporto di 1:200 prima del test, il valore CH50 U Eq/ml può essere letto direttamente dalla curva standard. Anche i valori (U Eq/ml) per i controlli normali e inferiori possono essere letti direttamente dalla curva standard, in quanto sono stati diluiti secondo il rapporto 1:200.

Al fine di ottenere determinazioni accurate di CH50 per i campioni di test che producono valori  $A_{450}$  maggiori di quello dello Standard E del saggio immunoenzimatico CH50 Eq (o quelli che producono valori  $A_{450}$  inferiori a quelli ottenuti con lo Standard A), i campioni di test possono essere nuovamente esaminati con una diversa diluizione affinché i nuovi valori  $A_{450}$  siano compresi entro tali limiti. In tutte le ripetizioni dei saggi si devono esaminare anche gli standard ed i controlli.

Se un campione viene esaminato con una diluizione diversa da 200, il livello CH50 del campione viene determinato correggendo la differenza tra la diluizione esaminata e la normale diluizione a 200. Ad esempio, se un campione viene diluito al valore di 100 invece che al normale valore di 200, e la curva di regressione lineare genera una concentrazione di 100 CH50 U Eq/ml, il valore attuale di CH50 U Eq/ml nel campione è 50 (cioè 100 CH50 U Eq/ml diviso per 2).

### Convalida

Calcolare il valore CH50 U Eq/ml per i controlli normali e inferiori. Determinare inoltre il coefficiente di correlazione ( $r$ ) e l'intersezione  $y$  ( $b$ ) della curva lineare best-fit derivata per i valori ottenuti con gli Standard A-E. Per convalidare il saggio, i valori  $r$ ,  $b$  e di controllo devono essere compresi nei limiti indicati di seguito:

---

Coefficiente di correlazione ( $r$ ):  $> 0,96$

Intersezione  $y$  ( $b$ ): tra  $(- )0,090$  e  $(+)0,068$

Pendenza ( $m$ ): tra  $0,0033$  e  $0,0089$

Valori di controllo normale e inferiore: All'interno degli intervalli indicati sul certificato di analisi.

---



## LIMITI DELLA PROCEDURA

Il saggio immunoenzimatico MicroVue CH50 Eq è stato usato per esaminare i campioni prelevati sotto forma di siero. Non sono state determinate le prestazioni cliniche dei campioni di plasma preparati con anticoagulanti diversi.

## RISULTATI ATTESI

In Quidel sono stati esaminati duecentotrentaquattro (234) campioni di siero normali e anormali tramite il saggio immunoenzimatico CH50 Eq. Il valore medio ottenuto con la popolazione di campioni normali era  $133 \pm 54$  CH50 U Eq/ml. In generale, il cutoff ottenuto tramite l'analisi delle caratteristiche operative del ricevente (ROC)<sup>2</sup> con tali campioni di siero normali e anormali corrispondeva a 70 CH50 U Eq/ml. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca i propri valori normali.

In uno dei principali laboratori clinici di riferimento degli Stati Uniti sono stati esaminati duecentoventuno (221) campioni di pazienti con il saggio immunoenzimatico MicroVue CH50 Eq. In base al valore di cutoff di 70 CH50 U Eq/ml e all'analisi ROC, l'accuratezza totale del saggio immunoenzimatico CH50 Eq, confrontata con i risultati combinati derivanti da tre saggi emolitici ed un test basato su saggio immunoenzimatico, era maggiore del 97 %.

**Adottando le normali misurazioni delle prestazioni cliniche, il saggio immunoenzimatico MicroVue CH50 Eq ha fornito inoltre un'accuratezza clinica maggiore del 97 % con una sensibilità del 93,2 % ed una specificità del 99,4 %.** Utilizzando il metodo Bablok Passing Algorithm<sup>3</sup>, i valori CH50 U Eq ottenuti tramite saggio immunoenzimatico MicroVue CH50 Eq sono risultati strettamente correlati ai valori CH50 ottenuti tramite il saggio emolitico tradizionale riportato dal laboratorio clinico, fornendo un livello di significatività pari a  $p < 0,001$ .

## CARATTERISTICHE DEL METODO

### Precisione

La precisione all'interno di una corsa e tra diverse corse è stata determinata esaminando 16 replicati di 4 campioni di siero in 10 diverse corse.

Campione	CH50 (U Eq/ml)	In una stessa corsa <sup>1</sup> C.V. (%)	Tra diverse corse <sup>2</sup> C.V. (%)
Siero	150,4	3,2	6,0
	59,96	4,5	5,4
	98,84	3,6	8,7
	48,86	3,9	6,2

<sup>1</sup>n = 16 replicati      <sup>2</sup>n = 10 corse

## 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 [quidel.com](http://quidel.com).

## BIBLIOGRAFIA

1. Mayer, M.M. Complement and Complement Fixation. In: Kabat E.A., Mayer, M.M., eds. *Experimental Immunochimistry*. 2nd ed. Springfield: Charles C Thomas, 1961:133-71.
2. "Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic (ROC) Plots." Tentative Guideline, Dec. 1993. *NCCLS Document GP109-T*, Vol. 13, No 28.
3. Passing, H. And W. Bablok. "A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21(1): 709-720 (1983).
4. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.

MicroVue è un marchio commerciale di Quidel Corporation. Qualunque altro marchio commerciale riportato nel presente documento appartiene al rispettivo proprietario e il suo utilizzo in questo contesto non implica la sponsorizzazione né il supporto a prodotti o servizi.

**REF** A018 – MicroVue CH50 Eq EIA Kit

**IVD**



**EC REP**

MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover,  
Germania



**Quidel Corporation**  
2005 East State Street, Suite 100  
Athens, OH 45701 USA  
[quidel.com](http://quidel.com)

**PIA018003IT00 (09/21)**

---

**REF**

Numero di catalogo



Marcio CE di conformità

---

**EC REP**

Rappresentante autorizzato  
nella Comunità Europea

**LOT**

Codice lotto

---



Data di scadenza



Produttore

---



Limitazione di temperatura



Uso previsto

---



Leggere le istruzioni e di  
etichettatura per l'uso



ATTENZIONE: Nocivo per ingestione (oral)

---



Rischio biologico

**IVD**

Per uso diagnostico *In Vitro*

---



Contenuto sufficiente per 96 determinazioni

**CONT**

Contenuto / Contiene

---

**CONTROL**

Controllo

---