

Essai immunoenzymatique portant sur la quantification du complexe SC5b-9 présent dans le sérum ou le plasma humain

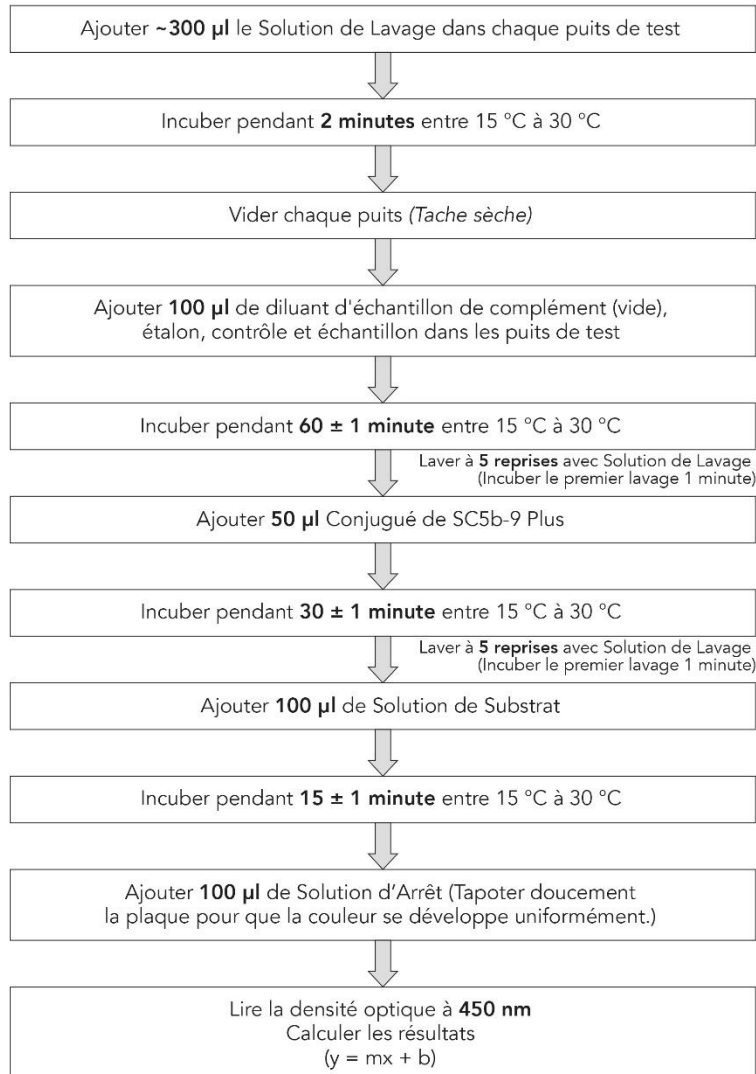
À des fins de diagnostic *in vitro* uniquement. Réservé à l'export.
Non destiné à la vente aux États-Unis ou au Canada.

RÉSUMÉ

Préparation de réactif et d'échantillon

- Diluer Concentré de Solution de Lavage 1:20 avec de l'eau désionisée.
- Diluer les échantillons sériques 1:40 avec le diluant d'échantillon (e.g. 10 µl + 390 µl).
- Diluer les échantillons de plasma 1:10 avec le diluant d'échantillon (e.g. 50 µl + 450 µl).

Procédure de l'essai





APPLICATION

L'essai immunoenzymatique MicroVue SC5b 9 Plus permet de mesurer les quantités de complexes SC5b-9 présents dans les prélèvements plasmatiques ou sériques humains.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le complexe terminal du complément (TCC SC5b-9) est généré par assemblage des C5 à C9 résultant de l'activation du système du complément par la lectine classique ou par une autre voie.¹ Le complexe d'attaque membranaire (MAC), qui est une forme de TCC, est un complexe stable qui intervient dans la détérioration irréversible de la membrane de la cellule cible liée à l'activation du complément.¹⁻⁴ Les complexes formés en l'absence d'une membrane cible se lient à une protéine sérique régulateur naturellement présente, p.ex. la protéine S.⁵⁻⁷ au stade de la formation du C5b-7 soluble, non lytique du TCC.^{1,5} Pour les fins de ce document, nous désignons toutes les formes de ce complexe terminal du complément sous le terme interchangeable de TCC et SC5b-9, reconnaissant que les autres protéines régulateurs du complément, telles que la clusterine, forment également partie de ces complexes stables et sont détectables lors de l'essai du SC5b-9 Plus.

L'essai immunoenzymatique MicroVue SC5b 9 Plus permet de mesurer la concentration de TCC, fournissant ainsi une indication sur le statut de la voie du complément terminal dans l'échantillon. Le test recourt à un anticorps monoclonal sur l'anneau C9 du TCC pour capturer le complexe. Le TCC piégé est ensuite détecté à l'aide d'anticorps conjugués à de la HRP qui se lient aux antigènes du complexe SC5b-9. Ce test, qui propose une procédure rapide, fortement spécifique et quantitative de mesure des taux de TCC, est conçu pour les études de recherche portant sur le rôle ou statut de l'activation de la voie terminale du complément, menées dans le cadre de nombreux environnements de recherche, ainsi que pour la surveillance de la production des complexes SC5b-9 *in vitro* ou *in vivo*. Des niveaux élevés d'activation du complément ont été observés dans plusieurs états pathologiques dont le lupus érythémateux disséminé et d'autres maladies auto-immunes, la polyarthrite rhumatoïde, la détresse respiratoire aiguë et dans d'autres maladies inflammatoires comme l'infarctus du myocarde et la crise cardiaque.

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

L'essai immunoenzymatique MicroVue SC5b-9 Plus destiné à la quantification du SC5b-9 dans le sérum, le plasma humain ou les échantillons expérimentaux est une procédure à trois étapes utilisant (1) une microplaque enduite d'un anticorps monoclonal de souris qui se lie de façon spécifique à l'anneau C9 du SC5b-9, (2) des anticorps conjugués à la HRP dirigés contre les antigènes du SC5b-9 et (3) un substrat chromogène.

La première étape consiste à ajouter les étalons, les contrôles et les échantillons à analyser dans les micropuits pré-enduits d'un anticorps monoclonal anti-SC5b-9 spécifique. Le SC5b-9 présent dans les étalons, les contrôles ou les prélèvements se lie à l'anti-SC5b-9 immobilisé. Après incubation, les matériaux non liés sont éliminés au cours d'un cycle de lavage. Les protéines constitutives du TCC, y compris la C9, ne se lient pas à cet anticorps et sont éliminées au cours du cycle de lavage.

Lors de la deuxième étape, des anticorps conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) et dirigés contre les antigènes du SC5b-9 sont ajoutés dans chaque puits de test. Les anticorps conjugués aux enzymes se lient au SC5b-9 qui a été capturé par l'anti-SC5b-9 monoclonal fixé à la surface des micropuits. Après incubation, le conjugué non lié est éliminé au cours d'un cycle de lavage.

Au cours de la troisième étape, un substrat enzymatique chromogène est ajouté dans chaque micropuits. La réaction de la HRP et du conjugué liés avec le substrat se traduit par une coloration bleue. Après incubation, on ajoute un réactif pour bloquer le développement de la coloration, ce qui produit une coloration jaune. L'absorbance des étalons, des contrôles et des échantillons à analyser (valeurs A_{450}) est

mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'intensité de la coloration du mélange est proportionnelle à la concentration en SC5b-9 (TCC) dans les échantillons, étalons et contrôles à analyser.

RÉACTIFS ET MATÉRIAUX FOURNIS

96 essais de dosage du complexe SC5b-9

Le kit d'essai immunoenzymatique MicroVue SC5b-9 Plus contient les composants suivants:

A	Étalons de SC5b-9 Plus	Articles A9958-62	5 x 1,5 ml
B	Contient du sérum humain comportant des quantités connues de SC5b-9 dans du PBS, des		
C	stabilisants protéiques, des conservateurs		
D			
E			
H	Contrôles haut/bas	Articles A9581, A9582	2 X 1,5 ml
L	Contient du plasma humain comportant un taux haut/bas de complexes SC5b-9, des conservateurs		
1	Plaques enduites	Article A3840	Je 12
	Plaques de huit puits enduits d'un anticorps monoclonal de souris spécifique du SC5b-9 humain dans une pochette d'aluminium refermable		
2	Solution d'arrêt	Article 4978	12 ml
	Contient 2N H ₂ SO ₄		
3	Concentré de solution de lavage 20 X	Article A9957	2 x 50 ml
	Contient une solution saline de tampon phosphate (PBS), 0,05 % de Tween-20® et Proclin® 300		
4	Diluant d'échantillon	Article A3670	50 ml
	Contient de la PBS, 0,05 % de stabilisants protéiques Tween-20, 0,035 % de ProClin 300		
5	Substrat de TMB	Article A9946	12 ml
	Substrat de peroxyde et de 3,3',5,5'- tétraméthyle benzidine (TMB) prêt à l'emploi		
6	Conjugué SC5b-9 Plus	Article A9577	7 ml
	Contient des anticorps (de chèvre) conjugués à la peroxydase de raifort et dirigés contre les antigènes du SC5b-9		

Tween-20® est une marque déposée de ICI Americas Inc.

ProClin® est une marque déposée de Rohm and Haas Company.

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES NON FOURNIS

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

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- À des fins de diagnostic *in vitro*.
- Traiter les échantillons comme du matériel potentiellement contaminant. Suivre les précautions standards lors de la manipulation du contenu de ce kit et de tous les échantillons de patients.

- Utiliser les réactifs fournis d'un seul kit avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Stocker les réactifs de l'essai conformément aux indications.
- Ne pas utiliser les plaques enduites si la pochette est percée.
- Le ProClin 300 est utilisé comme conservateur. Tout contact ou toute ingestion accidentelle de tampons ou de réactifs contenant du ProClin peut provoquer une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Le respect des bonnes pratiques de laboratoire permet de réduire l'exposition. Consulter un médecin en cas d'observation de ces symptômes.
- La solution d'arrêt pour cet essai de produit est 2N H₂SO₄. Éviter le contact avec les yeux, la peau et les vêtements. En cas de contact, rincer immédiatement la zone concernée à l'eau.
- 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.
- Il est essentiel de prélever et de conserver les échantillons avec soin pour obtenir des résultats corrects (voir la section *PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS*).
- Éviter toute contamination microbienne ou croisée des échantillons ou des réactifs.
- Ne pas réutiliser un micropuits pour un deuxième test.
- Décontaminer tous les échantillons, réactifs et matériaux en les trempant pendant au moins 30 minutes dans une solution à 1/10 d'eau de javel (hypochlorite de sodium) ou en les passant à l'autoclave à 121 °C pendant 30 minutes à 103 kPa (15 psi).
- Le non-respect des durées et températures d'incubation indiquées dans la procédure est susceptible de provoquer des résultats erronés.
- **Le substrat de TMB doit être protégé de toute exposition à la lumière lors de la conservation et de l'incubation.** Éviter le contact avec les yeux, la peau et les vêtements. En cas de contact, rincer immédiatement la zone concernée à l'eau.
- Ne pas laisser sécher les micropuits quand l'essai est commencé.
- Ne pas gratter ni toucher le fond des puits lors de l'élimination du liquide hors des micropuits.
- Les échantillons inactivés par la chaleur peuvent entraîner des résultats inexacts.
- Les échantillons hyperlipémiques ou contaminés peuvent entraîner des résultats inexacts.
- Afin d'éviter la production d'aérosols pendant le lavage, utiliser un appareil pour aspirer le liquide de lavage et le déverser directement dans un flacon contenant de l'eau de Javel.
- **Utiliser un flacon de lavage ou un dispositif de remplissage automatique pour laver la plaque (PROCÉDURE DE L'ESSAI, étape 8). Pour obtenir des résultats optimaux, ne pas utiliser de pipette multi-canaux pour laver la microplaque.**
- Le test doit être effectué dans une zone suffisamment ventilée.
- 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.

CONSERVATION

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

PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

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

Il est très important de prélever, traiter et conserver les échantillons avec soin parce qu'une manipulation inappropriée de ces derniers peut générer du SC5b-9 au cours d'une activation artéfactuelle du complément.

Les valeurs pour les échantillons sériques normaux sont généralement légèrement supérieures à celles obtenues pour les échantillons de plasma normal citraté ou prélevé sur EDTA. Les taux de SC5b-9 dans le plasma citraté ou sur EDTA peuvent par conséquent être plus précisément représentatifs des concentrations *in vivo*.

Les échantillons sériques ou plasmatiques citraté ou sur EDTA doivent être prélevés dans des conditions d'asepsie à l'aide des techniques standards. Les échantillons doivent être testés immédiatement ou conservés à 4 °C ou sur de la glace pendant une durée maximale de quatre heures avant d'être testés.

Si un échantillon ne peut être testé dans les quatre heures selon les recommandations décrites plus haut, il doit être congelé à -70 °C minimum.

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

Décongeler rapidement les échantillons à 37 °C jusqu'à ce qu'ils soient tout juste décongelés. Les déposer immédiatement sur de la glace (durant quatre heures maximum) pour empêcher une activation du complément avant la dilution. Ne pas les décongeler à la température ambiante ou à 4 °C, car cela risque d'activer le complément. Les échantillons congelés doivent être testés dès que possible après avoir été décongelés. Il est déconseillé de répéter les congélations et décongélations. Si les échantillons doivent être recongelés pour une analyse ultérieure, Quidel recommande de congeler les diverses quantités aliquotes de l'échantillon pour éviter les cycles de congélation/décongélation.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

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

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

Les étalons et les contrôles n'exigent aucune dilution ou préparation avant l'utilisation.

Solution de lavage

Mélanger le concentré de solution de lavage 20 x en retournant plusieurs fois le flacon. Si le concentré de solution de lavage 20 x a été conservé entre 2 °C à 8 °C, il est possible que des cristaux se soient formés. Pour les dissoudre, réchauffer le flacon au bain-marie entre 37 °C à 50 °C jusqu'à dissolution complète, puis bien mélanger. Préparer la solution de lavage en diluant tout le contenu d'un flacon de concentré de solution de lavage 20 x avec de l'eau distillée ou désionisée jusqu'à obtention d'un litre de produit. Bien

mélanger. La solution de lavage reste stable pendant 30 jours quand elle est conservée dans un récipient propre entre 2 °C à 8 °C. Si le réactif devient trouble ou se décolore, il doit être éliminé.

Sélection des microplaques

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

Dilution de l'échantillon

AVERTISSEMENT: Manipuler tous les échantillons comme des produits potentiellement dangereux Suivre les précautions standards. Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur, contaminés ou conservés dans des conditions inappropriées.

REMARQUE: la section Prélèvement et Conservation des échantillons fournit les renseignements essentiels sur la manière de décongeler les échantillons. Pour obtenir des résultats précis, il importe de procéder à des manipulations adéquates.

Quidel conseille de diluer les échantillons de plasma normal à 1/10 dans le diluant d'échantillon fourni; les échantillons sériques doivent être dilués à 1/40. Une dilution à 1/200 ou supérieure peut être nécessaire pour les échantillons présentant des niveaux élevés de SC5b-9. Les échantillons **doivent** être dilués pour que les valeurs A_{450} relevées dépassent la LIDQ et ne dépassent pas la valeur A_{450} de l'étalon E du kit SC5b-9 Plus. Les échantillons dont les valeurs A_{450} ne sont pas comprises dans cette plage doivent être retestés avec une dilution différente.

Déterminer le nombre (N) d'échantillons à analyser. Numéroter les tubes à essai de 1 à N et noter quel échantillon correspond à chaque tube. Préparer une solution diluée de chaque échantillon à une concentration appropriée (voir le paragraphe précédent) avec le diluant d'échantillon. Bien mélanger, mais éviter la formation de mousse et de bulles. Ne pas conserver ni réutiliser des échantillons dilués.

Ajout d'échantillons dilués dans les micropuits

Il existe deux méthodes pour ajouter le tampon et les échantillons, étalons et contrôles dilués dans les puits (voir l'étape 6 de la section *PROCÉDURE DE L'ESSAI*). Pour les petites séries de dosage, quand seuls quelques échantillons sont testés, les échantillons dilués et les autres réactifs peuvent être ajoutés directement dans les puits qui leur ont été attribués à l'aide d'une micropipette (100 µl/puits). Pour les petites et grandes séries, en particulier pour ces dernières, nous recommandons d'utiliser une pipette multi-canaux pour ajouter les échantillons comme indiqué ci-après. **(Cette méthode peut également être utilisée pour ajouter facilement le conjugué, le substrat et la solution d'arrêt.)**

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

PROCÉDURE DE L'ESSAI

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

Voir les sections *PRÉPARATION DES RÉACTIFS* et *AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS*.

1. Noter les emplacements de micropuits correspondant au(x) puits des blancs, aux échantillons, étalons et contrôles ainsi que les numéros de lot indiqués sur les étiquettes des flacons. Sur l'un des coins de la microplaque, coller une étiquette qui servira de point de repère pour l'orientation.
2. Préparer les microplaques comme indiqué ci-après:
 - a. Réhydrater les micropuits en ajoutant environ 300 µl de solution de lavage dans chaque puits à l'aide d'un flacon de lavage ou d'un dispositif de remplissage automatique.
 - b. Incuber entre 15 °C à 30 °C pendant deux minutes.
 - c. Vider chaque puits.
 - d. Retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant à deux reprises afin d'éliminer toute trace de liquide.
3. Sélectionner un ou plusieurs puits pour servir de blanc. Ajouter 100 µl de diluant d'échantillon dans le(s) puits qui sera/seront utilisé(s) comme blanc(s) pour le lecteur de plaque.
4. Ajouter 100 µl de chaque étalon de SC5b-9 (A, B, C, D, E) dans des puits en double. **REMARQUE: Les étalons ont déjà été dilués et sont prêts à l'emploi.**
5. Ajouter 100 µl des solutions diluées à 1/25 des contrôles haut et bas du SC5b-9 dans des puits, en double. **REMARQUE: Les contrôles ont déjà été dilués et sont prêts à l'emploi.**
6. Ajouter 100 µl de chaque échantillon dilué dans le micropuits qui lui a été attribué. (Voir la section *PRÉPARATION DES RÉACTIFS, Dilution des Échantillons*).
7. Incuber entre 15 °C à 35 °C pendant 60 ± 1 minutes.
8. Laver les micropuits comme suit:
 - a. Après l'incubation de l'étape 7 (ou de l'étape 10 ci-après), vider chaque puits.
 - b. Ajouter environ 300 µl de solution de lavage dans chaque puits à l'aide d'un flacon de lavage ou d'un dispositif de remplissage automatique.
 - c. Incuber les puits pendant 1 minute entre 15 °C à 30 °C.
 - d. Vider chaque puits.
 - e. Ajouter environ 300 µl de solution de lavage dans chaque puits.
 - f. Vider chaque puits.

g. Répéter les étapes « e » à « f » trois fois supplémentaires.

 - h. Après le cinquième cycle de lavage, retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant à deux reprises afin d'éliminer toute trace de liquide.
9. Verser 50 µl de conjugué de SC5b-9 dans chaque puits lavé, y compris dans le(s) puits vide(s), à l'aide d'une pipette multi-canaux ou automatique.
10. Incuber les microplaques entre 15 °C à 30 °C pendant 30 ± 1 minutes.
11. Laver les micropuits après l'incubation de 30 minutes (étape 10), comme décrit dans la section *PROCÉDURE DE L'ESSAI*, étape 8.
12. Immédiatement après le lavage, déposer 100 µl de la solution de substrat dans chaque puits, y compris dans le(s) puits de blanc.
13. Incuber les microplaques entre 15 °C à 30 °C pendant 15 ± 1 minutes.
14. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique. La solution d'arrêt doit être ajoutée dans les puits dans le même ordre et au même rythme que l'a été la solution de substrat. Tapoter doucement la plaque pour que la couleur se développe uniformément.
REMARQUE: On obtiendra des résultats optimaux en se servant de la fonction mélange automatique du lecteur de micropuits (si l'on en a un) juste avant de lire la plaque.
15. Déterminer le degré d'absorbance à 450 nm (valeur A_{450}) pour chaque puits de test dans 30 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt (étape 14), en effectuant la correction de blanc nécessaire.
16. Déterminer la concentration des échantillons et des contrôles à partir de la courbe étalon.
17. Éliminer les échantillons et les contrôles dilués restants, ainsi que les microplaques utilisées (voir la section *AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS*).

CONTRÔLE QUALITÉ

Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'utilisation de contrôles afin de garantir le bon fonctionnement de l'essai. Chaque kit Sc5b-9 Plus contient des contrôles haut et bas qui peuvent être utilisés à cet effet. Des plages de contrôles sont fournies. Ces valeurs témoins servent à vérifier la validité de la courbe et les résultats des échantillons. Chaque laboratoire doit établir ses propres paramètres pour les limites d'acceptation de l'essai. Si les valeurs témoins ne se situent PAS à l'intérieur des limites d'acceptation de votre laboratoire, les résultats de l'essai doivent être remis en question et il faut tester de nouveau les échantillons. En outre, la notice du produit exige que la courbe étalon générée à l'aide des étalons du kit corresponde à des critères de validation rigoureux. Si l'essai ne remplit pas ces critères, le recommencer, ou contacter le service technique de Quidel.

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

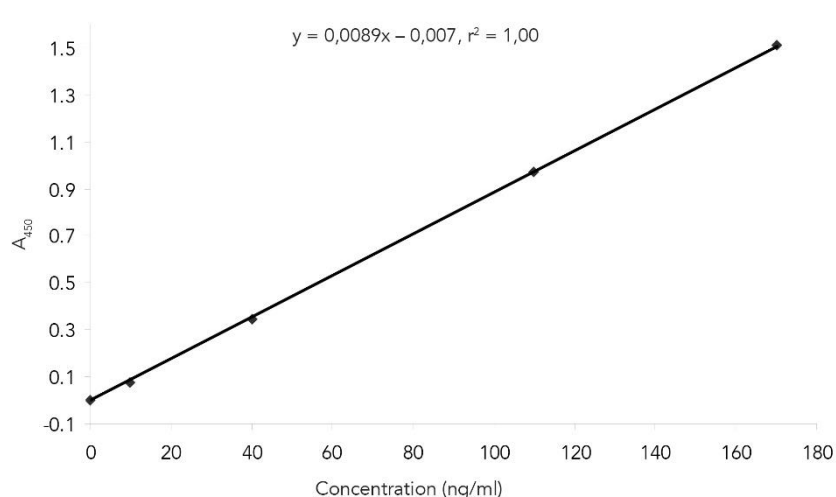
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Calcul des résultats

Utilisation de la courbe étalon: On obtient la courbe étalon pour l'essai immunoenzymatique SC5b-9 Plus en utilisant en ordonnées les valeurs A_{450} pour chaque étalon (auxquelles on a soustrait le blanc), et en abscisse, la concentration attribuée à chaque étalon. Après régression linéaire, la courbe étalon obtenue doit répondre aux critères de validation (voir ci-dessous). La plupart des ordinateurs et des calculateurs sont capables d'exécuter ces calculs.

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

Figure 1
Courbe étalon représentative



Échantillon	A_{450}	ng/ml
Standard A	0	0
Standard B	0,079	10
Standard C	0,347	40
Standard D	0,975	110
Standard E	1,512	170

Calcul de la concentration réelle de SC5b-9 dans les échantillons

Les concentrations attribuées sur le certificat d'analyse sont des unités absolues de complexe SC5b 9. La concentration en SC5b-9 dans un échantillon est déterminée en multipliant la concentration déterminée par le facteur de dilution approprié de l'échantillon. Par exemple, si un échantillon de plasma sur EDTA est dilué à 1/10 lors de l'essai et si la courbe de régression linéaire indique une concentration en SC5b-9 de 20 ng/ml, la concentration de l'échantillon en SC5b-9 est de 200 ng/ml (soit 20 x 10).

Afin d'obtenir des résultats de concentration en SC5b-9 exacts pour les échantillons qui donnent des valeurs A_{450} supérieures à celles de l'étalon E (ou qui donnent des valeurs A_{450} inférieures à la LIDQ), les échantillons doivent être testés de nouveau avec une dilution différente de façon à ce que les nouvelles valeurs A_{450} se situent entre ces limites. Lors de toute répétition des tests, les étalons et contrôles du SC5b-9 doivent également être de nouveau testés.

Validation

Déterminer la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation de la meilleure courbe dérivée obtenue pour les étalons A, B, C, D et E du SC5b-9. Les valeurs doivent être comprises entre les limites indiquées pour que l'essai soit valide:

coefficient de corrélation (r): > 0,95

pente (m): entre 0,0039 à 0,0123

ordonnée à l'origine (b): entre (-)0,189 à (+)0,201

Se référer au certificat d'analyse pour connaître la plage de concentration acceptable de SC5b-9 pour les contrôles haut et bas.

LIMITATIONS

L'essai immunoenzymatique MicroVue SC5b-9 Plus est utilisé pour analyser des échantillons de sérum ou de plasma sur EDTA ou citrate. Les anticoagulants autres que l'EDTA n'ont pas fait l'objet de tests.

VALEURS DES ÉCHANTILLONS

Des échantillons de sérum et plasma EDTA provenant de quarante (40) donneurs sains ont été testés avec le kit SC5b-9 Plus EIA. Les résultats sont présentés ci-dessous :

	n	Moyenne (ng/ml)	Intervalle : ± 2 ET (ng/ml)
Plasma EDTA	40	147	75 à 219
Sérum	40	356	187 à 525

REMARQUE : le comportement de la moyenne et de l'écart type (ET) des concentrations du complexe SC5b-9 déterminées pour les échantillons de plasma et de sérum peuvent varier d'un laboratoire à l'autre. Il est donc recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres plages de valeurs normales. Les valeurs indiquées ci-dessus constituent uniquement des références.

PERFORMANCES DU TEST

Limites

LOD: La limite de détection (LDD) du dosage du SC5b-9 Plus, déterminée par la limite supérieure de 3 écarts-types d'un essai utilisant zéro comme étalon, est de 3,7 ng/ml.

LLOQ: La limite inférieure de quantification (LIDQ) du dosage du SC5b-9 est de 8,8 ng/ml, concentration la plus basse de la courbe étalon remplissant les critères d'exactitude et de précision du NCCLS.

Substances interférantes

On n'a pas observé d'interférences pour les substances suivantes, testées selon les concentrations indiquées, et se sont révélés ne pas interférer avec l'essai.

Substance	Concentration
Bilirubin	40 mg/dl
Hemoglobine	500 mg/dl
Triglycerides	3000 mg/dl
Li + Heparin	14 U/ml
Na + Heparin	14 U/ml
C9 Protein	180 mg/l
Albumin	6000 mg/dl
Glucose	1200 mg/dl
Cholesterol	500 mg/dl

Précision

Les précisions intra-cycle et inter-cycles ont été déterminées en testant deux échantillons plasmatiques et deux échantillons sériques en 20 répliques au cours de 10 cycles différents.

Échantillon	SC5b-9 (ng/ml)	CV intra-cycle ¹ (%)	CV inter-cycles ² (%)
Plasma	139,0	6,8	13,1
	462,9	1,9	5,2
Serum	803,6	2,8	10,4
	1410,6	1,6	5,0

¹n = 20 répliques ²n = 10 cycles

Linéarité

La linéarité a été établie par mélange d'un échantillon plasmatique enrichi avec un échantillon plasmatique pauvre, en proportions diverses de façon à créer des concentrations intermédiaires d'analyte. La récupération moyenne était de 94 % avec une plage absolue de 86 à 104 %.

ASSISTANCE

Pour des services en dehors des États-Unis, veuillez contacter votre distributeur local. Vous trouverez les informations sur Quidel, ses produits et ses distributeurs sur le site quidel.com.

RÉFÉRENCES

1. Müller-Eberhard, H.J., The Membrane Attack Complex, Springer Seminars in Immunopathology, Vol. 7, p.93, 1984.
2. Lachmann, P.J. and Thompson, R.A., Reactive lysis: The complement-mediated lysis of unsensitized cells. II. The characterization of activated reactor as C56 and the participation of C8 and C9. J. Exp. Med., Vol. 131, p.643, 1970.
3. Götze, O., and Müller-Eberhard, H.J., Lysis of erythrocytes by complement in the absence of antibody. J. Exp. Med., Vol. 132, p.898, 1970.
4. Kolb, W.P., Haxby, J.A., Arroyave, C.M., and Müller-Eberhard, H.J., Molecular analysis of the membrane attack mechanism of complement. J. Exp. Med., Vol. 135, p.549, 1972.
5. Kolb, W.P., and Müller-Eberhard, H.J., The membrane attack mechanism of complement. Isolation and subunit composition of the C5b-9 complex, J. Exp. Med., Vol. 141, p.724, 1975.

6. Podack, E.R., Kolb, W.P., and Müller-Eberhard, H.J., The C5b-6 complex: formation, isolation, and inhibition of its activity by lipoprotein and the S-protein of human serum. J. Immunol., Vol. 120, p.1841, 1978.
7. Podack, E.R. and Müller-Eberhard, H.J., Isolation of human S-protein, of an inhibitor of the membrane attack complex of complement. J. Biol. Chem., Vol. 254, p.9808, 1979.

MicroVue est une marque commerciale déposée de Quidel Corporation. Toute autre marque citée dans ce document est la propriété de son détenteur respectif et son utilisation dans le présent document n'implique aucune reconnaissance ni aucun soutien envers un quelconque produit ou service.

REF A029 – MicroVue SC5b-9 Plus 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

PIA029002FR00 (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
