

Saggio immunoenzimatico per la quantizzazione del complesso SC5b-9 presente nel plasma o nel siero umani

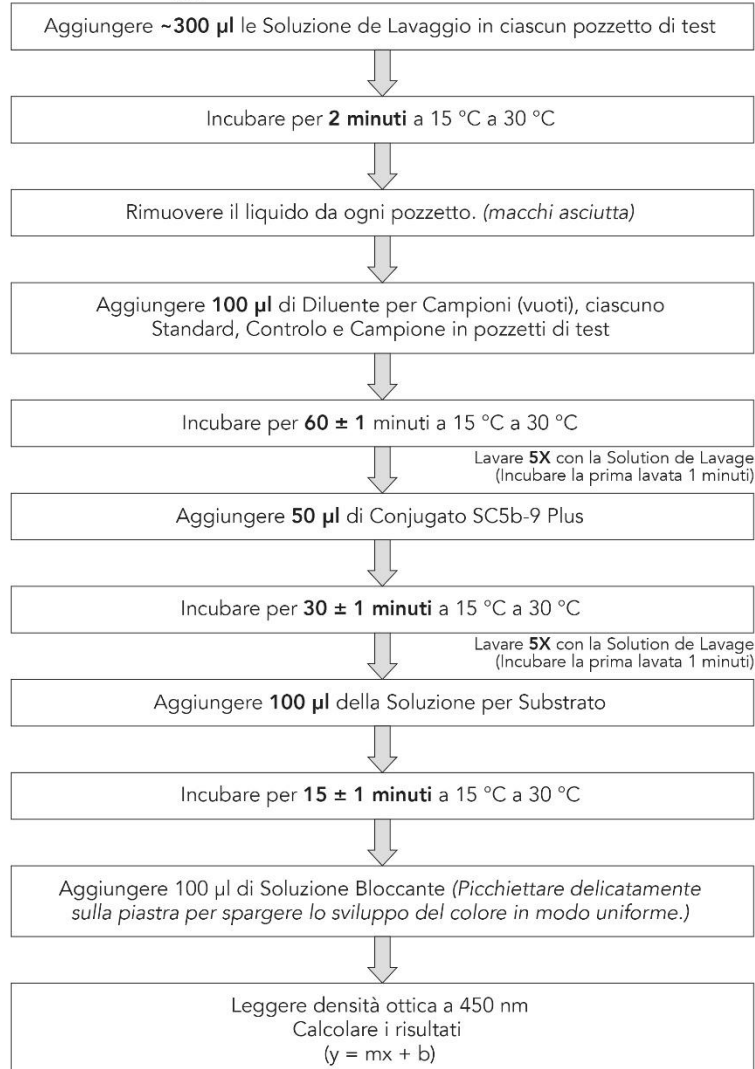
Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per esportazione.
Non destinato alla vendita o all'uso negli Stati Uniti o in Canada.

SOMMARIO

Preparato di il Campione ed il reagente

- Diluire la Soluzione di Lavaggio Concentrato 1:20 con acqua deionizzata.
- Diluire dei campioni di siero 1:40 nel diluente per campioni fornito (es. 10 μ l + 390 μ l).
- Diluer dei campioni di plasma 1:10 nel diluente per campioni fornito (es. 50 μ l + 450 μ l).

Procedura del Saggio





FINALITÀ D'USO

Il saggio immunoenzimatico MicroVue SC5b-9 Plus misura la quantità di complesso SC5b-9 presente nei campioni di plasma o siero umani.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il complesso terminale del complemento (TCC, SC5b-9) viene generato dal raggruppamento dei complementi da C5 a C9 come conseguenza dell'attivazione del sistema di complemento tramite il percorso classico, con lectina o alternativo.¹ Il complesso di attacco alla membrana (MAC), una forma di TCC, è un complesso stabile che media il danno irreversibile alla membrana cellulare target associato all'attivazione del complemento.¹⁻⁴ I complessi formati in assenza di una membrana target si legano a proteine del siero regolatorie che sono presenti in modo naturale, quali la proteina S,⁵⁻⁷ allo stadio C5b-7 del gruppo, formando il TCC solubile non litico.^{1,5} Per gli scopi di questo documento, tutte le forme di complesso stabile terminale del complemento vengono chiamate indistintamente TCC e SC5b-9, mentre si riconosce che le altre proteine regolatorie, quali la Clusterina, formano anch'esse tali complessi stabili e sono rilevabili nel saggio SC5b-9 Plus.

Il saggio immunoenzimatico MicroVue SC5b-9 Plus misura la concentrazione di TCC, fornendo così un'indicazione dello stato del percorso del complemento terminale nel campione. Esso utilizza un anticorpo monoclonale all'anello c9 di TCC per catturare il complesso. Il TCC catturato viene in seguito rilevato con gli anticorpi coniugati con perossidasi estratto da radice di rafano (HRP) che si legano agli antigeni del complesso SC5b-9. Questo test, che fornisce una procedura rapida, altamente specifica e quantitativa per la misurazione dei livelli di TCC, è progettato per indagini che studiano il ruolo o lo stato dell'attivazione del percorso del complemento terminale in numerose strutture di ricerca e per il monitoraggio della generazione di complessi SC5b-9 *in vivo* o *in vitro*.

I livelli di TCC sono indicativi del livello di attivazione del complemento nel campione. Elevati livelli di attivazione del complemento sono stati rilevati in numerose condizioni patologiche compreso il Lupus eritematoso sistemico (LES) e altre patologie autoimmuni, artrite reumatoide, dispnea acuta e durante patologie infiammatorie, quali l'infarto miocardico e l'attacco grave e improvviso.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il saggio immunoenzimatico MicroVue SC5b-9 Plus per la quantizzazione di SC5b-9 nel siero, nel plasma o in campioni sperimentali umani è una procedura a tre fasi che utilizza (1) una piastra per microsaggio rivestita con anticorpo monoclonale di topo che si lega specificamente all'anello C9 di SC5b-9, (2) anticorpi coniugati con perossidasi estratto dalla radice di rafano contro antigeni di SC5b-9 e (3) un substrato cromogeno.

Nella prima fase, gli standard, i campioni di controllo e i campioni di test vengono aggiunti in pozzetti per microsaggio pre-rivestiti con anticorpo monoclonale specifico anti-SC5b-9. L'SC5b-9 presente negli standard, nei campioni di controllo o nei campioni si lega all'anti-SC5b-9 immobilizzato. Al termine dell'incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove il materiale non legato. Le proteine costituenti del TCC, compreso il C9, non si legano a questo anticorpo e vengono lavate via durante il ciclo di lavaggio.

Nella seconda fase, gli anticorpi coniugati con perossidasi estratto da radice di rafano (HRP) contro gli antigeni su SC5b-9 vengono aggiunti in ogni pozzetto di test. Gli anticorpi coniugati con enzimi si legano all'SC5b-9 che era stato catturato dall'anti-SC5b-9 monoclonale legato sulla superficie dei pozzetti per microsaggio. Dopo l'incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove il coniugato non legato.

Nella terza fase, a ciascun pozzetto del microsaggio viene aggiunto un substrato dell'enzima cromogeno. Il coniugato con perossidasi estratto da radice di rafano (HRP) reagisce con il substrato, formando un colore blu. Dopo l'incubazione, viene aggiunto un reagente per interrompere lo sviluppo del colore, che genera un colore giallo. Le assorbanze standard, del campione di controllo e del campione esaminato (valori A₄₅₀)

vengono misurate in modo spettrofotometrico. L'intensità del colore della miscela della reazione è proporzionale alla concentrazione di SC5b-9 (TCC) presente nei campioni del test, standard e campioni di controllo.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

96 saggi per complesso SC5b-9

Il kit MicroVue SC5b-9 Plus EIA contiene i seguenti materiali:

A	Standard SC5b-9 Plus	Codici A9958-62	5 x 1,5 ml
B	Contiene siero umano contenente quantità note di SC5b-9 in PBS, stabilizzatori per proteine,		
C	conservanti		
D			
E			
H	Campioni di controllo	Codici A9581, A9582	2 X 1,5 ml
L	superiori/inferiori Contiene plasma umano con un livello superiore/inferiore di complessi SC5b-9, conservanti		
1	Strisce rivestite	Codice A3840	Je 12
	Strisce da otto pozzetti ciascuna, rivestiti con anticorpo monoclonale di topo specifico per SC5b-9 umano in una busta protettiva risigillabile		
2	Soluzione bloccante	Codice 4978	12 ml
	Contiene 2N H ₂ SO ₄		
3	Soluzione di lavaggio concentrata 20X	Codice A9957	2 x 50 ml
	Contiene soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), 0,05 % di Tween-20® e Proclin® 300		
4	Diluyente per campioni	Codice A3670	50 ml
	Contiene PBS, 0,05 % di stabilizzatori per proteine Tween-20, 0,035 % di ProClin 300		
5	Substrato con TMB	Codice A9946	12 ml
	Substrato al perossido pronto all'uso con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidene (TMB)		
6	Coniugato SC5b-9 Plus	Codice A9577	7 ml
	Contiene anticorpi (capra) coniugati con perossidasi estratto da radice di rafano contro gli antigeni di SC5b-9		

Tween-20® è un marchio registrato di ICI Americas Inc.

ProClin® è un marchio registrato di Rohm and Haas Company.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Timer (60 minuti)
- Calcolatrice o altro metodo di calcolo per la convalida del saggio
- Piastre per microsaggio pulite e non utilizzate e/o provette e cestelli
- Contenitore per la diluizione del tampone di lavaggio
- Flacone di lavaggio o altro sistema di lavaggio per saggio immunologico
- Pipetta multicanale regolabile (8 o 12 canali) o micropipette a ripetizione (opzionale)
- Pipette pulite, 1 ml, 5 ml e 10 ml
- Micropipette e punte per pipette
- Lettore per piastra in grado di effettuare letture ad una densità ottica fra 0,0 e 2,0
- Acqua deionizzata o distillata
- Se non richiesto, è consigliabile utilizzare un lettore per piastra con funzionalità di auto miscelazione.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Trattare i campioni come materiale a potenziale rischio biologico. Seguire le precauzioni generali durante la manipolazione del contenuto di questo kit e di qualunque campione paziente.
- Usare i reagenti forniti come un'unità integrale prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.
- Conservare i reagenti del saggio come indicato.
- Non usare le strisce rivestite se la busta protettiva è danneggiata.
- Come conservante viene utilizzato ProClin 300. Il contatto o l'ingestione accidentale di tamponi o reagenti contenenti ProClin può causare irritazioni alla cute, agli occhi o alla bocca. Adottare una buona pratica di laboratorio per ridurre l'esposizione. In presenza di sintomi, consultare un medico.
- La soluzione bloccante per questo saggio di prodotto è 2N H₂SO₄. Evitare il contatto con gli occhi, la cute e gli indumenti. In caso di contatto, sciacquare immediatamente con acqua le aree interessate.
- Ciascuna unità donatore utilizzata nella preparazione degli standard e dei sieri di controllo di questo prodotto è stata esaminata tramite un metodo approvato dall'FDA per verificare la presenza di anticorpi contro il virus dell'immunodeficienza umana (HIV1 e HIV2), contro il virus dell'epatite C e contro l'antigene di superficie dell'epatite B. Poiché nessun metodo di test è in grado di assicurare definitivamente l'assenza di agenti infettivi, questi reagenti devono essere manipolati conformemente al livello di biosicurezza 2, come consigliato per qualsiasi campione di siero o di sangue umano potenzialmente infetto nel manuale "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2007 del Centers for Disease Control/National Institutes of Health.
- L'adeguata raccolta e conservazione dei campioni per il test sono essenziali per ottenere risultati accurati (fare riferimento alla sezione *PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI*).
- Evitare la contaminazione microbica o crociata di campioni o reagenti.
- Non utilizzare un pozzetto per microsaggio per più di un test.
- Disinfettare tutti i campioni, i reagenti ed i materiali immergendoli per almeno 30 minuti in una soluzione di 1:10 di candeggina per uso domestico (ipoclorito di sodio) o in autoclave a 121 °C per 30 minuti a 15 psi.
- L'impostazione di tempi e temperature di incubazione diversi da quelli indicati nella sezione Procedura del saggio può fornire risultati errati.
- **Il concentrato per substrato con TMB deve essere protetto dalla luce durante la conservazione e l'incubazione.** Evitare il contatto con gli occhi, la cute e gli indumenti. In caso di contatto, sciacquare immediatamente con acqua le aree interessate.
- Dopo l'inizio del saggio, evitare che i pozzetti per microsaggio si asciughino.
- Quando si rimuove il liquido dai pozzetti per microsaggio, non raschiare né toccare il fondo dei pozzetti.
- I campioni inattivati a caldo possono produrre risultati errati.
- I campioni iperlipemici o contaminati possono fornire risultati errati.
- Per evitare la formazione di aerosol durante il lavaggio, utilizzare un'apparecchiatura per aspirare il liquido di lavaggio in un flacone contenente candeggina per uso domestico.
- **Lavare la piastra utilizzando un flacone di lavaggio o un dispositivo di riempimento automatico (PROCEDURA DEL SAGGIO, fase 8). Per ottenere risultati ottimali, la piastra per microsaggio non deve essere lavata con una pipetta multicanale.**
- 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.

CONSERVAZIONE

I kit chiusi devono essere conservati a 2 °C a 8 °C. Prima dell'uso, equilibrare i reagenti ed i materiali a 15 °C a 30 °C. Mettere le strisce per microsaggio inutilizzate nel contenitore di conservazione, sigillarlo e conservare a 2 °C a 8 °C.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Manipolare e smaltire tutti i campioni seguendo le precauzioni generali.

È essenziale eseguire correttamente le operazioni di prelievo, elaborazione e conservazione dei campioni in quanto l'SC5b-9 può essere generato in campioni manipolati in modo inadeguato per via di una attivazione indesiderata del complemento.

I valori dei campioni di siero normale saranno normalmente superiori a quelli ottenuti con EDTA o campioni di plasma normali citrato. I livelli SC5b-9 in EDTA o plasma citrato possono quindi rappresentare in modo più accurato le concentrazioni *in vivo*.

I campioni di siero, EDTA o plasma citrato devono essere prelevati in modo asettico utilizzando tecniche standard. I campioni devono essere esaminati immediatamente oppure conservati a 4 °C o nel ghiaccio per un periodo non superiore a quattro ore prima dell'esecuzione del saggio.

Se il campione non può essere esaminato entro quattro ore in base alle linee guida sopra descritte, è necessario congelarlo a -70 °C o a temperature inferiori.

Per preparare la conservazione dei campioni di siero e plasma umano è anche possibile utilizzare una **Soluzione Stabilizzante per Campioni** (Codice A9576). Per un uso adeguato del prodotto, disponibile solo da Quidel, è necessario che il campione venga miscelato 1:1 con la soluzione prima del congelamento. A richiesta sono disponibili ulteriori informazioni tecniche sulla soluzione.

Scongelare rapidamente a 37 °C i campioni congelati, finché non risultano appena 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, in quanto potrebbe avere luogo l'attivazione del complemento. Non scongelare i campioni a temperatura ambiente o a 4 °C, in quanto ciò potrebbe causare l'attivazione del complemento. Dopo il scongelamento, i campioni devono essere esaminati nel più breve tempo possibile. Non è consigliato eseguire ripetuti congelamenti e scongelamenti. Se è necessario ri-congelare i campioni per ulteriori analisi, Quidel suggerisce di congelare diverse aliquote del campione, al fine di evitare più cicli di congelamento/scongelo.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE

Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i materiali a 15 °C a 30 °C.

Dopo avere prelevato i reagenti ed i materiali necessari, riportare gli elementi inutilizzati alle rispettive temperature di conservazione (fare riferimento alla sezione *CONSERVAZIONE*).

Gli standard e i controlli non necessitano di diluizione o preparazione prima dell'uso.

Soluzione di lavaggio

Miscelare la soluzione di lavaggio concentrata 20X capovolgendo il flacone diverse volte. Se la soluzione di lavaggio concentrata 20X è stata conservata a 2 °C a 8 °C, possono essersi formati dei cristalli. Per dissolvere i cristalli, scaldare il flacone a bagnomaria ad una temperatura di 37 °C a 50 °C fino allo scioglimento di tutti i cristalli, quindi miscelare completamente. Preparare la soluzione di lavaggio diluendo l'intero contenuto di un flacone di soluzione di lavaggio concentrata 20X fino a raggiungere un totale di un litro, con acqua distillata o deionizzata. Miscelare completamente. La soluzione di lavaggio è stabile per 30

giorni se conservata in un contenitore pulito a 2 °C a 8 °C. In caso di alterazione del colore o di intorbidamento, gettare il reagente.

Selezione delle strisce per microsaggio

Determinare il numero di pozzetti necessari per il saggio. Si consiglia di effettuare un doppio test per i pozzetti vuoti, i controlli e gli standard. Togliere il fissatore di strisce dalla piastra montata. Togliere le strisce non necessarie e riporle nel contenitore di conservazione, risigillare il contenitore e riportarlo ad una temperatura di 2 °C a 8 °C. Fissare le strisce da usare nel saggio al telaio della piastra del saggio.

Diluizione dei campioni

ATTENZIONE: Manipolare tutti i campioni come fossero potenzialmente pericolosi seguendo le precauzioni generali. Non utilizzare campioni inattivati a caldo, contaminati o non correttamente conservati.

NOTA: consultare la sezione Prelievo e conservazione dei campioni per note importanti sui metodi adeguati di scongelamento dei campioni congelati. Una manipolazione accurata dei campioni è essenziale per l'ottenimento di risultati accurati.

Quidel consiglia la diluizione dei campioni di plasma normale 1:10 nel diluente per campioni fornito; i campioni di siero devono essere diluiti 1:40. Una diluizione di 1:200 o superiore può essere necessaria per campioni con livelli elevati di SC5b-9. I campioni **devono** essere diluiti in modo che i valori A_{450} osservati siano superiori all'LLOQ e non superino il valore A_{450} dello Standard E per kit SC5b-9 Plus. I campioni con letture A_{450} al di fuori di questi valori devono essere riesaminati con una nuova diluizione.

Determinare il numero (N) di campioni da esaminare. Etichettare le provette del test da 1 a N e registrare quali campioni corrispondono a ciascuna provetta. Preparare una diluizione adeguata (come descritto nel paragrafo precedente) per ciascun campione usando il diluente per campioni di complemento. Miscelare completamente evitando la formazione di schiuma e bolle. Non conservare né riutilizzare i campioni diluiti.

Aggiunta di campioni diluiti ai pozzetti di microtitolazione

Per aggiungere dei campioni diluiti, degli standard, dei campioni di controllo e dei tamponi ai pozzetti è possibile utilizzare uno dei due metodi (fare riferimento alla fase 6 della sezione *PROCEDURA DEL SAGGIO*). In caso di piccole corse, in cui vengono esaminati solo pochi campioni, è possibile aggiungere i campioni diluiti e gli altri reagenti direttamente ai pozzetti assegnati tramite l'uso di una micropipetta (100 µl/pozzetto). In caso di corse piccole o grandi, ma soprattutto per corse di maggiori dimensioni, è opportuno utilizzare un pipettatore multicanale per l'aggiunta dei campioni come indicato di seguito. **(Questa procedura può essere utilizzata anche per aggiungere comodamente il coniugato, il substrato e la soluzione bloccante).**

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

PROCEDURA DEL SAGGIO

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

Fare riferimento alle sezioni PREPARAZIONE DEL REAGENTE e AVVERTENZE E PRECAUZIONI.

1. Registrare le posizioni dei pozzetti per microsaggio corrispondenti ai pozzetti vuoti, tutti i campioni per test, gli standard ed i controlli nonché i numeri di lotto indicati sulle etichette delle fiale. Etichettare un angolo della piastra per microsaggio al fine di stabilirne l'orientamento.
2. Preparare le strisce per microsaggio come indicato di seguito:
 - a. Reidratare i pozzetti per microsaggio aggiungendo circa 300 µl di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto usando un flacone di lavaggio o un dispositivo di riempimento automatico.
 - b. Incubare a 15 °C a 30 °C per due minuti.
 - c. Rimuovere il liquido da ogni pozzetto.
 - d. Capovolgere la piastra e picchiettare energicamente due volte sulla carta assorbente per eliminare eventuali residui di liquido.
3. Selezionare uno o più pozzetti da utilizzare come vuoti. Aggiungere 100 µl di diluente per campioni nei pozzetti che verranno usati per confronto con il vuoto del lettore delle piastre.
4. Aggiungere 100 µl di ciascuno standard (A, B, C, D, E) SC5b-9 nei pozzetti duplicati. **Nota: gli standard sono già stati diluiti e sono pronti per l'uso.**
5. Aggiungere 100 µl del controllo superiore SC5b-9 e del controllo inferiore SC5b-9 nei pozzetti duplicati. **Nota: i controlli sono già stati diluiti e sono pronti per l'uso.**
6. Aggiungere 100 µl di ciascun campione diluito nel pozzetto per microsaggio assegnato. (Fare riferimento alla sezione *PREPARAZIONE DEI REAGENTI, Diluizione dei campioni*).
7. Incubare a 15 °C a 30 °C per 60 ± 1 minuti.
8. Lavare i pozzetti per microsaggio come indicato di seguito:
 - a. Dopo l'incubazione descritta nella fase 7 (o nella seguente fase 10) rimuovere il liquido da ciascun pozzetto.
 - b. Aggiungere circa 300 µl di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto usando un flacone di lavaggio o un dispositivo di riempimento automatico.
 - c. Incubare i pozzetti per 1 minuto a 15 °C a 30 °C.
 - d. Rimuovere il liquido da ogni pozzetto.
 - e. Aggiungere a ciascun pozzetto 300 µl di soluzione di lavaggio.
 - f. Rimuovere il liquido da ogni pozzetto.
 - g. Ripetere le fasi e-f per altre tre volte.**
 - h. Dopo il quinto ciclo di lavaggio, capovolgere la piastra e picchiettare energicamente due volte sulla carta assorbente per eliminare eventuali residui di liquido.
9. Utilizzando una pipetta multicanale o a ripetizione, dispensare 50 µl di coniugato SC5b-9 in ogni pozzetto di test lavato, compresi i pozzetti vuoti.
10. Incubare le strisce per microsaggio a 15 °C a 30 °C per 30 ± 1 minuti.
11. Lavare i pozzetti per microsaggio dopo l'incubazione di 30 minuti (fase 10), come descritto nella fase 8 della sezione *PROCEDURA DEL SAGGIO*.
12. Immediatamente dopo il lavaggio, dispensare 100 µl della soluzione per substrato in ciascun pozzetto, compresi quelli vuoti.
13. Incubare le strisce per microsaggio a 15 °C a 30 °C per 15 (± 1) minuti.
14. Aggiungere 100 µl di soluzione bloccante a ciascun pozzetto per arrestare la reazione enzimatica. La soluzione bloccante deve essere aggiunta nei pozzetti secondo lo stesso ordine e lo stesso tasso della soluzione per substrato. Picchiettare delicatamente sulla piastra per spargere lo sviluppo del colore in modo uniforme. **Nota: Si possono raggiungere risultati ottimali se si utilizza, prima della lettura della piastra, la funzione di auto miscelazione (se disponibile) del lettore per piastra.**
15. Determinare la lettura dell'assorbanza a 450 nm (valore A_{450}) per ogni pozzetto di test entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione bloccante (fase 14), effettuando la correzione in base ai vuoti necessaria.
16. Determinare la concentrazione dei campioni e dei campioni di controllo dalla curva standard.
17. Smaltire i residui di campioni diluiti e di controlli e le strisce per microsaggio usate (fare riferimento alla sezione *AVVERTENZE E PRECAUZIONI*).

CONTROLLO DI QUALITÀ

Una buona pratica di laboratorio consiglia l'uso di campioni di controllo per garantire l'esecuzione adeguata del saggio. Ciascun kit SC5b-9 Plus contiene campioni di controllo superiori e inferiori che possono essere utilizzati a questo scopo. Vengono forniti i valori di gamma per il controllo. I valori di controllo sono destinati a verificare la validità della curva e i risultati del campione. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca i propri parametri per la definizione dei limiti di accettazione del saggio. Se i valori di controllo NON sono all'interno dei limiti di accettazione del laboratorio, i risultati del saggio devono essere considerati discutibili e si dovranno ripetere i campioni. Inoltre, l'insero richiede che la curva standard generata con gli standard del kit soddisfi i rigorosi requisiti di convalida. Se il saggio non è conforme a questi requisiti, ripetere il saggio o contattare l'assistenza tecnica Quidel.

Il certificato di analisi compreso in questo kit è specifico per il lotto e deve essere usato per verificare che i risultati ottenuti dal laboratorio siano simili a quelli ottenuti da Quidel Corporation. I valori della densità ottica forniti sono da usare esclusivamente come direttiva. È possibile che i risultati ottenuti dal laboratorio differiscano.

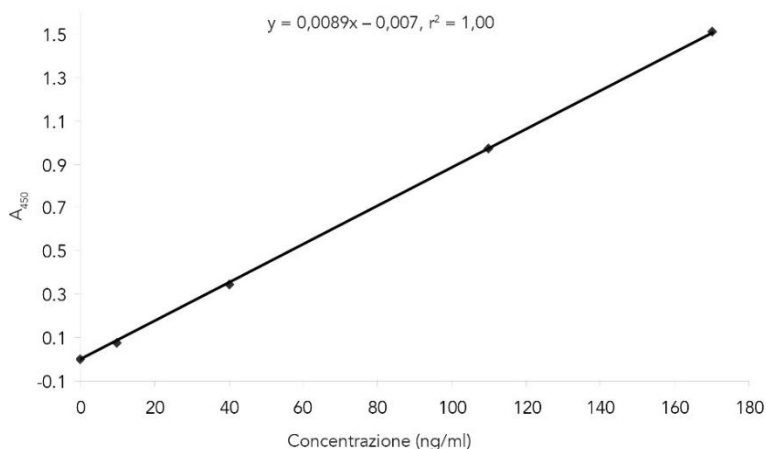
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolo dei risultati

Utilizzo della curva standard: la curva standard per il saggio immunoenzimatico SC5b-9 Plus EIA viene generata utilizzando i valori A_{450} da cui sono stati sottratti quelli vuoti di ogni standard (sull'asse y) e la concentrazione assegnata a ciascuno standard (lungo l'asse x). 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 (ng/ml) dei campioni di test 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



Campione	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

Calcolo della concentrazione SC5b-9 attuale nei campioni

La concentrazione riportata sul certificato di analisi è espressa in unità assolute del complesso SC5b-9. La concentrazione di SC5b-9 in un campione viene determinata moltiplicando la concentrazione determinata per il fattore di diluizione del campione corrispondente. Ad esempio, se un campione di plasma EDTA viene diluito con rapporto 1:10 per il saggio e la curva di regressione lineare produce una concentrazione pari a 20 ng SC5b-9/ml, la concentrazione di SC5b-9 nel campione sarebbe pari a 200 ng SC5b-9/ml (o 20×10).

Per ottenere esatte determinazioni di concentrazioni di SC5b-9 per campioni di test che producono valori A_{450} maggiori di quelli dello Standard E SC5b-9 (o che producono valori A_{450} inferiori all'LLOQ), è necessario riesaminare i campioni ad una diversa diluizione affinché i nuovi valori A_{450} rientrino entro questi limiti. In tutte le ripetizioni dei saggi si devono riesaminare anche gli standard ed i controlli SC5b-9.

Convalida

Determinare la pendenza, l'intersezione e il coefficiente di correlazione della linea best-fit derivata per gli standard A, B, C, D ed E di C SC5b-9. I valori devono essere compresi negli intervalli specificati per qualificare il saggio:

coefficiente di correlazione (r): > 0,95
pendenza (m): 0,0039 a 0,0123
intersezione y (b): (-)0,189 a (+)0,201

Consultare il certificato di analisi per reperire l'intervallo accettabile della concentrazione di SC5b-9 per i controlli alto e basso.

LIMITI

Il saggio immunoenzimatico MicroVue SC5b-9 Plus è stato usato per esaminare i campioni prelevati come siero o plasma in EDTA e citrato. Non sono stati verificati test su altri tipi di anticoagulanti.

VALORI DI ESEMPIO

Plasma e siero EDTA di quaranta (40) donatori normali sono stati testati con il kit SC5b-9 Plus EIA. I risultati sono presentati di seguito:

	n	Media (ng/ml)	Intervallo: ± 2 DS (ng/ml)
Plasma EDTA	40	147	Da 75 a 219
Siero	40	356	Da 187 a 525

NOTA: il comportamento della media e della deviazione standard (DS) delle concentrazioni del complesso SC5b-9 determinato per i campioni di plasma o di siero può variare da un laboratorio all'altro; si raccomanda quindi a ogni laboratorio di determinare i propri intervalli normali. I valori sopra forniti sono esclusivamente a scopo di riferimento.

PRESTAZIONI DEL TEST

Limiti

LOD: il limite di rilevamento (LOD) per il saggio SC5b-9 Plus è 3,7 ng/ml, determinato dal limite superiore 3SD in uno studio a standard zero.

LLOQ: il limite inferiore di quantizzazione (LLOQ) per il saggio SC5b-9 è 8,8 ng/ml, la concentrazione più bassa sulla curva standard che soddisfa i criteri NCCLS di esattezza e precisione.

Sostanze interferenti

Le seguenti sostanze sono state sottoposte a test alle concentrazioni specificate e non hanno mostrato interferenze con il saggio.

Sostanza	Concentrazione
Bilirubin	40 mg/dl
Hemoglobin	500 mg/dl
Triclycerides	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

Precisione

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

Campione	SC5b-9 (ng/ml)	All'interno di una stessa corsa ¹ C.V. (%)	Fra le corse ² C.V. (%)
Plasma	139,0	6,8	13,1
	462,9	1,9	5,2
Siero	803,6	2,8	10,4
	1410,6	1,6	5,0

¹n = 20 ripetizioni ²n = 10 corse

Linearità

La linearità è stata eseguita miscelando un campione ad elevato contenuto di plasma con un campione a basso contenuto di plasma, con vari rapporti per creare livelli intermedi di analiti. Il recupero medio è stato del 94 % con una gamma assoluta di 86 % a 104 %.

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

REF 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

PIA029002IT00 (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
