

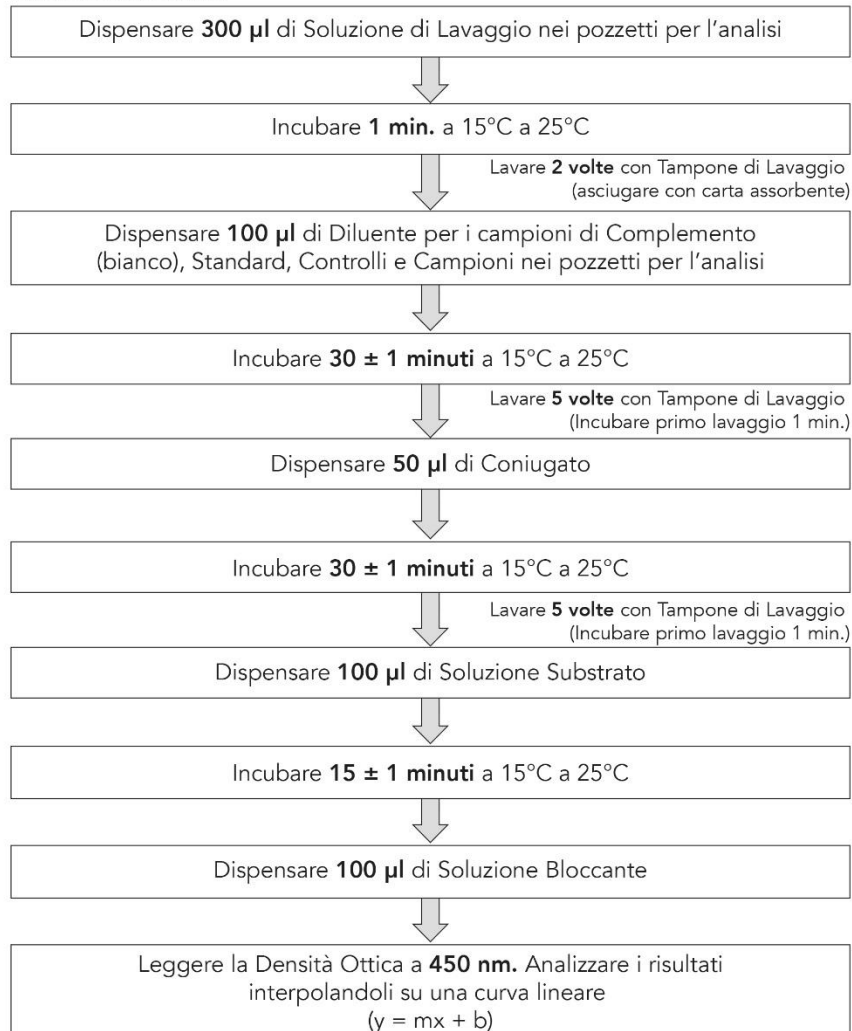
Dosaggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa del frammento Bb del Fattore B, un indicatore dell'attivazione della via alternativa del complemento nel plasma o siero umano

SOMMARIO

Preparazione di Reagenti, Standard, Controlli e campioni

- Diluire il Tampone di Lavaggio Concentrato 1:20 con acqua DI
- Ricostituire ogni Standard e Controllo con 1.0 ml di Agente Idratante (*lasciare agire 15 minuti e miscelare delicatamente prima di usare*)
- Diluire i campioni di plasma 1:10 con il Diluente per i campioni di Complemento (es. 50 µl + 450 µl) (*dispensare nei pozzetti entro 30 minuti*)
- Diluire i campioni di siero 1:20 con i campioni di complemento (es. 25 µl + 475 µl) (*dispensare nei pozzetti entro 30 minuti*)

Procedura di analisi





SCOPO DEL TEST

Il kit per il dosaggio immunoenzimatico MicroVue Bb Plus misura la quantità del frammento di complemento Bb, un fattore di attivazione del Fattore B della via alternativa del complemento, in campioni di siero e plasma umano. La misurazione del frammento di complemento Bb nel siero nel plasma umani fornisce prova del coinvolgimento della via alternativa del complemento. La determinazione dell'attivazione della via alternativa aiuta nella diagnosi di varie malattie renali, per esempio la glomerulonefrite cronica, la nefrite lupica e molte altre malattie del derma, come la dermatite erpetiforme ed il pemfigo volgare. Tra le altre malattie in cui è stata riscontrata l'attivazione della via alternativa del complemento si annoverano l'artrite reumatoide, l'anemia falciforme, e le infezioni da batteri gram-negativi.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

La via alternativa del complemento fornisce una protezione congenita contro gli agenti microbici in assenza di anticorpo specifico.¹⁻⁵ Vi sono varie sostanze che innescano l'attivazione della via del complemento, tra cui i polisaccaridi microbici o i lipidi, i lipopolisaccaridi batterici gram-negativi, ed i determinanti di superficie presenti su alcuni virus, parassiti, cellule di mammiferi con infezione virale e cellule cancerose. Nelle malattie autoimmuni, la via alternativa del complemento può contribuire direttamente al danneggiamento tissutale.

Una reazione di importanza fondamentale che si verifica durante l'attivazione della via alternativa è la conversione dello zimogeno Fattore B del peso molecolare 93 Kd in un enzima proteolitico attivo. Ciò viene conseguito tramite una reazione a due fasi. Durante la prima fase di reazione il Fattore B forma un complesso magnesio dipendente con il fattore C3(H₂O) o C3b.⁴ Il complesso C3(H₂O),B si forma solo nella fase fluida mentre il complesso C3b,B può formarsi nella fase liquida o su una superficie target.¹⁻⁴ Il Fattore B, che è presente nel complesso C3(H₂O),B o C3b,B viene scisso nei frammenti Ba (33 Kd) e Bb (60 Kd) nella seconda fase della reazione dall'enzima della via alternativa, il Fattore Factor D.¹⁻⁴ Il complesso biomolecolare risultante C3b, Bb è l'enzima C3 convertasi della via alternativa. La sottounità Bb è il sito cataliticamente attivo del complesso che è in grado di scindere il fattore C3 nei frammenti C3a e C3b.^{1-4,6} I frammenti C3b aggiuntivi prodotti in tal modo possono formare il complesso trimolecolare C3b,Bb,C3b che è l'enzima C5 convertasi della via alternativa. L'enzima C5 convertasi è in grado di scindere il fattore C5 nei frammenti C5a e C5b.^{1-4,6}

Le C3 e C5 convertasi della via alternativa possono essere stabilizzate dal Fattore P (chiamato anche Properdina), un componente della via alternativa normalmente presente nel plasma o siero umani¹⁻⁴ o dal fattore nefritico C3, un autoanticorpo prodotto in alcuni pazienti soggetti ad attivazione massiccia della via alternativa.⁵ Le C3 e C5 convertasi della via alternativa possono essere dissociate, e quindi disattivate, tramite dissociazione con decadimento spontaneo,⁷ o tramite il legame del Fattore H o Recettore del Complemento 1 (CR1).^{4,8} Il frammento Bb che viene dissociato da una delle convertasi conserva alcune attività biologiche, per esempio la l'attività emolitica funzionale,^{4,9} la capacità di indurre la diffusione dei macrofagi¹⁰ e l'attivazione del plasminogeno.¹¹

Benché si ritenga che l'attivazione della via alternativa avvenga principalmente in assenza di anticorpo specifico, si verificano molte situazioni in cui l'attivazione della via alternativa avviene come conseguenza dell'attivazione della via classica. Per esempio, i complessi immuni che sono presenti nei pazienti affetti da malattie autoimmuni possono far scattare l'attivazione della via classica del complemento con la risultante produzione di frammenti C3b. Come descritto sopra, queste molecole C3b sono in grado di legare il Fattore B ed iniziare il suo clivaggio nei frammenti Ba e Bb. In questo modo l'attivazione della via alternativa può avvenire in stati di malattia autoimmune anticorpo mediata e può contribuire significativamente al potenziamento dell'attivazione del complemento e alla concomitante distruzione tissutale.

Determinando i prodotti del clivaggio del Fattore B nei campioni di test, è possibile stimare l'entità dell'utilizzo della via alternativa in corso al momento della raccolta del campione nello stato patologico in esame. L'immunosaggio enzimatico (EIA) MicroVue Bb Plus fornisce una procedura semplice, rapida, non-radioattiva, altamente specifica e quantitativa per misurare l'attivazione del Fattore B. È ideale per ricerche concernenti il ruolo o status della via alternativa del complemento in numerosi setting di ricerca e clinici, e per monitorare la generazione del frammento di complemento Bb *in vitro*.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il saggio immunoenzimatico (EIA) MicroVue Bb Plus per la quantificazione del frammento di complemento Bb nel siero e plasma umani o altri campioni è una procedura in tre fasi che utilizza (1) una micro piastra rivestita di anticorpo monoclonale di topo che si lega specificatamente al frammento di complemento Bb umano, (2) un anticorpo di topo anti-frammento di complemento Bb umano HRP-coniugato, e (3) un substrato cromogeno.

Nella prima fase, gli Standard, i Controlli ed i campioni di test vengono aggiunti ai micropozzetti rivestiti con un anticorpo monoclonale specifico anti-Bb. Il frammento di complemento Bb, ma non il Fattore B od altri prodotti dell'attivazione del complemento, presente negli Standard, Controlli, o campioni si legherà all'anticorpo monoclonale immobilizzato anti-Bb. Dopo l'incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove il materiale che non si è legato.

Nella seconda fase, viene aggiunto un anticorpo di topo anti-frammento del complemento Bb HRP-coniugato (rafano perossidasi) ad ogni pozzetto di test. L'anti-Bb enzima coniugato con enzima si lega al frammento di complemento Bb catturato nei micropozzetti. Dopo l'incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove il coniugato in eccesso che non si è legato.

Nella terza fase viene aggiunto un substrato enzimatico cromogeno ad ogni micropozzetto. L'HRP immobilizzato reagisce con il substrato, sviluppando una colorazione azzurra. Dopo l'incubazione la reazione enzimatica viene fermata chimicamente, il colore vira al giallo, e l'intensità del colore viene misurata spettrofotometricamente a 450 nm. L'intensità del colore della miscela di reazione è proporzionale alla concentrazione di frammento del complemento Bb presente nei campioni, negli Standard e nei Controlli.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

96 test per la determinazione del il frammento Bb del Fattore B

Il kit per dosaggio immunoenzimatico MicroVue Bb Plus contiene:

- | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------|
| A Bb Plus Standard | Codici A9948-A9952 | 1 ml ciascuno |
| B (liofilizzato) Ciascuno contiene una concentrazione nota di Bb in siero umano diluita in PBS, | | |
| C stabilizzatori proteici, 0,035% ProClin® 300 | | |
| D | | |
| E | | |
| L Bb Plus Controllo Basso | Codice A9953 | 1 ml |
| (liofilizzato). Contiene una concentrazione nota di Bb in siero umano diluita in PBS, stabilizzatori proteici, 0,035% ProClin 300 | | |
| H Bb Plus Controllo Alto | Codice A9955 | 1 ml |
| (liofilizzato) Contiene una concentrazione nota di Bb in siero umano diluita in PBS, stabilizzatori proteici, 0,035% ProClin 300 | | |
| ① Micropiastra | Codice A9559 | 12 x 8 pozzetti |
| 12 strisce da 8 pozzetti rivestiti con un anticorpo monoclonale di topo purificato specifico per il frammento Bb umano in Busta di alluminio risigillabile | | |

2	Soluzione Bloccante Contiene 1N acido cloridrico	Codice A9947	12 ml
3	20X Soluzione di Lavaggio Concentrato Contiene soluzione salina tampone fosfato (PBS), 1,0% Tween-20®, e 0,035% ProClin 300	Codice A9957	50 ml
4	Diluente per Campioni di Complemento Contiene PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% stabilizzatori proteici, 0,035% ProClin 300	Codice A3670	50 ml
5	TMB Substrato Contiene 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) e Perossido di Idrogeno (H ₂ O ₂)	Codice 5059	12 ml
6	Bb Plus Coniugato Contiene anticorpo di topo anti- Bb umano coniugato con rafano perossidasi in tampone stabilizzante HRP con conservante	Codice A9956	7 ml
8	Reagente reidratante Contiene 0,035% ProClin 300	Codice A3675	25 ml

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

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Timer (da 60 minuti)
- Calcolatore o altro metodo computazionale
- Micropiastre pulite e non usate e/o provette e portaprovette
- Contenitore per la diluizione del tampone di lavaggio
- Flacone di lavaggio o altro sistema di lavaggio per micropiastre
- Pipetta multicanale regolabile (8 o 12 canali) o micropipette a ripetizione (facoltativo)
- Pipette pulite da 1 ml, 5 ml, e 10 ml
- Micropipette e puntali
- Lettore di micro piastre in grado di effettuare letture di densità ottica tra 0,0 e 2,0
- Acqua deionizzata o distillata

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per r uso diagnostico *In vitro*.
- L'uso di plasma eparina in questo saggio può dare risultati errati.
- Trattare i campioni come materiale potenzialmente bio-pericoloso. Seguire le Precauzioni Universali durante la manipolazione del contenuto di questo kit e di qualsiasi campione di pazienti.
- Non mescolare reagenti di lotti diversi ed utilizzare i reagenti forniti prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.
- Conservare i reagenti come indicato.
- Non usare le strisce rivestite se la busta è forata.
- Durante l'aggiunta o aspirazione di liquidi dai micropozzetti, non raschiare o toccare il fondo dei pozzetti.
- Usare tempi e temperature di incubazione diversi da quanto indicato nel paragrafo Procedura può causare risultati errati.
- Non fare asciugare i micropozzetti durante l'analisi.
- Non usare un micropozzetto per più di un test.
- Si raccomanda l'uso di pipette multicanale o pipette a ripetizione per assicurare la dispensazione tempestiva dei reagenti.
- Per una misurazione accurata dei campioni, aggiungere campioni e standard in modo preciso. Dispensare con cautela usando solo strumentazione calibrata.
- La raccolta e conservazione adeguate dei campioni di test sono essenziali per risultati accurati (cfr. *RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI*, pag 4).

- Evitare la contaminazione microbica o crociata di campioni, reagenti o materiali poiché può causare risultati errati.
- Ogni campione da donatore utilizzato nella preparazione degli Standards e dei sieri di Controllo è stato testato tramite un metodo approvato dalla FDA per rilevare l'eventuale presenza di anticorpo al virus di immunodeficienza acquisita umana (HIV 1 and 2) e del virus dell'epatite C, oltre all'antigene superficiale dell'epatite B, con risultati negativi (assenza di reazione ripetuta). Tuttavia, poiché nessun metodo di test può garantire completamente l'assenza di agenti infettivi, questi reagenti dovrebbero venire manipolati al Livello di Biosicurezza 2 come raccomandato per qualsiasi campione umano di siero o sangue nel manuale dei Centers for Disease Control/National Institutes of Health intitolato "Biosafety in Micro-biological and Biomedical Laboratories" 2007.
- Il ProClin 300 viene usato come conservante. Il contatto accidentale o l'ingestione di tamponi o reagenti contenenti ProClin può causare irritazione cutanea, oculare o orale. Usare le buone pratiche di laboratorio per ridurre l'esposizione. Rivolgersi ad un medico in caso di sintomi.
- Il Substrato concentrato è sensibile alla luce. Evitare l'esposizione prolungata alla luce forte o diretta. Conservare i reagenti al buio quando non vengono utilizzati.
- Per evitare la formazione di gas durante il lavaggio, usare un apparato per aspirare il fluido di lavaggio in un flacone contenente candeggina domestica.
- Dei campioni inattivati a caldo, iperlipemici o contaminati possono fornire risultati errati.
- **Utilizzare una spruzzetta per lavare la piastra. Per ottenere i risultati migliori, non utilizzare una pipetta multicanale per lavare la micropiastra.**
- I test devono essere effettuati in un'area dotata di ventilazione adeguata.
- Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con la normativa nazionale e locale in vigore.
- Indossare indumenti protettivi, guanti, e protezione occhio/viso durante l'utilizzo del kit.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo la manipolazione.
- Per ulteriori informazioni su simboli di pericolo, sicurezza, manipolazione e smaltimento dei componenti di questo kit, consultare la scheda di sicurezza (SDS) reperibile su quidel.com.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti e materiali a 15°C a 25°C prima dell'uso.

Dopo aver prelevato i reagenti ed i materiali necessari, riporre quanto inutilizzato alla temperatura adeguata (cfr. *CONSERVAZIONE*).

Strisce Rivestite

Determinare il numero di strisce necessarie per l'analisi. Alloggiare le strisce da utilizzare nella micropiastra. Rimettere le strisce non necessarie nella busta richiudibile, sigillarla e conservare a 2°C a 8°C.

Soluzione di Lavaggio

Preparare la soluzione di lavaggio per il lavaggio dei micropozzetti diluendo 50 ml di soluzione di lavaggio concentrata 20X fino a raggiungere una volume finale di un litro con acqua distillata o deionizzata. Miscelare accuratamente prima dell'uso. La soluzione di lavaggio è stabile per 30 giorni se conservata in un contenitore pulito a 2°C a 8°C. Se si riscontra torbidità gettare il reagente.

Ricostituzione Standard e Controllo Bb Plus

Aggiungere 1,0 ml di reagente reidratante ad ogni fiala di Standard (A-E), al Controllo basso e al Controllo alto. Far reidratare le fiale ricostituite per almeno 15 minuti a temperatura ambiente. Miscelare accuratamente. Evitare la formazione di schiuma o bolle durante la miscelazione. Gli standard ed i controlli ricostituiti sono stabili per 30 giorni se conservati a 2°C a 8°C.

Diluizione del Campione

Attenzione: Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Non usare campioni inattivati a caldo o contaminati.

Nell'esecuzione del dosaggio si raccomanda di diluire i campioni di plasma 1:10 nel diluente per campioni. Si raccomanda di diluire i campioni di siero 1:20 in diluente per campioni. Una volta diluiti, i campioni devono essere aggiunti nei micropozzetti entro 30 minuti. Non conservare o riutilizzare i campioni diluiti. Gettare eventuali campioni avanzati.

I campioni con livelli elevati di attivazione del complemento potrebbero necessitare di diluizioni del campione maggiore rispetto a quanto indicato.

Dispensazione dei campioni diluiti nei pozzetti di microtitolazione

Può essere usato uno dei due metodi per la dispensazione di campioni diluiti, Standards, Controlli e tamponi nei pozzetti (cfr. Fase 3 della *PROCEDURA DI SAGGIO*). Per corse analitiche ridotte in cui vengono testati solo alcuni campioni, i campioni diluiti ed altri reagenti possono essere dispensati direttamente ai rispettivi pozzetti tramite micropipetta (100 µL/pozzetto). Differentemente, raccomandiamo l'uso di una pipetta multicanale per dispensare i campioni come segue. **(E' possibile usare una pipetta multicanale per dispensare comodamente anche il coniugato, il substrato e la soluzione bloccante).**

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

CONSERVAZIONE

Conservare il kit non aperto a 2°C a 8°C. Dopo aver aperto il kit, la Soluzione di lavaggio concentrata 20X ed il reagente di reidratazione possono essere conservati a 2°C a 25°C.

Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (15°C a 25°C) prima dell'uso. Riporre tutte le strisce inutilizzate nella busta richiudibile, risigillarla e conservare a 2°C a 8°C.

INDICAZIONI DI INSTABILITA' O DETERIORAMENTO DEI REAGENTI

La torbidità della soluzione di lavaggio indica un deterioramento di questo reagente. Se ciò si verificasse, gettare la soluzione.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Manipolare e smaltire tutti i campioni seguendo le precauzioni universali.

È essenziale eseguire correttamente le operazioni di prelievo e conservazione dei campioni in quanto il fattore Bb è suscettibile alla proteolisi nei campioni raccolti o conservati inadeguatamente.

A causa dell'attivazione del complemento durante la coagulazione, la concentrazione di Bb nei campioni di siero umano normale saranno superiori a quelli ottenuti con campioni di plasma EDTA. I livelli di Bb nel plasma possono quindi rappresentare in modo più accurato le concentrazioni *in vivo*.

Il campione di siero o plasma EDTA devono essere prelevati in modo asettico utilizzando tecniche standard. I campioni devono essere esaminati immediatamente oppure conservati a 4 °C o nel ghiaccio fino al momento dell'analisi, per un periodo comunque non superiore a quattro ore.

Per una conservazione più prolungata, il siero o il plasma devono essere congelati a -70°C o meno entro due ore dalla raccolta.

Scongelare rapidamente i campioni congelati ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) a bagnomaria a 37°C fino a che non risultano quasi scongelati. Trasferire immediatamente i campioni scongelati in ghiaccio (per non più di quattro ore) in modo da evitare l'attivazione del complemento prima della diluizione. **Non lasciare i campioni a 37°C .** Non scongelare i campioni a temperatura ambiente o a 4°C , in quanto ciò potrebbe causare l'attivazione del complemento. Dopo lo scongelamento, i campioni devono essere esaminati nel più breve tempo possibile. Non è consigliato eseguire ripetuti congelamenti e scongelamenti. Se è necessario ricongelare i campioni per ulteriori analisi, Quidel suggerisce di congelare diverse aliquote del campione, al fine di evitare più cicli di congelamento/scongelo.

PROCEDURA DI L'ANALISI

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

Fare riferimento alle sezioni PREPARAZIONE DEI REAGENTI e AVVERTENZE E PRECAUZIONI.

1. Registrare le posizioni dei micropozzetti corrispondenti al/i pozzetto/i vuoto/i, tutti i campioni da testare, gli standard ed i controlli nonché i numeri di lotto indicati sulle etichette delle fiale. Etichettare un angolo della micropiastra al fine di stabilirne l'orientamento.
2. Preparare le strisce come indicato di seguito:
 - a. Usando un flacone di lavaggio o un dispositivo di lavaggio automatico delle piastre dispensare circa $300\ \mu\text{L}$ di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto. **NOTA: per ottenere i risultati migliori, non utilizzare una pipetta multicanale per lavare la micropiastra.**
 - b. Incubare i pozzetti per un minuto a 15°C a 25°C .
 - c. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto.
 - d. Aggiungere circa $300\ \mu\text{L}$ di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto.
 - e. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto.
 - f. Ripetere i passaggi d-e un'altra volta, per un totale di tre lavaggi.**
 - g. Capovolgere la piastra e picchiettare energicamente su carta assorbente per rimuovere eventuale liquido rimasto.
3. Aggiungere $100\ \mu\text{L}$ di diluente per campioni, standard ricostituiti, controlli o campioni diluiti nei relativi pozzetti.
4. Incubare a 15°C a 25°C per 30 ± 1 minuti.
5. Lavare i micropozzetti un totale di 5 volte seguendo questa procedura:
 - a. Aspirare il contenuto da ogni pozzetto.
 - b. Usando un flacone di lavaggio o un dispositivo di lavaggio per micropiastre dispensare circa $300\ \mu\text{L}$ di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto. **NOTA: per ottenere i risultati migliori, non utilizzare una pipetta multicanale per lavare la micropiastra.**
 - c. Incubare i pozzetti per 1 minuto a 15°C a 25°C .
 - d. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto.
 - e. Aggiungere circa $300\ \mu\text{L}$ di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto.
 - f. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto
 - g. Ripetere i passaggi e-f altre tre volte.**
 - h. Dopo il quinto ciclo di lavaggio, capovolgere la piastra e picchiettare energicamente su carta assorbente per rimuovere l'eventuale liquido rimasto.
6. Usando una pipetta multicanale o a ripetizione, dispensare $50\ \mu\text{L}$ di coniugato Bb in ogni pozzetto di test lavato, incluso/i il/i pozzetto/i vuoto/i .
7. Incubare le strisce a 15°C a 25°C per 30 ± 1 minuti.
8. Lavare i micropozzetti dopo l'incubazione di 30 minuti (passaggio 7), come descritto nella *PROCEDURA DI ANALISI*, passaggio 5. **NOTA: per ottenere i risultati migliori, non utilizzare una pipetta multicanale per lavare la micropiastra.**
9. Immediatamente dopo la procedura di lavaggio dispensare $100\ \mu\text{L}$ della soluzione per substrato TMB in ogni pozzetto, incluso/i il/i pozzetto/i vuoto/i. **NOTA: il substrato TMB deve essere protetto dalla**

luce durante la conservazione e l'incubazione. Il substrato TMB non deve essere dispensato in un serbatoio per reagenti o altri apparati potenzialmente esposti alla luce fino al momento di dispensarlo nei micropozzetti.

10. Incubare le strisce a 15°C a 25°C per 15 ± 1 minuti al buio.
11. Aggiungere 100 µL di soluzione bloccante ad ogni pozzo per bloccare la reazione enzimatica. La soluzione bloccante dovrebbe essere aggiunta ai pozzetti nello stesso ordine rispetto alla soluzione substrato.
12. Picchiettare delicatamente la piastra sulla parte superiore del banco per permettere alla colorazione di svilupparsi uniformemente.
13. Leggere l'assorbanza a 450 nm entro un'ora dall'aggiunta di soluzione bloccante (passaggio 11), effettuando le dovute correzioni secondo il sistema spettrofotometrico in uso.
14. Gettare i campioni diluiti, i controlli, il substrato e le strisce rimanenti (cfr **AVVERTENZE E PRECAUZIONI**).

CONTROLLO QUALITÀ

Il Certificato di Analisi fornito con questo kit è specifico per ciascun lotto e deve essere usato per verificare che i risultati ottenuti dal proprio laboratorio siano simili a quelli ottenuti presso Quidel Corporation. I valori di densità ottica forniti sono solo linee guida. I risultati ottenuti dal vostro laboratorio possono differire.

Vengono forniti i valori dei controlli. I valori dei controlli devono essere utilizzati per verificare la validità della curva e i risultati del campione. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca i propri parametri di riferimento limiti di accettazione del saggio. Se i valori dei controlli NON sono all'interno dei parametri stabiliti dal proprio laboratorio, i risultati dell'analisi devono essere considerati discutibili e si dovranno replicare i campioni. Una buona pratica di laboratorio consiglia l'uso di controlli per garantire l'esecuzione adeguata dell'analisi.

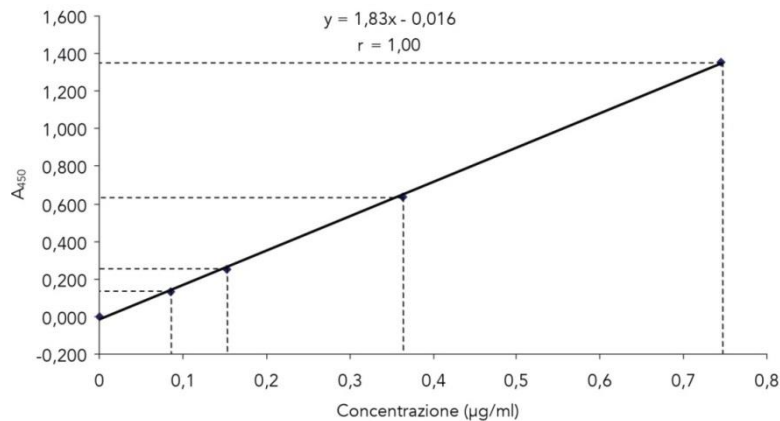
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Uso della curva standard

La curva standard per il saggio immunoenzimatico Bb viene generata interpolando i valori A_{450} da cui sono stati sottratti a quelli del bianco di ogni standard (lungo l'asse y) e la concentrazione di ciascuno standard (lungo l'asse x). Al termine della regressione lineare, la curva standard generata deve soddisfare i requisiti di convalida (vedere di seguito). La maggior parte dei computer e delle calcolatrici è in grado di eseguire tali calcoli.

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

Figura 1.
Curva standard rappresentativa



Calcolo della concentrazione Bb effettiva in campioni di test

La concentrazione effettiva di Bb in ogni campione diluito viene determinata moltiplicando la concentrazione Bb/ml, determinata dalla curva standard del kit, per il reciproco del fattore della diluizione del campione utilizzato.

Se i valori A₄₅₀ per un dato campione sono maggiori di quello dello standard più alto di Bb (E), i risultati devono essere riportati come “maggiori della” concentrazione Bb dello standard più alto (E) moltiplicato per il fattore di diluizione del campione. Se è necessario un valore di concentrazione di Bb più accurato, il campione deve essere ri-analizzato usando un fattore di diluizione maggiore. In tutte le replicazioni è necessario eseguire anche gli standard ed i controlli del kit Bb.

CONVALIDA

Determinare la pendenza, l'intersezione e il coefficiente di correlazione della linea best-fit ottenuta. I valori devono essere compresi negli intervalli specificati:

coefficiente di correlazione (r): > 0,96
pendenza (m): tra 1,094 e 2,558
intersezione y (b): tra (-)0,145 e 0,113

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

LIMITI

Il dosaggio immunoenzimatico per la determinazione del frammento Bb prodotto da Quidel è stato utilizzato per esaminare campioni di siero o plasma EDTA. Il plasma eparina NON è adatto per questo dosaggio. Altri anticoagulanti non sono stati testati.

PRESTAZIONI DEL TEST

Limiti

LOD: il limite di rilevamento (LOD) del saggio Bb Plus è 0,018 µg/ml, determinato dalle 3 deviazioni standard più alte in uno studio su standard zero.

LLOQ: Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) per il saggio Bb Plus è 0,033 µg/ml, la concentrazione minore sulla curva standard che ha soddisfatto i criteri NCCLS di accuratezza e precisione.

ULOQ: Il limite superiore di quantificazione (ULOQ) per il saggio è 0,836 µg/ml, la concentrazione maggiore sulla curva standard che ha soddisfatto i criteri NCCLS di accuratezza e precisione.

Sostanze interferenti

Na⁺ eparina a 14 U/ml (la concentrazione coerente con le provette di raccolta del plasma eparina) interferisce con il saggio Bb Plus e pertanto non è consigliato l'uso di campioni plasma con anticoagulante.

Le seguenti sostanze sono state testate alle concentrazioni specificate e non hanno mostrato interferenze con il dosaggio:

Sostanza	Concentrazione
Bilirubina	40 mg/dl
Emoglobina	500 mg/dl
Trigliceridi	3000 mg/dl
Albumina	6000 mg/dl
Glucosio	1200 mg/dl
Colesterolo	500 mg/dl

Precisione

La precisione all'interno di una corsa e tra diverse corse è stata determinata esaminando 20 replicati di 2 campioni di plasma e 2 campioni di siero in 10 diverse corse.

Campione	Bb (µg/ml)	In una stessa corsa ¹ C.V. (%)	Tra diverse corse ² C.V. (%)
EDTA Plasma	1,550	2,4	7,7
	0,517	2,5	6,7
Siero	2,129	3,1	6,2
	2,375	4,0	9,1

¹n = 20 replicati ²n = 10 corse

Linearità

La linearità è stata valutata con diluizioni seriali confrontando i valori riscontrati con i valori attesi. Nella seguente tabella vengono forniti i risultati tipici.

Campione	Fattore di diluizione	Riscontrato Bb (µg/ml)	Atteso Bb (µg/ml)	Recupero (%)
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%
Siero 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%
Siero 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%

VALORI DEI CAMPIONI

Trentasei (36) campioni di plasma EDTA e quarantanove (49) campioni di siero da donatori normali sono stati testati con il dosaggio immunoenzimatico per la determinazione del frammento Bb Plus.

	n	Media (µg/mL)	RANGE (µg/mL)	
			± 2 SD	± 3 SD
EDTA Plasma	36	0,96	0,49 e 1,42	0,26 e 1,65
Siero	49	3,53	0,80 e 6,26	0,0 e 7,62

NOTA: poiché il comportamento della deviazione media e Standard (DS) delle concentrazioni del frammento Bb determinate nei campioni di plasma o siero possono variare da laboratorio a laboratorio, è consigliabile che ogni laboratorio determini la concentrazione di frammento Bb media ed i valori di deviazione standard per i campioni.

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.

BIBLIOGRAFIA

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. Pawluczkowycz, 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

PIA027003IT00 (09/21)

GLOSSARIO

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



Rischio biologico

IVD

Per uso diagnostico *In Vitro*



Contenuto sufficiente per 96 determinazioni

CONT

Contenuto / Contiene

CONTROL

Controllo
