



MicroVue™ Complement

Ba Fragment EIA

Un inmunoensayo para la cuantificación de Fragmento Ba, un indicador de la activación de la Vía Alternativa del Complemento, en muestras de orina humano, suero humano, y plasma

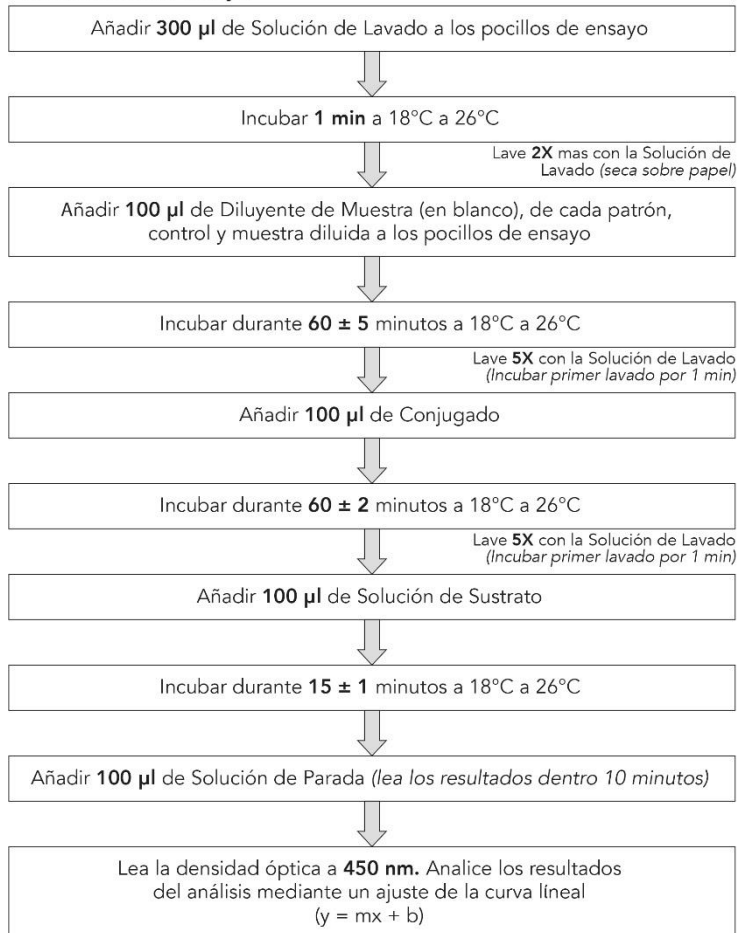
Para uso diagnóstico *in vitro*. Solo para exportación. No apto para la venta o uso en Estados Unidos o Canadá.

RESUMEN

Preparación de los Reactivos y de las Muestras

- Diluir la Solución de Lavado Concentrado 1:20 con agua desionizada
- Diluir las muestras de orina 1:15 en el Diluyente de Muestras (e.g. 25 µl muestra + 350 µl diluyente)
- Diluir las muestras de plasma 1:1000 en el Diluyente de Muestras en dos pasos: (e.g. 10 µl muestra + 990 µL diluyente à 40 µl muestra diluida + 360 µl diluyente)
- Diluir las muestras de suero 1:2000 en el Diluyente de Muestras en dos pasos: (e.g. 10 µl muestra + 990 µl diluyente à 20 µl muestra diluida + 380 µl diluyente)

Procedimiento de ensayo





USO PREVISTO

El inmunoensayo enzimático MicroVue Ba mide la cantidad de fragmentos Ba del complemento, una activación del fragmento del Factor B de la vía alternativa del complemento, en muestras de orina humana, suero humano, y plasma. La medida de Ba en orina humana, suero humano, o plasma proporciona evidencias de la participación de la vía alternativa del complemento. La medida de la activación de la vía alternativa del complemento ayuda en el diagnóstico de enfermedades renales, por ejemplo, glomerulonefritis crónica, nefritis lúpica, así como de enfermedades de la piel, como dermatitis herpetiforme y pénfigo vulgar. Otras enfermedades en las que la activación de la vía alternativa del complemento ha sido observada incluyen degeneración macular asociada al envejecimiento, pérdida del feto en embarazos de riesgo, la artritis reumatoide, y anemia drepanocítica.^{1, 4, 14-22}

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La vía alternativa del complemento proporciona protección innata contra los agentes microbiológicos en ausencia de anticuerpos específicos.⁵⁻⁹ La activación de esta vía del complemento puede ser el desencadenante de una variedad de sustancias incluídas polisacáridos o lípidos microbiológicos, lipopolisacáridos bacterianos gram negativos, y determinantes de superficie presentes en algunos virus, parásitos, células de mamífero infectadas viralmente, y células cancerígenas. En enfermedades autoinmunes, la vía alternativa del complemento puede contribuir directamente al daño tisular.

Una reacción importante que se produce durante la activación de la vía alternativa es la conversión del Factor B zymogen de 93 Kd de peso molecular en un enzima proteolítico activo. Esta es una reacción compleja que se produce en dos pasos. Durante el primer paso de la reacción el Factor B forma un complejo magnesio-dependiente con C3(H₂O) or C3b.⁸ El complejo C3(H₂O),B está formado solamente en fase líquida mientras el complejo C3b,B puede formarse tanto en fase líquida como en superficie.⁵⁻⁸ El Factor B, que está presente en el complejo C3(H₂O),B o el complejo C3b,B, está hendido a los fragmentos Ba (33 Kd) y Bb (60 Kd) en el segundo paso de la reacción por el enzima de la vía alternativa, Factor D.^{5-8,13}

A pesar de que la activación de la vía alternativa se piensa que ocurre primariamente en la ausencia de un anticuerpo específico, en muchas situaciones surgen en la cual la activación de la vía alternativa puede ocurrir como resultado de la activación de la vía clásica. Por ejemplo, los complejos inmunes que están presentes en pacientes con enfermedades autoinmunes pueden disparar la activación de la vía clásica del complemento con la producción resultante de fragmentos C3b. Como se ha descrito, estas moléculas C3b son capaces de unirse a Factor B e iniciar su escisión en fragmentos Ba y Bb. Así, la activación de la vía alternativa puede ocurrir en estados autoinmunes mediados por anticuerpos y puede contribuir significativamente a incrementar la activación del complemento y la concurrentemente destrucción tisular.

Al evaluar productos de escisión del Factor B en especímenes de prueba, puede uno estimar el grado de utilización de la vía alternativa que ocurre al tiempo que se obtiene la muestra sobre investigación del estado autoinmune. El kit de MicroVue Ba EIA proporciona un procedimiento simple, rápido, no-radiactivo, altamente específico, y cuantitativo para la medida de la activación del Factor B. Es ideal para las investigaciones implicadas con el rol o estado de la vía alternativa del complemento en numerosas investigaciones clínicas y para monitorizar la generación de Ba *in vitro*.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El inmunoensayo enzimático MicroVue Ba para la cuantificación en suero humano, plasma, u orina es un proceso de tres pasos utilizando (1) una microplaca cubierta con un anticuerpo monoclonal de ratón que une específicamente al Ba humano, (2) un anticuerpo policlonal anti-Factor B conjugado con Peroxidasa de rábano (HRP), y (3) un substrato cromogénico.

En el primer paso, Patrones, Controles, y Muestras son añadidas a los pocillos de la microplaca recubiertos con el anticuerpo monoclonal específico anti-Ba. Ba, pero no Factor B ni otros productos de la activación

de complemento, presentes en Patrones, Controles, o muestras se unirán al anticuerpo monoclonal anti-Ba inmovilizado. Después de la incubación, un ciclo de lavado eliminará el material no unido.

En el segundo paso, el anticuerpo policlonal anti-Factor B conjugado con HRP se añade a cada pocillo. El anticuerpo anti-Ba conjugado se une a Ba capturado en los pocillos de la microplaca. Después de la incubación, un ciclo de lavado elimina el material no unido.

En el tercer paso, un substrato enzimático cromogénico se añade a cada pocillo de la microplaca. El conjugado-HRP unido reacciona con el substrato, formando un color azul. Después de la incubación, la reacción enzimática se detiene químicamente, el color azul cambia a amarillo, y la intensidad del color se mide espectrofotométricamente a 450 nm. La intensidad del color de la reacción es proporcional a la concentración de Ba presente en las Patrones, Controles, y muestras.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

96 Ensayos para el fragmento Ba del Factor B

El kit de inmunoensayo enzimático MicroVue Ba Enzyme contiene:

A Patrones Ba	Cód. 5159 – 5163	1,5 ml cada uno
B Listo para uso. Contiene suero humano con una concentración de Ba conocida (ng/ml), proteínas		
C estabilizadores		
D		
E		
L Control bajo	Cód. 5164	1,5 ml
Listo para uso. Contiene suero humano con una concentración de Ba conocida (ng/ml), proteínas estabilizadores		
H Control Alto	Cód. 5165	1,5 ml
Listo para uso. Contiene suero humano con concentración de Ba conocida (ng/ml), proteínas estabilizadores		
1 Tiras recubiertas	Cód. 5166	12 cada uno
Tiras fraccionables de ocho pocillos recubiertas de anticuerpo específico monoclonal murino en recipiente de aluminio resellable		
2 Solución de Parada	Cód. A9947	12 ml
Contiene Ácido Clorhídrico 1N (4%)		
3 Solución de Lavado 20X Concentrado	Cód. A9957	50 ml, 2 cada uno
Contiene PBS, 1,0% Tween-20®, y 0,035% ProClin® 300		
4 Diluyente de Muestras	Cód. A3670	50 ml
Contiene PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% proteínas estabilizadoras, 0,035% ProClin 300		
5 Substrato TMB	Cód. 5059	12 ml
Listo para uso. Contiene 3,3', 5,5' tetrametilobencidima (TMB)		
6 Conjugado Ba	Cód. 5167	12 ml
Contiene el anticuerpo policlonal anti-Factor B conjugado con HRP suspendido en tampón estabilizador de HRP con preservantes		

Tween® 20 es una marca registrada de ICI Americas Inc.

ProClin® es una marca registrada de Rohm and Haas Company.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

- Cronómetro (de 60 minutos)
- Placa de dilución de 96 pocillos o tubos de ensayo y portatubos para una dilución de muestra (opcional)

- Placas de microensayos limpias para método de réplica en placas (opcional)
- Contenedor graduado para la dilución de la solución de lavado
- Botella para lavado u otro sistema de lavado homologado para inmunoensayos
- Micropipetas y puntas estériles de pipetas desechables (1 ml, 5 ml, y 10 ml)
- Depósitos de reactivos para agregar las soluciones de conjugado, sustrato y de parada (utilice depósitos limpios y sin usar para cada reactivo)
- Pipeta multicanal ajustable (8 o 12 canales) o micropipetas de repetición
- Lector de placas apto para valores de densidad óptica a A450 de entre 0,0 y 3,0
- Agua desionizada o destilada

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para el uso del diagnóstico *in vitro*.
- Trate las muestras como material potencialmente peligroso. Siga las precauciones universales cuando use componentes de este kit o muestras de pacientes.
- Use los reactivos como una unidad integral antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.
- Almacenar los reactivos como se indica.
- No usar las tiras recubiertas si la bolsa está perforada.
- ProClin 300 se usa como conservante. El contacto accidental o la ingestión del tampón o reactivos que contienen ProClin puede causar irritación de la piel, ojos o boca. Utilice buenas prácticas de laboratorio para reducir la exposición. Busque atención médica en caso de experimentar algún síntoma.
- La solución de parada se considera corrosiva y puede causar irritación. No ingerir. Evitar el contacto con los ojos, piel y ropa. En caso de contacto, lavar el área con agua inmediatamente. En caso de ingestión, avisar a un médico.
- Cada unidad de donante utilizada en la preparación de los sueros Patrones y Controles han sido probados por un método aprobado por la FDA para la detección de anticuerpos contra HIV 1 y 2 y contra el virus de la hepatitis C y antígenos de superficie de la hepatitis B. Sin embargo, como ningún método puede ofrecer la completa seguridad de la ausencia de agentes infecciosos, estos reactivos deben ser manipulados bajo el Nivel 2 de Bioseguridad como se recomienda para cualquier muestra de suero o sangre potencialmente infecciosa en el manual "Biosafety in Micro-biological and Biomedical Laboratories".⁽²³⁾
- Se recomienda el uso de pipetas multicanal o un pipeteador de repetición para asegurar dispensación adecuada de los reactivos.
- Para una dispensación precisa de las muestras, añada las muestras y Patrones de forma precisa. Pipetea cuidadosamente usando sólo material calibrado.
- Adecuada colección y el almacenamiento de las muestras son esenciales para la exactitud de los resultados (véase *MANIPULACIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS*).
- Evitar la contaminación microbial o cruzada de las muestras o reactivos. Su contaminación puede llevar a la obtención de resultados incorrectos.
- Probar cada muestra por duplicado.
- No usar un pocillo para más de una vez.
- El uso de tiempos y temperaturas de incubación que no sean los indicados en la sección *PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO* puede dar resultados erróneos.
- El sustrato TMB tiene que estar protegido de la luz y el contacto con el metal o de goma durante el almacenamiento e incubación. Evitar el contacto con los ojos, piel y ropa. En caso de contacto, aclarar inmediatamente el área afectada con agua.
- No permitir que se sequen los pocillos una vez empezado el ensayo.
- Cuando añaden o aspiren líquidos de los pocillos de la microplaca, no tocar o rasar el fondo de los pocillos.
- Las muestras inactivadas por calor, hiperlipémicas o contaminadas pueden dar resultados erróneos.
- Para evitar la formación de aerosoles durante el lavado, utilice un aparato para aspirar el líquido de lavado al interior de un frasco que contenga lejía de uso doméstico.

- Utilice una botella para lavado o un dispositivo de llenado automático para lavar las placas (*PROCEDIMIENTO DE ENSAYO*, paso 6). Para obtener los mejores resultados no utilice una pipeta multicanal para lavar la placa.
- La prueba debe realizarse en una zona que disponga de la ventilación adecuada.
- Deseche los envases y contenido no utilizado conforme a los requerimientos locales, estatales y federales reglamentarios.
- Vista preferentemente ropa protectora, guantes y protección para ojos/cara cuando esté manipulando los componentes del kit.
- Lavarse bien las manos después de manipular el kit.
- Para obtener información adicional sobre símbolos de peligro, seguridad, manipulación y eliminación de los componentes de este kit, consulte la Ficha de datos de seguridad (*Safety Data Sheet, SDS*) que se encuentra en quidel.com.

ALMACENAMIENTO

Almacenar el kit sin abrir a 2°C a 8°C.

INDICACIONES DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE REACTIVOS

La turbidez de la Solución de Lavado indica un deterioro de este reactivo. Si esto sucede, la solución debe ser desechada.

MANIPULACIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

PRECAUCIÓN: Tratar todas las muestras como si fueran potencialmente infecciosas.

Todas las manipulaciones de las muestras deben ser realizados en 2°C a 8°C.

Colección de muestras

Suero/Plasma

Debido a la activación del complemento que sucede durante la coagulación, los valores normales de Ba para las muestras de suero son más altas que los obtenidos con EDTA. Los niveles de Ba en plasma EDTA pueden representar con más exactitud las concentraciones *in vivo*.

El fragmento Ba del Factor B es susceptible a la proteólisis en especímenes recogidos o almacenados de forma incorrecta, y ya que Ba se puede generar en las muestras con manipulación inadecuada a través de la activación del complemento. *Pues la colección, manipulación y almacenamiento correcto de las muestras es fundamental.*²⁴ Para obtener resultados óptimos con plasma, se recomienda usar tubos de colección K2 EDTA.

Las muestras de suero y plasma EDTA deben recogerse de forma aséptica usando las técnicas convencionales.²⁵ Las muestras deben analizarse de inmediato o guardarse en hielo durante dos horas máximo antes del análisis.

Si la muestra no se puede analizar en las dos horas según las pautas antes detalladas, debe congelarse a -70°C o menos.

Orina

El análisis MicroVue Ba puede llevarse a cabo utilizando las colecciones de orina sin conservantes de la primera micción de la mañana (First Morning Void - FMV) o de la segunda micción de la mañana (Second Morning Void - SMV). Se recomienda efectuar las colecciones antes de las 10:00 de la mañana para evitar cualquier posible influencia de la variación diurna. Para conservar la muestra de orina menos de un día, manténgala en la nevera a 2°C a 8°C; para una conservación más prolongada congélela a ≤ -70°C. No someta la muestra a más de 5 ciclos de congelación /descongelación. **Evite la exposición prolongada a la**

luz, especialmente a la luz solar. Durante el procesamiento de rutina, las muestras no se ven afectadas por la iluminación artificial normal del laboratorio.

Descongelación de las Muestras

Para minimizar el tiempo de manipulación de muestras, prepare una placa de dilución (o tubos) y agregue el volumen apropiado de diluyente (como se describe en la sección *Dilución de Muestras* más adelante) antes de descongelar las muestras para su evaluación.

Descongelar las muestras rápidamente en baño maría a 37°C y ponerlas inmediatamente en hielo para evitar una activación del complemento antes de la dilución. Mantenga las muestras en hielo durante un máximo de dos horas. No dejar la muestra a 37°C, porque se podría producir la activación del complemento. No descongelar las muestras a temperatura ambiente o sobre hielo ya que puede conducir a la activación del Ba y afectar los resultados. Las muestras deben analizarse lo antes posible después de su descongelación. Se pueden llevar a cabo hasta cinco ciclos de congelación/descongelación sin afectar a las muestras. Si las muestras requieren otra congelación para análisis posterior, Quidel sugiere congelar varias alícuotas para evitar la realización del exceso del número recomendado de ciclos de congelación y descongelación.

Dilución de Muestras

ADVERTENCIA: Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Usar las Precauciones Universales. No usar muestras inactivadas por calor, contaminadas o conservadas inadecuadamente.

NOTA: Consulte en la sección Descongelación de las Muestras para las notas importantes sobre los métodos adecuados para descongelar las muestras . La manipulación adecuada de la muestra es esencial para obtener resultados exactos.

Las muestras **deben** estar diluídas para que los valores esten por encima del LLOQ sin superar el valor del ULOQ del kit de Ba. Las muestras con lecturas fuera de este rango deben volver a analizarse con una nueva dilución.

Prepare una dilución adecuada (véase la siguiente sección) de cada muestra utilizando el Diluyente de Muestras. Para cada dilución, mezcle con suavidad para evitar la formación de espuma y burbujas. No almacenar o reusar las muestras diluídas. Una vez diluídas, las muestras deben añadirse a los pocillos en un máximo de 30 minutos.

Orina

Se recomienda que las muestras de orina sean diluídas 1:15 en Diluyente de Muestras para ser utilizadas en el inmunoensayo enzimático MicroVue Ba.

Plasma

Se recomienda que las muestras de plasma sean diluídas 1:1000 en Diluyente de Muestras en dos pasos:

1. 10 µl de muestra + 990 µl Diluyente de Muestras
2. 40 µl de muestra diluida + 360 µl Diluyente de Muestras.

Suero

Se recomienda que las muestras de suero sean diluídas 1:2000 en Diluyente de Muestras en dos pasos:

1. 10 µl de muestra + 990 µl Diluyente de Muestras
2. 20 µl de muestra diluida + 380 µl Diluyente de Muestras.

Muestras con niveles elevados de activación de complemento pueden requerir diluciones más altas a las mencionadas.

Incorporación de las muestras diluidas a la microplaca

Añadir las muestras diluidas a los pocillos en un plazo de 5 minutos de la aplicación de la primera muestra. Se puede usar cualquiera de los dos métodos para añadir las muestras diluidas, Patrones, Controles y tampón a los pocillos (consulte Paso 4 de *PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO*). Para ensayos donde se analizan pocas muestras, los reactivos y muestras diluidas pueden añadirse directamente al pocillo asignado con una micropipeta (100 µl/pocillo). Para trabajos más amplios Quidel recomienda el uso de pipetas multicanal.

Para añadir los Patrones, Controles y muestras diluidas en los pocillos lo más rápidamente posible, un procedimiento "replica de microplaca" puede ser empleado. En lugar de añadir 100 µl de cada Patrón, Control, o muestra diluida a los pocillos recubiertos con anticuerpos individualmente, 120 µl a 130 µl de cada solución se puede añadir a pocillos individuales en un placa en blanco (no incluido), correspondiente al patrón EIA final deseado. Después, todas las soluciones del ensayo que se hayan añadido a los pocillos en la placa en blanco, rápidamente se transfiere 100 µl de cada pocillo en blanco al pocillo recubierto de anticuerpo usando una micropipeta multicanal. Para evitar la posibilidad de contaminación cruzada, las puntas de pipeta se deben cambiar cada vez que hay un cambio en la composición de las muestras que deben transferirse.

El procedimiento "replica de microplata" puede usarse también para añadir las soluciones de Conjugado, Sustrato, y de Parada.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Traer todos los reactivos y materiales a 18°C a 26°C antes de su utilización.

Después de remover todos los reactivos y materiales necesarios, devolver el material no usado a las temperaturas apropiadas de almacenamiento (ver *ALMACENAMIENTO*).

Tiras recubiertas

Determinar el número de pocillos necesarios para el ensayo. Quidel recomienda probar el Diluyente de Muestra (blanco), los controles y Patrones por duplicado. Sacar las tiras que no sean usadas y colocarlas en la bolsa de almacenamiento, cerrar la bolsa, y devolverla a 2°C a 8°C. Colocar las tiras a usar en el ensayo en un armazon de ensayo.

Solución de Lavado

Mezclar el concentrado de solución de lavado 20X invirtiendo el frasco varias veces. Si la solución de lavado 20X concentrada se ha almacenado a 2°C a 8°C, y se han formado cristales, calentar en baño maría de 37°C a 50°C hasta que se disuelvan, y seguir mezclando bien. Preparar la Solución de Lavado diluyendo el contenido completo de una de las botellas de concentrado de solución de lavado 20X hasta un litro con agua destilada o desionizada. Mezclar bien. La solución de lavado es estable durante 30 días cuando se almacena en un recipiente limpio, a 2°C a 8°C. Si se produce decoloración o nubosidad, deseche el reactivo.

Patrones y Controles Ba

Los Patrones y Controles Ba se suministrados listos para usar y no se requieren dilución o preparación antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Leer las especificaciones y instrucciones del ensayo antes de empezar.

Ver *PELIGROS Y PRECAUCIONES* y *PREPARACIÓN DE REACTIVOS*.

1. Tome nota de las posiciones de los pocillos de microensayo correspondientes al blanco, todas las muestras, Patrones y Controles, así como los lotes de las etiquetas de los viales. Marcar una esquina de la microplaca para una mejor orientación.
2. Preparar las tiras del microensayo de la siguiente manera:
 - a. Añadir 300 µl de Solución de Lavado a cada pocillo utilizando una botella para lavado u otro dispositivo automatico.
 - b. Incubar los pocillos durante 1 minuto a 18°C a 26°C.
 - c. Aspirar el contenido de cada pocillo.
 - d. Añadir 300 µl de Solución de Lavado a cada pocillo.
 - e. Aspirar el contenido de cada pocillo.
 - f. Repetir los pasos d-e una vez más, para un total de tres lavados.**
 - g. Invertir la placa y golpear sobre papel absorbente para eliminar cualquier líquido restante.
3. Seleccionar un pocillo o más para utilizar de blanco. Añadir 100 µl del Diluyente de Muestra en el/los pocillo(s) que se usará(n) como blanco.
4. Añadir 100 µl de cada Patrón, Control, o muestra diluída a los pocillos de microensayo asignados por duplicado. **Añadir todas las muestras dentro de los 5 minutos de añadir la primera muestra.**
5. Incubar a 18°C a 26°C durante 60 ± 5 minutos.
6. Lavar los pocillo un total de 5 veces utilizando el siguiente procedimiento:
 - a. Aspirar el contenido de cada pocillo.
 - b. Añadir 300 µl de Solución de Lavado a cada pocillo utilizando una botella para lavado u otro dispositivo automatico.
 - c. Incubar los pocillos durante 1 minuto a 18°C a 26°C.
 - d. Aspirar el contenido de cada pocillo.
 - e. Invertir la placa y golpear sobre papel absorbente para eliminar cualquier líquido restante.
 - f. Añadir 300 µl de Solución de Lavado a cada pocillo.
 - g. Aspirar el contenido de cada pocillo.
 - h. Invertir la placa y golpear sobre papel absorbente para eliminar cualquier líquido restante entre cada lavado.
 - i. Repetir los pasos f-h tres veces más para un total de cinco lavados.**
 - j. Después del quinto ciclo de lavado, invertir la placa y golpear sobre papel absorbente para eliminar cualquier líquido restante.
7. Dispensar 100 µl de Conjugado Ba en cada pocillo, incluyendo los pocillos en blanco (Diluyente de Muestras), usando una pipeta multicanal o pipeta de repetición.
8. Incubar a 18°C a 26°C durante 60 ± 2 minutos.
9. Lavar los pocillos de la microplaca después de 60 minutos de incubación (paso 8), como se describe en el paso 6.
10. Inmediatamente después del proceso de lavado, dispensar 100 µl de Solución de Sustrato TMB en cada pocillo, incluyendo los pocillos en blanco.
11. Incubar a 18°C a 26°C durante 15 ± 1 minutos.
12. Añadir 100 µl de Solución de Parada a cada pocillo para detener la reacción enzimática. La Solución de Parada debe añadirse a los pocillos en el mismo orden que la Solución de Sustrato.
13. Golpee suavemente la placa para que la formación de color sea uniforme. **NOTA: Los resultados óptimos se obtienen usando la función "auto mix" del lector de placa (si existe) antes de la lectura.**
14. Determine el valor de absorbencia a 450 nm de cada pocillo de ensayo dentro de 10 minutos después de añadir la Solución de Parada (paso 12), realizando la corrección del pocillo en blanco de acuerdo con el sistema espectrofotométrico utilizado.
15. Determine la concentración de las muestras y los controles a partir de la curva estándar.
16. Deseche las muestras diluídas, controles y tiras usados (vea *ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES*).

CONTROL DE CALIDAD

El Certificado de Análisis incluido en este kit es específico a este lote y debe emplearse para comprobar que los resultados obtenidos por su laboratorio son similares a los obtenidos por Quidel Corporation.

Los rangos de Control de Calidad han sido proporcionados. Los valores de control verifican la validez de la curva y los resultados de las muestras. Cada laboratorio debe establecer sus propios parámetros para los límites aceptables de el ensayo. Si el control no está dentro de los valores de aceptación de su laboratorio, los resultados deben ser considerados como cuestionables, y las muestras deben ser repetidas.

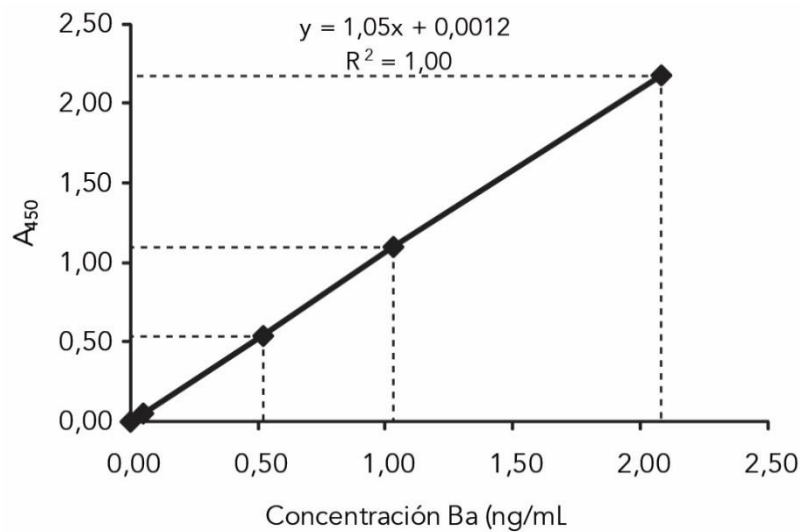
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Utilización de una Curva de Estándar

La curva estándar para Ba EIA es generada restando los valores de absorbancia del blanco (A_{450}) a cada Patrón (en el eje y) y la concentración asignada para cada Patrón (en el eje x). Después de la regresión lineal, la curva generada debe cumplir con los requisitos de validación (ver más abajo). La mayoría de los ordenadores y calculadoras es capaz de realizar estos cálculos.

Como alternativa, pueden representarse gráficamente los datos de forma manual y los valores (ng/ml) de las muestras de ensayo pueden leerse directamente de la línea de ajuste óptimo de la curva estándar. Un ejemplo de una curva estándar típica se muestra en la Figura 1.

Figura 1
Curva de Calibración Representativa



Muestra	A_{450}	ng/ml
Patrón A	0,000	0
Patrón B	0,052	0,05
Patrón C	0,539	0,52
Patrón D	1,098	1,03
Patrón E	2,176	2,08
$r = 1,000$	$m = 1,05$	$b = 0,0012$

Cálculo de la Concentración de Ba de las Muestras

La concentración Ba presente en cada muestra sin diluir se determina multiplicando la concentración de Ba ng/ml, determinada de la Curva Estándar del kit, por el inverso del factor de dilución aplicado.

Si los valores de absorbancia obtenidos de una muestra a A_{450} son superiores a los del Patrón más alto del kit (E), los resultados deben reportarse como "superior a" la concentración Ba del Patrón (E) multiplicado por el factor de dilución de la muestra. Si se requiere un valor más exacto de la concentración, la muestra de ensayo se debe volver a analizarse usando un factor más grande de dilución. En todas las repeticiones del ensayo, los Patrones y los Controles deben también ser procesados.

Validación

Determine la pendiente, intercepción, y el coeficiente de la línea de ajuste óptimo derivada. Los valores deben encontrarse dentro de los rangos especificados para aprobar el ensayo:

coeficiente de correlación (r): $\geq 0,98$
pendiente (m): entre 0,52 y 1,63
intercepción Y (b): entre (-)0,05 y 0,05

Referirse a las etiquetas de los viales o la Certificado de análisis del producto para el intervalo de concentración de Ba aceptable para los Controles Altos y Bajos.

LIMITACIONES

El inmunoensayo enzimático MicroVue Ba se ha utilizado para analizar muestras coleccionadas como orina, suero, o plasma en K2 EDTA. No se han analizado otros anticoagulantes.

VALORES DE MUESTRAS

EDTA plasma de treinta y cinco (35) donantes, suero de veintinueve (29) donantes y orina de diez y seis (16) donantes normales fueron probados con el kit de inmunoensayo enzimático MicroVue Ba. Los resultados se presentan abajo.

Muestra	n	Media (ng/ml)	Rango (ng/ml)
EDTA Plasma	35	658	226 a 2153
Serum	29	1642	436 a 3362
Orina	16	7,7	0,6 a 27,0

NOTA: El comportamiento de la media y la Desviación Estandar (DE) de las concentraciones del fragmento Ba determinada de muestras de plasma y suero pueden variar entre laboratorios. Se recomienda que cada laboratorio determine la media y la desviación estandar de las concentraciones de fragmento Ba.

FUNCIONAMIENTO DEL ENSAYO

Limites

LOD: El límite de detección (LOD) para el ensayo Ba es 0,011 ng/ml, determinada por el límite superior de DE 3 en el estudio de Patrón cero.

LLOQ: El límite de cuantificación inferior (LLOQ) para el ensayo Ba es 0,033 ng/ml, la concentración más baja de la curva de estándar que cumple los criterios de exactitud y precisión.

ULOQ: El límite de cuantificación superior (ULOQ) para el ensayo Ba es 3,239 ng/ml, la concentración más elevada que cumple los criterios de exactitud y precisión.

Interferencias

Las siguientes sustancias fueron analizadas con las concentraciones especificadas en el ensayo de Ba y no se comprobaron interferencias con el ensayo utilizando muestras de plasma o suero:

Sustancia	Concentración
Bilirubina	40 mg/dL
Hemoglobina	500 mg/dL
Triclicéridos	3000 mg/dL
Glucosa	1200 mg/dL
Colesterol	500 mg/dL
Albumina	6000 mg/dL
Gamma globulina	6000 mg/dL

Las siguientes sustancias fueron analizadas con las concentraciones especificadas en el ensayo de Ba y no se comprobaron interferencias con el ensayo utilizando muestras de orina:

Sustancia	Concentración
Acetona	1000 mg/dL
Creatinina	500 mg/dL
Glucosa	2000 mg/dL
Bilirubina	0,25 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Urea	6000 mg/dL

Las siguientes sustancias se han encontrado obstructivo usando las muestras de orina mediante ensayo:

Sustancia	Concentración
Albumina	340 mg/dL
Cloruro de Sodio	170 mg/dL

Precisión

Se determinó la precisión intra-ensayo e inter-ensayo analizando 20 réplicas de 1 muestra de plasma, 1 muestra de suero, y 2 muestras de orina en 10 ciclos diferentes.

Muestra	Ba (ng/ml)	Intra-ensayo ¹ C.V. (%)	Inter-ensayo ² C.V. (%)
EDTA Plasma	376,0	3,3	2,4
Suero	1111	2,3	8,1
Orina	1,925	2,2	7,6
	22,98	2,2	3,4

¹n = 20 réplicas ²n = 10 ciclos

Linealidad

La linealidad fue determinada por la dilución seriada de muestras y comparando los valores observados y esperados. Resultados típicos son proveidos enseguida:

Muestra	Factor de dilución	Observado (ng/ml) ³	Esperado (ng/ml) ³	Recuperación (%)
EDTA Plasma	1:1000	0,634	0,634	100,0
	1:1500	0,424	0,423	100,3
	1:2000	0,323	0,317	101,9
	1:3000	0,219	0,211	103,6
Serum	1:2000	1,464	1,464	100,0
	1:3000	0,986	0,976	101,0
	1:4000	0,734	0,732	100,3
	1:5000	0,580	0,586	99,0
Urine	1:15	0,106	0,106	100,0
	1:20	0,078	0,0795	98,1
	1:25	0,064	0,0636	100,6
	1:30	0,058	0,053	109,4

³Dilution factor not included

Recuperación

Se realizó la recuperación de la concentración máxima mediante el aumento a las muestras con una cantidad conocida de Ba purificado y comparando los valores observados con los esperados.

Maestra	Ba (ng/ml)	Aumento (ng/ml)	Resultado (ng/ml)	Recuperación (%)
Plasma 1	593,1		857,8	103,8
Plasma 2	356,6	233,3	646,4	109,6
Plasma3	590,0		845,5	102,7
Serum 1	1194		1664	99,0
Serum2	2088	486,4	2648	102,8
Serum3	2497		2953	99,0
Urine 1	1,115		4,026	92,5
Urine 2	1,711	3,237	4,891	98,8
Urine 3	21,37		23,97	97,4

ASISTENCIA

Para realizar un pedido o para recibir asistencia técnica, póngase en contacto con su distribuidor local. Información adicional de Quidel, nuestros productos y nuestros distribuidores puede encontrarse en nuestra página web quidel.com.

REFERENCIAS

1. Wan K.C, Lewis W.H.P, Leung P.C., Chien P. Hung L.K. 1998. "A longitudinal study of C3, C3d and factor Ba in burn patients in Hong Kong." *Burns* 24(3): 241-44.
2. Sundsmo J., Chin J., Papin R., Fair D., Werb Z. 1985. "Factor B, The complement alternative pathway serine proteinase, is a major constitutive protein synthesized and secreted by resident and elicited mouse macrophages." *J Exp Med* 161:306-22.
3. Ueda A., Kearney J., Roux K., Volanakis J. 1986. "Probing functional sites on complement protein B with monoclonal antibodies." *J Immunology* 138 (4):1143-49.
4. Ambrus J., Peters M., Fauci A., Brown E. 1990. "The Ba fragment of complement factor B inhibits human B lymphocyte proliferation." *J Immunology* 144(5):1549-53.
5. Schreiber, R.D. and Muller-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. 411-31.
6. Gotze, O. and Muller-Eberhard, H.J. 1976. The alternative pathway of complement activation. *Adv. Immunol.* 24:1-35.
7. 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(5):259-63.
8. Pangburn, M.K. and Muller-Eberhard, H.J. 1984. The alternative pathway of complement. *Springer Seminars Immunopathol* 7:163.
9. Ratnoff, W.E., Fearon, D.T., and Austen, K.F. 1983. The role of antibody in the activation of the alternative complement pathway. *Springer Seminars Immunopathol* 6:361.
10. Hugli, T.E. 1986. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *Complement* 3:111-27.
11. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1977. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosanbound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 74(4):1683-87.
12. 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(11): 5867-71.
13. Fishelson, Z. and Muller-Eberhard, H.J. 1984. Residual hemolytic and proteolytic activity expressed by Bb after decay-dissociation of C3b, Bb. *J Immunol* 132(3):1425-29.
14. Gotze, O., Bianco, C. and Cohn, Z.A. 1979. The induction of macrophage spreading by Factor B of the properdin system. *J Exp Med* 149:372.

15. Kolb, W.P., Morrow, P.R. and Tamerius, J.D. 1989. Ba and Bb Fragments of Factor B activation: Fragment production, biological activities, neopeptide expression and quantitation in clinical samples. *Complement And Inflammation* 6:175.
16. Sefton, M.V., et al. 1994. "Using ELISA to evaluate complement activation by reference biomaterials." *J Mat Sci* 5:622-27.
17. Mold, C. Tamerius, J.D., et al. 1995 "Complement activation during painful crisis in sickle cell anemia" *Clinical Immunology And Immunopathology* 70(3):314-20.
18. 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):1178-88.
19. Buyon J, Tamerius J. et al. 1992. "Assessment of Disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus" *Arthritis And Rheumatism* 35(9):1028-36.
20. Oppermann M., Kurts C., Zierz R., Quentin E., Weber M., and Gotze O. 1991. "Elevated plasma levels of the immunosuppressive complement fragment Ba in renal failure." *Intl Soc Nephrology* 40:939-47.
21. Prydzial E., Isenman D. 1987. "Alternative complement pathway activation fragment Ba binds to C3b." *JBC* 262(4):1519-25.
22. Buyon J., Tamerius J., Ordorcia S., Young B., Abramson S. 1992. "Activation of the alternative complement pathway accompanies disease flares in systemic lupus erythematosus during pregnancy." *Arth And Rheum* 35(1):56-61.
23. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 2007. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition*. Washington: U.S. Government Printing Office.
<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>.
24. Mollnes, T.E., P. Garred, and G. Bergseth. 1988. Effect of time, temperature and anticoagulants on *in vitro* complement activation: Consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clin Exp Immunology*. 73:484-88.
25. Centers for Disease Control. 1987. "Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings." *MMWR*. 36 (suppl. No. 2S):001.

REF A034 – MicroVue Ba 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

PIA034000ES00 (02/17)

GLOSARIO

REF

Número del catálogo



Marca CE de conformidad

EC REP

Representante autorizado
en la Comunidad Europea

LOT

Código de lote



Fecha de caducidad



Fabricante



Limites de temperatura



Indicaciones



Consulte los instrucciones
e-etiquetado de uso



Riesgo biológico

IVD

Para uso diagnóstico *in vitro*



Contiene una cantidad suficiente para
96 determinaciones

CONT

Contenido / Contiene

CONTROL

Control
