

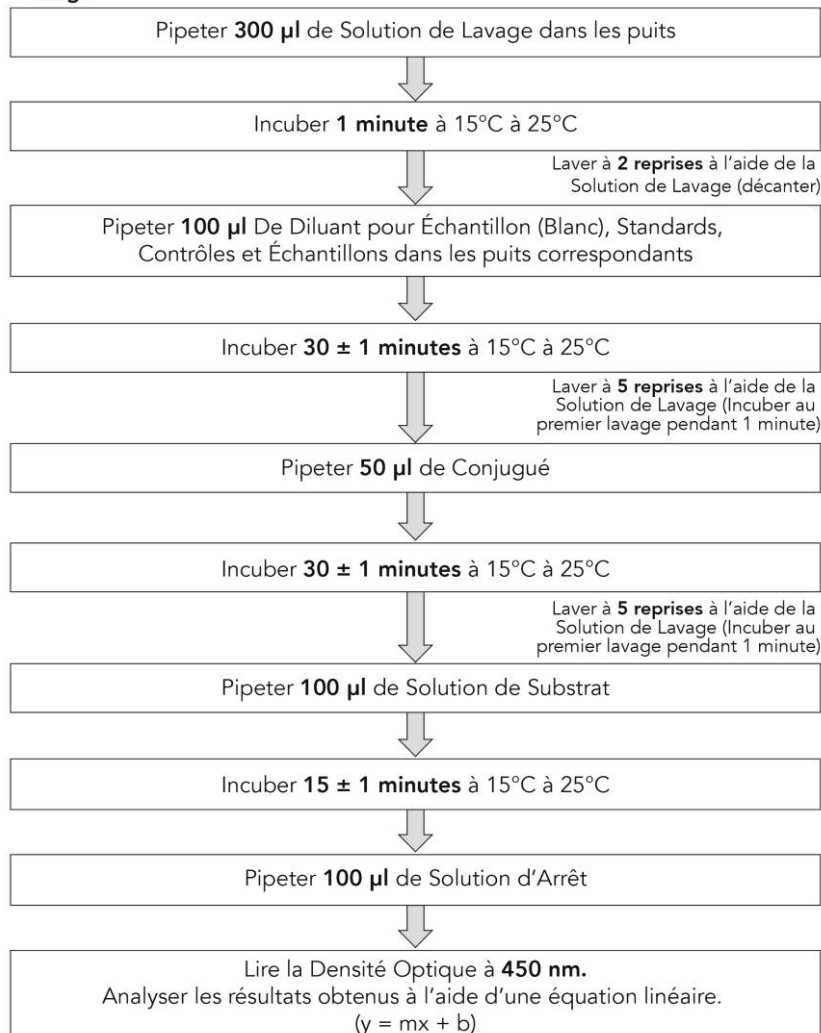
Pour la quantitation du fragment Bb du facteur B, d'un indicateur de l'activation de la voie alternative du complément, en plasma et sérum humains

RÉSUMÉ

Préparation des Réactifs, Standards, Contrôles et Échantillons

- Diluer la solution concentrée de lavage 1:20 à l'aide d'eau distillée
- Reconstituer chaque standard et contrôle à l'aide de 1.0 ml de réhydratant (Attendre 15 minutes et bien mélanger avant utilisation)
- Diluer les Échantillons de plasma 1:10 à l'aide du diluant pour échantillon (Par ex: 50 µl + 450 µl. Pipeter dans les puits dans les 30 minutes après dilution)
- Diluer les Échantillons de sérum 1:20 à l'aide du diluant pour échantillon (Par ex: 25 µl + 475 µl. Pipeter dans les puits dans les 30 minutes après dilution)

Dosage





INTÉRÊT CLINIQUE

Le kit de dosage enzymatique Bb Plus de MicroVue mesure le taux de Fragment Bb du Complément, un fragment du Facteur B activateur dans la voie alternative du complément, dans le plasma ou le sérum humain. La détection de Bb dans le plasma ou le sérum met en évidence l'implication de la voie alternative du complément. La mesure de l'activation de cette voie alternative apporte une aide dans le diagnostic de plusieurs pathologies rénales (par ex: glomérulonéphrite chronique, néphrite lupique) ainsi que dans celui de plusieurs maladies de peau (par ex: dermatite herpétiforme et pemphigus vulgaire) ; on observe également l'activation de cette voie alternative dans d'autres maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'anémie falciforme et les infections bactériennes à Gram négatif.

RÉSUMÉ ET EXPLICATIONS

La voie alternative du complément procure une protection innée contre les agents microbiens, en l'absence d'anticorps spécifique.¹⁻⁵ L'activation de cette voie du complément peut être provoquée par diverses substances telles que des polysaccharides ou des lipides microbiens, des lipopolysaccharides bactériens gram-négatifs et des déterminants de surface présents sur certains virus, parasites, cellules de mammifères infectées et cellules cancéreuses. Dans les maladies auto-immunes, la voie alternative du complément peut contribuer directement à l'atteinte tissulaire.

Une importante réaction centrale survient au cours de la voie alternative du complément, c'est la conversion du Facteur B zymogène de PM 93Kd en une enzyme protéolytique active. Cette conversion s'accomplit en 2 étapes. Au cours de la 1^{ère} étape, le Facteur B forme un complexe dépendant du magnésium avec C3(H₂O) ou C3b.⁴ Le complexe C3(H₂O),B se forme seulement en phase liquide, tandis que le complexe C3b,B peut se former soit en phase liquide, soit sur une surface cible.¹⁻⁴ Le Facteur B (présent dans le complexe C3(H₂O),B ou C3b,B) est clivé en fragments Ba (33 Kd) et Bb (60 Kd) au cours de la 2^{ème} étape par une enzyme de la voie alternative, le Facteur D.¹⁻⁴ Le complexe bimoléculaire C3b,Bb qui en résulte est l'enzyme C3-convertase de la voie alternative. La sous-unité Bb est le site actif catalytique du complexe, capable de cliver C3 en fragments C3a et C3b.^{1-4,6} Les fragments C3b produits par ailleurs de cette manière peuvent former le complexe tri moléculaire C3b,Bb,C3b c'est-à-dire l'enzyme C5-convertase de la voie alternative. Cette C5-convertase est capable de cliver C5 en fragments C5a et C5b.^{1-4,6}

Les C3 et C5-convertases de la voie alternative peuvent être stabilisées par le Facteur P (appelé aussi Properdine), composé de la voie alternative normalement présent dans le sérum ou le plasma humain,¹⁻⁴ ou par le Facteur C3 néphritique, un auto-anticorps produit chez certains patients chez lesquels l'activation de la voie alternative est importante.⁵ Les C3 et C5-convertases de la voie alternative peuvent être dissociées et donc inactivées par une désintégration spontanée,⁷ ou par la fixation au Facteur H ou au Récepteur 1 du Complément (CR1).^{4,8} Le fragment Bb qui est dissocié de l'une de ces convertases conserve certaines activités biologiques, par exemple, rétention d'une activité fonctionnelle hémolytique,^{4,9} capacité à induire une prolifération des macrophages,¹⁰ et activation du plasminogène.¹¹

Bien que l'on estime que l'activation de la voie alternative advienne principalement en l'absence d'anticorps spécifique, il existe de nombreux cas d'activation de la voie alternative résultant de l'activation de la voie classique. Par exemple, les complexes immuns présents chez les patients atteints de maladies auto-immunes peuvent déclencher l'activation de la voie classique du complément, en formant des fragments C3b. Comme cela a été décrit ci-dessus, ces molécules C3b sont capables de fixer le Facteur B et d'entraîner son clivage en fragments Ba et Bb. Donc, l'activation de la voie alternative peut s'observer dans les maladies auto-immunes dues aux anticorps, et peut contribuer significativement à augmenter l'activation du complément et la destruction tissulaire concomitante.

En dosant dans les échantillons les produits issus du clivage du Facteur B, on peut estimer l'importance de l'utilisation de la voie alternative au moment du recueil de l'échantillon dans le cadre de la maladie que l'on étudie. Le dosage EIA Bb Plus de MicroVue permet une mesure simple, rapide, non radioactive, très

spécifique, et quantitative de l'activation du Facteur B. Il est idéal dans les études impliquant le rôle ou l'état de l'activation de la voie alternative du complément, dans de nombreux projets cliniques ou de recherche, et pour suivre la production de Bb *in vitro*.

PRINCIPE DU DOSAGE

Le dosage EIA Bb Plus de MicroVue pour la mesure de Bb dans le plasma humain ou le sérum est un dosage en 3 étapes qui utilise (1) une microplaque coatée par de l'anticorps monoclonal de souris spécifique du Bb humain, (2) un anticorps murin anti-Bb humain conjugué à l'HRP et, (3) un substrat chromogénique.

Dans la première étape, les Standards, Contrôles et les échantillons à doser sont ajoutés dans les micro puits pré-coatés par l'anticorps monoclonal de souris spécifique du Bb humain. Le fragment Bb présent dans les Standards, Contrôles ou échantillons se fixera sur l'anticorps monoclonal anti-Bb, mais pas le Fragment B, ni les autres produits de l'activation du complément. Après incubation, un cycle de lavage élimine le matériel non lié.

Lors de la deuxième étape, on ajoute dans tous les puits l'anticorps murin anti-Bb humain conjugué à l'HRP. L'enzyme conjuguée à l'anti-Bb se lie sur le Bb fixé précédemment sur la paroi des micro puits. Après l'incubation un cycle de lavage élimine le conjugué non lié, en excès.

Dans la troisième étape, un substrat enzymatique chromogénique est ajouté dans tous les puits. Le conjugué-HRP lié réagit avec le substrat, entraînant la formation d'une coloration bleue. Après incubation, la réaction enzymatique est stoppée chimiquement, la solution devient jaune et on peut mesurer l'intensité de la couleur par spectrophotométrie à 450 nm. L'intensité de la couleur du mélange réactionnel est proportionnelle à la concentration de Bb présent dans les échantillons, Standards et Contrôles.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL FOURNIS

96 puits pour le dosage du fragment Bb du Facteur B

Le kit de dosage enzymatique MicroVue Bb Plus contient les éléments suivants:

A Standards Bb Plus	Réf: A9948-A9952	1 ml chacun
B (lyophilisés). Chaque flacon contient une concentration connue de Bb en sérum humain dilué dans du		
C PBS, des stabilisants protéiques et 0,035% ProClin® 300.		
D		
E		
L Contrôle Faible Bb Plus	Réf: A9953	1 ml
(lyophilisé). Le flacon contient une concentration connue de Bb en sérum humain dilué dans du PBS, des stabilisants protéiques et 0,035% ProClin® 300		
H Contrôle Fort Bb Plus	Réf: A9955	1 ml
(lyophilisé) Le flacon contient une concentration connue de Bb en sérum humain dilué dans du PBS, des stabilisants protéiques et 0,035% ProClin 300		
① Barrettes de puits	Réf: A9559	12 chacun
12 x 8 puits coatés par un anticorps monoclonal de souris purifié, spécifique du Bb humain dans un sachet d'aluminium re-scellable		
② Solution d'Arrêt	Réf: A9947	12 ml
Contient Acide Chlorhydrique 1N		
③ Solution de lavage concentrée 20X	Réf: A9957	50 ml
Contient du tampon phosphate (PBS), 1.0% Tween-20®, et 0,035% ProClin 300		
④ Diluant pour Echantillon	Réf: A3670	50 ml
Contient du PBS, 0,05% Tween-20, 2.5% de stabilisants protéiques et 0,035% ProClin 300		

- | | | |
|----------|---|---------------------------------------|
| 5 | Substrat TMB
Contient 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) et peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) | Réf: 5059

12 ml |
| 6 | Conjugué Bb Plus
Contient un conjugué de peroxydase de raifort et d'anti-Bb humain murin en solution dans un tampon stabilisant pour la peroxydase de raifort avec conservateur | Réf: A9956

7 ml |
| 8 | Réhydratant
Contient du 0,035% ProClin 300 | Réf: A3675

25 ml |

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

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Minuteur (60 minutes)
- Calculateur ou logiciel pour permettre de valider le dosage
- Plaques à usage unique et/ou tubes à essais et portoirs
- Récipient pour la dilution de la Solution de Lavage
- Bouteille de lavage ou tout autre équipement de lavage
- Multipette ajustable (8 ou 12 canaux) ou pipetteur automatique (optionnel)
- Pipettes de 1 ml, 5 ml et 10 ml
- Micropipettes et embouts
- Lecteur de plaques pouvant lire des densités optiques comprises entre 0,0 et 2,0
- Eau désionisée ou distillée

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Pour utilisation *In vitro*.
- L'utilisation de Plasma hépariné dans ce dosage peut entraîner des résultats erronés.
- Traiter tous les échantillons comme des produits potentiellement dangereux. Suivre les précautions standard lors de la manipulation de cette trousse et des échantillons de patients.
- Utiliser ensemble tous les réactifs avant la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de la boîte.
- Suivre les recommandations pour la conservation des réactifs.
- Ne pas utiliser les barrettes de puits si leur emballage est abîmé.
- Lors de l'addition ou de l'aspiration des liquides dans les puits, ne pas gratter ou toucher le fond des puits.
- La modification du temps et de la température d'incubation peut entraîner des résultats erronés.
- Ne pas laisser les puits sécher pendant le dosage.
- Ne pas utiliser un puits pour plus d'un test.
- L'utilisation de multipettes ou de pipetteurs automatiques est recommandée pour limiter le temps de distribution des réactifs.
- Pour obtenir une mesure précise des échantillons, pipeter avec précautions les échantillons et les standards en utilisant du matériel calibré.
- Pour obtenir des résultats précis, il est indispensable de recueillir et de conserver correctement les échantillons. (Se reporter au paragraphe *RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS*, page 4).
- Éviter toute contamination microbienne ou croisée des échantillons, réactifs ou matériels, ce qui pourrait entraîner des résultats erronés.
- 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.

- Le ProClin 300 est un conservateur. Tout contact ou ingestion accidentels de tampons ou de réactifs contenant du Proclin peut entraîner une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Appeler un médecin si on observe ces symptômes.
- **Le Substrat concentré est sensible à la lumière. Eviter toute exposition prolongée à une lumière intense ou directe. Après utilisation, conserver le réactif à l'abri de la lumière.**
- Pour éviter la formation d'aérosols pendant le lavage, aspirer le liquide de lavage dans une bouteille contenant de l'eau de javel.
- **Un flacon laveur doit être utilisé pour laver la plaque. Pour un résultat optimal, ne pas utiliser de pipette multicanaux pour laver les barrettes de puits.**
- Des échantillons inactivés par la chaleur, lipidiques ou contaminés peuvent donner des résultats erronés.
- Le test doit être effectué dans une zone suffisamment ventilée.
- Éliminer les contenants et les contenus non utilisés conformément aux exigences fédérales, nationales et réglementations réglementaires locales.
- Porter des gants et des lunettes de protection, et suivre les bonnes pratiques de laboratoire en manipulant cette trousse.
- 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.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Amener tous les réactifs à 15°C à 25°C avant usage.

Après utilisation, conserver les différents constituants et réactifs inutilisés à la température requise (voir le paragraphe *CONSERVATION*).

Barrettes de puits

Déterminer le nombre de barrettes nécessaires pour le dosage. Placer ces barrettes sur le support, refermer avec soin la pochette contenant le reste des barrettes et la conserver à 2°C à 8°C.

Solution de Lavage

Préparer la Solution de Lavage nécessaire pour le lavage des puits en diluant 50 ml de la Solution de Lavage Concentrée 20X à l'aide d'eau distillée ou désionisée, afin d'obtenir un volume final de 1 litre. Mélanger soigneusement avant utilisation. La Solution de Lavage est stable 1 mois à 2°C à 8°C. Éliminer le réactif en cas d'apparition de trouble.

Reconstitution des Standards et des Contrôles Bb Plus

Ajouter 1.0 ml de Réhydratant dans chacun des flacons de Standard (A-E) et de Contrôle (Faible et Fort). Attendre au moins 15 minutes à température ambiante. Mélanger soigneusement. Éviter la formation de mousse ou de bulles pendant le mélange. Les Standards et Contrôles reconstitués sont stables pendant 1 mois à 2°C à 8°C.

Dilution des échantillons

ATTENTION: traiter tous les échantillons comme potentiellement infectieux. Ne pas utiliser des échantillons inactivés par la chaleur ou contaminés.

Dans le dosage MicroVue Bb Plus, il est recommandé de diluer les échantillons de plasma au 1:10 et les échantillons de sérum au 1:20 avec le Diluant pour Échantillons. Après dilution, les échantillons doivent être pipetés dans les puits dans les 30 minutes qui suivent la dilution. Ne pas conserver ou réutiliser les échantillons dilués. Ces échantillons doivent être éliminés après utilisation.

Les échantillons dont les taux de Bb sont élevés peuvent nécessiter des dilutions plus importantes que celles qui sont indiquées.

Pipetage des échantillons dilués dans les puits

L'une des 2 procédures suivantes pourra être utilisée pour l'addition des Echantillons dilués, des Standards, Contrôles et Diluant dans les puits (Voir l'étape 3 du *DOSAGE*):

- Pour le dosage de quelques échantillons, les échantillons dilués et les autres réactifs peuvent être ajoutés directement dans les puits à l'aide d'une micropipette (100 µL/puits).
- Pour des séries, en particulier si le nombre d'échantillons est important, il est recommandé d'utiliser une multipette pour ajouter les échantillons de la façon suivante **(une multipette pourra également être utilisée pour ajouter le Conjugué, le Substrat et la Solution d'Arrêt).**

Afin de pipeter les Standards, Contrôles et Echantillons dilués aussi vite que possible dans les puits, on peut utiliser une deuxième microplaque. Au lieu d'ajouter 100µL de chaque Standard, Contrôle, ou Echantillon dilué individuellement dans les puits recouverts d'anticorps, 120-130 µL de chaque solution peuvent être pipetés dans les puits d'une microplaque vierge (non fournie) en respectant le même ordre que celui de la microplaque du kit. Lorsque tous les échantillons à tester ont été pipetés dans cette microplaque vierge, on pourra rapidement à l'aide d'une multipette transférer 100 µL de chaque puits de cette plaque vierge vers les puits recouverts d'anticorps. Afin d'éviter toute contamination croisée, on changera les embouts de la multipette à chaque nouvelle série d'échantillons.

CONSERVATION

Conserver le kit à 2°C à 8°C avant ouverture. Après ouverture, la Solution de Lavage concentrée 20X et le Réhydratant peuvent être conservés à 2°C à 25°C.

Amener tous les réactifs à température ambiante (15°C à 25°C) avant le dosage. Refermer avec soin la pochette contenant le reste des barrettes et la conserver à 2°C à 8°C.

INDICATIONS D'INSTABILITÉ OU DE DÉTÉRIORATION DES RÉACTIFS

Éliminer la solution de lavage si l'on observe l'apparition de trouble.

RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Manipuler et éliminer les échantillons selon la réglementation en vigueur.

Le recueil et la conservation des échantillons sont importants, dans la mesure où le fragment Bb du Facteur B peut subir une protéolyse dans des échantillons mal recueillis ou mal conservés.

Pendant la coagulation, on observe une activation du complément, c'est pourquoi la concentration de Bb dans les échantillons de sérum humain est supérieure à celle que l'on observe dans les échantillons de plasma EDTA. Les taux de Bb présents dans le plasma EDTA sont donc plus représentatifs de la concentration *in vivo*.

On prélèvera les échantillons de sérum ou de plasma EDTA de façon aseptique, selon les techniques standard. Doser immédiatement les échantillons ou bien les conserver à 4°C ou sur de la glace (4 heures maximum) jusqu'au dosage.

Pour une conservation plus longue, congeler sérums et plasmas à -70°C dans les 2 heures qui suivent le recueil.

Décongeler très rapidement les spécimens congelés ($\leq -70^\circ\text{C}$) dans un bain Marie à 37°C. Transférer immédiatement les spécimens tout juste décongelés sur de la glace (maximum 4 heures) afin d'empêcher l'activation du complément avant la dilution. **Ne pas laisser les échantillons à 37°C.** Ne pas décongeler les

échantillons à température ambiante ou à 4°C, ce qui pourrait entraîner une activation du complément. Doser les échantillons aussitôt que possible après la décongélation. Eviter les congélations/décongélation répétées. En cas d'analyses multiples, Quidel recommande de préparer plusieurs aliquotes de l'échantillon.

PROCÉDÉ DE L'ESSAI

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

Voir les paragraphes AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS et PRÉPARATION DES RÉACTIFS.

1. Noter les positions des puits correspondant aux Blancs, Echantillons, Standards et Contrôles, ainsi que les numéros de lot indiqués sur les étiquettes des flacons. Repérer un coin de la plaque.
2. Préparer les barrettes de la façon suivante.
 - a. A l'aide d'un système de lavage ou d'un laveur automatique, ajouter environ 300 µL de Solution de Lavage dans chaque puits. **REMARQUE : Pour un résultat optimal, ne pas utiliser de pipette multicanaux pour laver les barrettes de puits.**
 - b. Incuber les puits 1 minute à 15°C à 25°C.
 - c. Aspirer le contenu des puits.
 - d. Ajouter environ 300 µL de Solution de Lavage dans chaque puits.
 - e. Aspirer le contenu des puits.
 - f. **Répéter les étapes d-e encore une fois, on aura donc au total 3 lavages.**
 - g. Inverser la plaque en la tapotant fermement sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
3. Ajouter 100 µL de Diluant pour échantillon, de Standards et de Contrôles reconstitués, ou d'échantillons dilués dans les puits correspondants.
4. Incuber à 15°C à 25°C pendant 30 ± 1 minutes.
5. Laver les puits à 5 reprises:
 - a. Aspirer le contenu de chaque puits.
 - b. A l'aide d'un système de lavage ou d'un laveur automatique, ajouter environ 300 µL de Solution de Lavage dans chaque puits. **REMARQUE : Pour un résultat optimal, ne pas utiliser de pipette multicanaux pour laver les barrettes de puits.**
 - c. Incuber les puits 1 minute à 15°C à 25°C.
 - d. Aspirer le contenu des puits.
 - e. Ajouter environ 300 µL de Solution de Lavage dans chaque puits.
 - f. Aspirer le contenu des puits.
 - g. **Répéter les étapes e-f encore trois fois.**
 - h. Après le 5^{ème} lavage, inverser la plaque en la tapotant fermement sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
6. A l'aide d'une multipipette, ou d'une pipette automatique, pipeter 50 µL de Conjugué Bb Plus dans chaque puits, y compris ceux qui correspondent au Blanc.
7. Incuber les barrettes à 15°C à 25°C pendant 30 ± 1 minutes.
8. Laver les barrettes après l'incubation (étape 7) selon le procédé décrit à l'étape 5. **REMARQUE : Pour un résultat optimal, ne pas utiliser de pipette multicanaux pour laver les barrettes de puits.**
9. Aussitôt après le lavage, pipeter 100 µL de la Solution de Substrat TMB dans tous les puits, y compris ceux qui correspondent au Blanc. **REMARQUE : Le substrat TMB doit être protégé de la lumière pendant la conservation et l'incubation. Le substrat TMB ne doit pas être pipeté dans un réservoir à réactif ou un autre appareil susceptible de l'exposer à la lumière jusqu'à ce que l'on soit prêt le pipeter dans les barrettes de puits.**
10. Incuber les barrettes à 15°C à 25°C pendant 15 ± 1 minutes dans le noir.
11. Ajouter 100 µL de Solution d'Arrêt dans tous les puits pour arrêter la réaction enzymatique. Ajouter la Solution d'Arrêt dans le même ordre et avec la même vitesse que lors de l'addition de la Solution de Substrat.
12. Tapoter doucement la plaque sur la paille pour permettre un développement uniforme de la coloration.

13. Lire l'absorption à 450 nm dans l'heure qui suit l'addition de la Solution d'Arrêt, en faisant une correction pour le blanc en fonction du spectromètre utilisé.
14. Eliminer le reste des Echantillons dilués, Contrôles, Substrat et Barrettes utilisés (voir le paragraphe *ATTENTION*).

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le certificat d'Analyse inclus dans le kit est spécifique du lot et doit être utilisé pour vérifier si les résultats obtenus dans votre laboratoire sont semblables à ceux obtenus par Quidel Corporation. Les densités optiques sont mentionnées à titre indicatif seulement. Les résultats obtenus dans votre laboratoire peuvent être différents.

Des fourchettes de valeurs sont fournies pour les contrôles. Les valeurs de ces derniers servent à vérifier la validité de la courbe standard et des résultats obtenus pour les échantillons. Chaque laboratoire devrait établir ses propres critères d'acceptation. Si les valeurs des contrôles NE sont PAS dans les limites acceptables, il est préférable de refaire le dosage des échantillons.

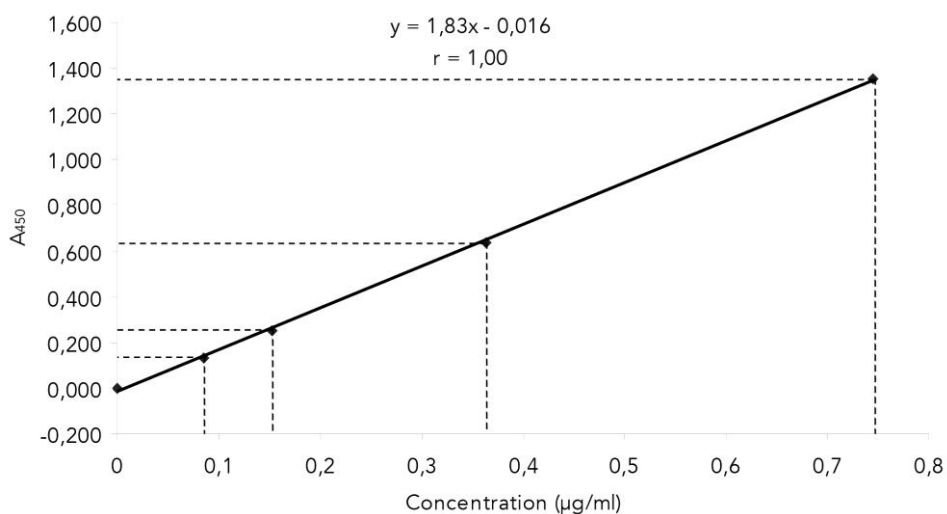
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Exemple de Courbe Standard

On trace la courbe standard du dosage EIA de Bb en plaçant sur l'axe des y les valeurs A_{450} de chaque Standard Bb Plus (dont on aura préalablement soustrait la valeur du blanc) et sur l'axe des x la concentration correspondante. Après avoir effectué une régression linéaire, la courbe standard doit répondre aux critères de validation (voir ci-dessous). La plupart des ordinateurs et des calculateurs peuvent effectuer ces calculs.

On peut également reporter manuellement ces données sur le graphe et déduire les concentrations correspondant aux échantillons ($\mu\text{g/ml}$) sur la courbe standard. On trouvera ci-dessous un exemple de courbe standard (Figure 1).

Figure 1.
Courbe Étalon Représentative



Calcul de la concentration de Bb des échantillons

La concentration de Bb dans chaque échantillon non dilué est calculée en multipliant la concentration en Bb/ml, déterminée à partir de la courbe standard, par le facteur de dilution utilisé pour l'échantillon.

Si la valeur obtenue à A_{450} d'un échantillon donné est supérieure à celle du Standard le plus élevé du kit (E), on rendra un résultat « supérieur à » la concentration du Standard le plus élevé du kit (E) multiplié par le

facteur de dilution de l'échantillon. Si on souhaite obtenir une valeur plus précise, on redosera l'échantillon en le diluant davantage. On devra également redoser les Standards et les Contrôles du kit Bb Plus.

VALIDATION

Déterminer la pente, l'interception et le coefficient de corrélation de la droite obtenue. Pour valider le dosage, les valeurs obtenues doivent être dans les fourchettes suivantes:

coefficient de Corrélation (r): > 0,96
pente (m): entre 1,094 et 2,558
interception avec l'axe des y (b): entre (-)0,145 et 0,113

Se référer au certificat d'analyse pour connaître la plage de concentration acceptable de Bb pour les contrôles haut et bas.

LIMITATIONS

On a utilisé le kit de dosage enzymatique MicroVue du Bb Plus pour doser des échantillons de sérum ou de plasma EDTA. NE PAS utiliser de plasma hépariné dans ce dosage. Les autres anticoagulants n'ont pas été testés.

CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

Limites

LD: La limite de détection (LD) pour le dosage de Bb Plus est de 0,018 µg/ml, calculée comme la limite supérieure obtenue pour 3DS dans une étude de précision réalisée à l'aide du standard zéro.

PPQM: La plus petite quantité mesurable (PPQM) du dosage de Bb Plus est de 0,033 µg/ml. C'est la plus petite concentration lue à partir de la courbe standard, en suivant les recommandations du NCCLS pour l'exactitude et la précision.

LQS: La limite de quantification supérieure (LQS), mesurable par le dosage de Bb Plus est de 0,836 µg/ml. C'est la plus forte concentration lue à partir de la courbe standard, en suivant les recommandations du NCCLS pour l'exactitude et la précision.

Substances Interférantes

L'héparine Na⁺ à 14 U/ml (concentration des tubes de prélèvement de plasma sur héparine) interfère avec le dosage de Bb Plus, il est donc recommandé de ne pas l'utiliser comme anticoagulant pour le prélèvement des échantillons.

On n'a pas observé d'interférences pour les substances suivantes, testées selon les concentrations indiquées.

Substance	Concentration
Bilirubine	40 mg/dl
Hémoglobine	500 mg/dl
Triglycérides	3000 mg/dl
Albumine	6000 mg/dl
Glucose	1200 mg/dl
Cholestérol	500 mg/dl

Précision

On a dosé à 20 reprises 2 échantillons de plasma EDTA et 2 échantillons de sérum (Précision intra essai) et on a dosé ces mêmes échantillons dans 10 dosages différents (Précision inter-essais).

Echantillon	Bb (µg/ml)	CV Intra-essai ¹ (%)	CV Inter-essais ² (%)
EDTA Plasma	1,550	2,4	7,7
	0,517	2,5	6,7
Sérum	2,129	3,1	6,2
	2,375	4,0	9,1

¹n = 20 répliques ²n = 10 dosages

Linéarité

On a évalué la linéarité en diluant en cascade des échantillons et en comparant les valeurs obtenues aux valeurs attendues. Les résultats sont présentés ci-dessous.

Echantillon	Facteur de Dilution	Observé Bb (µg/ml)	Attendu Bb (µg/ml)	Récupération (%)
EDTA Plasma	1:10	0,160	*	*
	1:16	0,107	0,100	106,9%
	1:20	0,079	0,080	98,7%
	1:32	0,052	0,050	103,9%
Sérum 1	1:20	0,161	*	*
	1:32	0,103	0,101	102,0%
	1:40	0,069	0,081	85,4%
	1:64	0,044	0,050	87,2%
Sérum 2	1:20	0,597	*	*
	1:25	0,467	0,478	97,7%
	1:30	0,420	0,398	105,4%
	1:40	0,310	0,299	103,8%
	1:50	0,230	0,239	96,2%
	1:60	0,196	0,199	98,4%
	1:80	0,133	0,149	89,0%

VALEURS OBSERVÉES

On a dosé 36 échantillons de plasmas EDTA et 49 sérums provenant de donneurs sains à l'aide du kit de dosage enzymatique MicroVue du fragment Bb Plus. Les résultats sont présentés ci-dessous:

	n	Moyenne (ug/ml)	Valeurs extremes (ug/ml)	
			± 2 SD	± 3 SD
EDTA Plasma	36	0,96	0,49-1,42	0,26-1,65
Sérum	49	3,53	0,80-6,26	0,0-7,62

REMARQUE: La moyenne et la déviation standard (DS) obtenues pour les concentrations du fragment Bb présent dans les échantillons de plasma et de sérum peuvent varier selon les laboratoires. Il est donc recommandé que chaque laboratoire détermine ses propres moyennes et déviations standard.

ASSISTANCE

Pour une commande ou une question technique, veuillez contacter votre distributeur local. Vous trouverez les informations sur Quidel, ses produits et ses distributeurs sur le site quidel.com.

RÉFÉRENCES

1. Schreiber, R.D. and Müller-Eberhard, H.J. 1980. New developments in the activation of the alternative pathway of complement. In: *Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980's*. Alan R. Liss, Inc., New York. p.411.
2. Gotze, O. and Müller-Eberhard, H.J. 1976. The alternative pathway of complement activation. *Adv. Immunol.* 24:1.
3. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1980. Current concepts in immunology: the alternative pathway of complement – a system for host resistance to microbial infection. *New Engl. J. Med.* 303: 259
4. Pangburn, M.K. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol* 7:163.
5. Ratnoff, W.E., Fearon, D.T., and Austen, K.F. 1983. The role of antibody in the activation of the alternative complement pathway. *Springer Semin Immunopathol* 6:361.
6. Hugli, T.E. 1986. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *Complement* 3:111
7. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1977. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 74:1 1683.
8. Fearon, D.T. 1979. Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 76: 5867.
9. Fishelson, Z. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. Residual hemolytic and proteolytic activity expressed by Bb after decay-dissociation of C3b,Bb. *J. Immunol.* 132:1425.
10. Gotze, O., Bianco, C. and Cohn, Z.A. 1979. The induction of macrophage spreading by Factor B of the properdin system. *J. Exe. Med.* 149:372.
11. Sundsmo, J.S. and Wood, L.M. 1981. Activated factor B(Bb) of the alternative pathway of complement activation cleaves and activates plasminogen. *J. Immunol.* 127:877.
12. Kolb, W.P., Morrow, P.R. and Tamerius, J.D. 1989. Ba and Bb Fragments of Factor B activation: Fragment production, biological activities, neoepitope expression and quantitation in clinical samples. *Complement and Inflammation* 6:175.
13. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
14. Sefton, M.V., et al. 1994. "Using ELISA to evaluate complement activation by reference biomaterials" *J. Mat. Sci* 5:622-627,.
15. Mold, C. Tamerius, J.D., et al. 1995 "Complement activation during painful crisis in sickle cell anemia" *Clinical Immunology and Immunopathology* 70:3,314-320.
16. Manzi, S. Rairie, J. et al. 1996 "Sensitivity and Specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity" *Arthritis and Rheumatism* 39(7)1178-1188.
17. J.Jarvis, Taylor, H. 1994. "Complement activation and immune complexes in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis: a longitudinal study" *J Rheumatology* 21(6) 1124-1127.
18. Aggarwaal, et al. 2000. "Evidence for activation of the alternative complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis" *Rheumatology* 39:189-192.
19. J. Buyon, Tamerius J. et al. 1992. "Assessment of Disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus" *Arthritis and Rheumatism* 35(9) 1028-1036.
20. D. Shaw, Rustagi, P. et al. 1997. "Effects of Synthetic Oligonucleotides on human complement and coagulation" *Biochemical Pharmacol* 53(8)1123-1132.
21. Mollnes. T.E., et al. 1999. "Complement activation in patients with systemic lupus erythematosus without nephritis" *Rheumatology* 38:933-940.
22. Sturfelt, G, Truedsson, L. 2005. "Complement and its breakdown products in SLE" *Rheumatology* 44:1227-1232.
23. Alexander, J.J. et al. 2005. "Complement-dependent apoptosis and inflammatory gene changes in murine lupus cebritis" *J. Immunology* 175:8312-8319.

24. Thurman, J., Holers, V.M. 2006. "The central role of the alternative pathway in human disease" *J. Immunology* 176:1305-1310.
25. Pawluczkwycz, A.W et al. 2007. "Hematin promotes complement alternative pathway-mediated deposition of C3 activation fragments on human erythrocytes: potential implications for the pathogenesis of anemia in malaria" *J. Immunology* 179:5543-5552.
26. Atkinson, C. et al. 2008. "Low-dose targeted complement inhibition protects against renal disease and other manifestations of autoimmune disease in MRL/lpr mice" *J. Immunology* 180:1231-1238.

REF A027 – MicroVue Bb Plus 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

PIA027003FR00 (09/21)

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
