

Pour le dosage quantitatif du fragment Ba du facteur B, d'un indicateur de l'activation de la voie alternative du complément, dans les urines, le plasma et le sérum humains

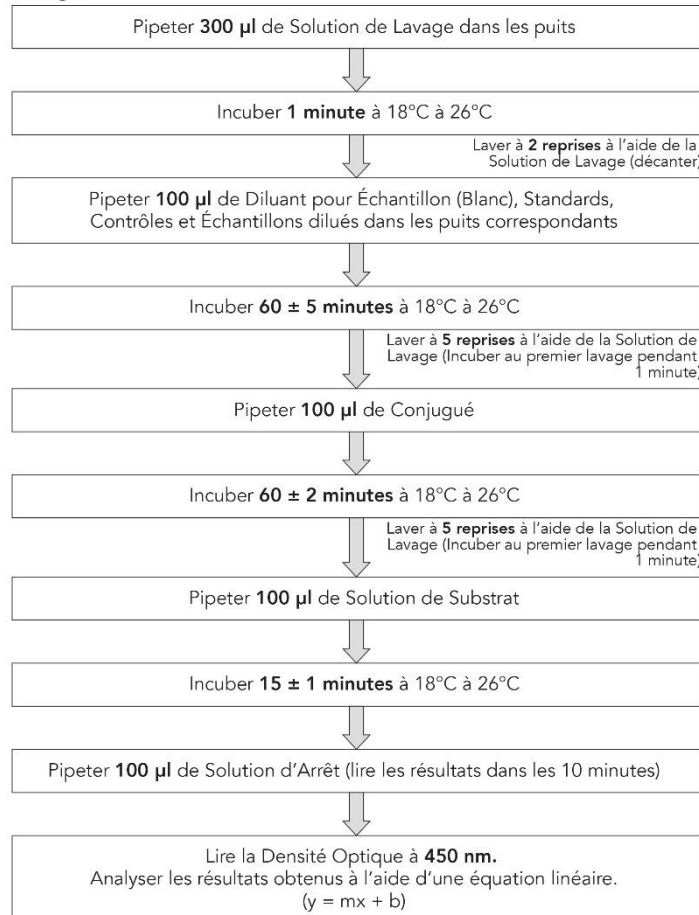
À des fins de diagnostic *in vitro* uniquement. Réservé à l'export. Non destiné à la vente aux États-Unis ou au Canada.

RÉSUMÉ

Préparation des Réactifs, Standards, Contrôles et Échantillons

- Diluer la solution concentrée de lavage 1:20 à l'aide d'eau distillée
- Diluer les Échantillons d'urine 1:15 à l'aide du Diluant pour Échantillon (Par ex: 25 µl d'échantillon + 350 µl de diluant)
- Diluer les Échantillons de plasma 1:1000 à l'aide du Diluant pour Échantillon en deux étapes (Par ex: 10 µl d'échantillons + 990 µl de diluant > 40 µl d'échantillons dilués + 360 µl de diluant)
- Diluer les Échantillons de sérum 1:2000 à l'aide du Diluant pour Échantillon en deux étapes (Par ex: 10 µl d'échantillons + 990 µl de diluant > 20 µl d'échantillons dilués + 380 µl de diluant)

Dosage





INTÉRÊT CLINIQUE

Le kit de dosage enzymatique Ba de MicroVue mesure le taux de Fragment Ba du Complément, un fragment du Facteur B activateur dans la voie alternative du complément, dans les urines, le plasma et le sérum humains. La détection de Ba dans les urines, le plasma ou le sérum met en évidence l'implication de la voie alternative du complément. La mesure de l'activation de cette voie alternative apporte une aide dans le diagnostic de plusieurs pathologies rénales (par ex: glomérulonéphrite chronique, néphrite lupique) ainsi que dans celui de plusieurs maladies de peau (par ex: dermatite herpétiforme et pemphigus vulgaire); on observe également l'activation de cette voie alternative dans d'autres maladies telles que la dégénérescence maculaire associée à l'âge, la perte du fœtus au cours d'une grossesse à risque, la polyarthrite rhumatoïde, et l'anémie falciforme.^{1,4,14-22}

RÉSUMÉ ET EXPLICATIONS

La voie alternative du complément procure une protection innée contre les agents microbiens, en l'absence d'anticorps spécifique.⁵⁻⁹ L'activation de cette voie du complément peut être provoquée par diverses substances telles que des polysaccharides ou des lipides microbiens, des lipopolysaccharides bactériens gram-négatifs et des déterminants de surface présents sur certains virus, parasites, cellules de mammifères infectées et cellules cancéreuses. Dans les maladies auto-immunes, la voie alternative du complément peut contribuer directement à l'atteinte tissulaire.

Une importante réaction centrale survient au cours de la voie alternative du complément, c'est la conversion du Facteur B zymogène de PM 93Kd en une enzyme protéolytique active. Cette conversion s'accomplit en 2 étapes. Au cours de la 1^{ère} étape, le Facteur B forme un complexe magnésium dépendant avec C3(H₂O) ou avec C3b.⁸ Le complexe C3(H₂O),B se forme seulement en phase liquide, tandis que le complexe C3b,B peut se former soit en phase liquide, soit sur une surface cible.⁵⁻⁸ Le Facteur B (présent dans le complexe C3(H₂O),B ou C3b,B) est clivé en fragments Ba (33 Kd) et Bb (60 Kd) au cours de la 2^{ème} étape par une enzyme de la voie alternative, le Facteur D.^{5-8,13}

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

En dosant dans les échantillons les produits issus du clivage du Facteur B, on peut estimer l'importance de l'utilisation de la voie alternative au moment du recueil de l'échantillon dans le cadre de la maladie que l'on étudie. Le dosage EIA Ba de MicroVue permet une mesure simple, rapide, non radioactive, très spécifique, et quantitative de l'activation du Facteur B. Il est idéal dans les études impliquant le rôle ou l'état de l'activation de la voie alternative du complément, dans de nombreux projets cliniques ou de recherche, et pour suivre la production de Ba *in vitro*.

PRINCIPE DU DOSAGE

Le dosage EIA Ba de MicroVue pour la mesure de Ba dans l'urine, le plasma ou le sérum humain est un dosage en 3 étapes qui utilise (1) une microplaque coatée par de l'anticorps monoclonal de souris spécifique du Ba humain, (2) conjugué de peroxydase de raifort et d'anticorps polyclonal anti-Facteur B, (3) un substrat chromogénique.

Dans la première étape, les Standards, Contrôles et les échantillons à doser sont ajoutés dans les micro puits pré-coatés par l'anticorps monoclonal de souris spécifique du Ba humain. Le fragment Ba présent

dans les Standards, Contrôles ou échantillons se fixera sur l'anticorps monoclonal anti-Ba, mais pas le Fragment B, ni les autres produits de l'activation du complément. Après incubation, un cycle de lavage élimine le matériel non lié.

Lors de la deuxième étape, on ajoute dans tous les puits conjugué de peroxydase de raifort et d'anticorps polyclonal anti-Facteur B. L'enzyme conjuguée à l'anti-Facteur B se lie sur le Ba fixé précédemment sur la paroi des micropuits. Après l'incubation un cycle de lavage élimine le conjugué non lié, en excès.

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

RÉACTIFS ET MATÉRIEL FOURNIS

96 puits pour le dosage du fragment Ba du Facteur B

Le kit de dosage enzymatique MicroVue Ba contient les éléments suivants:

- | | | |
|--|---|--------------------------------|
| A | | |
| B Standards Ba | Réf: 5159 – 5163 | 5 flacons 1,5 ml chacun |
| C | Prêts à l'emploi. Contiennent des concentrations connues en Ba (ng/ml) dans du sérum humain et des | |
| D | stabilisants protéiques | |
| E | | |
| L Contrôle Faible | Réf: 5164 | 1,5 ml |
| | Prêt à l'emploi. Contient une concentration connue en Ba (ng/ml) dans du sérum humain et des stabilisants protéiques | |
| H Contrôle Fort | Réf: 5165 | 1,5 ml |
| | Prêt à l'emploi. Contient une concentration connue en Ba (ng/ml) dans du sérum humain et des stabilisants protéiques | |
| ① Barrettes de puits | Réf: 5166 | 12 barrettes |
| | Chaque barrette comporte 8 puits coatés par un anticorps monoclonal murin spécifique du Ba humain dans un sachet d'aluminium re-scellable | |
| ② Solution d'Arrêt | Réf: A9947 | 12 ml |
| | Contient de l'Acide Chlorhydrique 1N (4%) | |
| ③ Solution de lavage concentrée 20X | Réf: A9957 | 2 x 50 ml |
| | Contient du tampon phosphate (PBS), 1.0% Tween-20®, et 0,035% ProClin® 300 | |
| ④ Diluant pour échantillon | Réf: A3670 | 50 ml |
| | Contient du PBS, 0,05% Tween-20, 2.5% de stabilisants protéiques et 0,035% ProClin 300 | |
| ⑤ Substrat TMB | Réf: 5059 | 12 ml |
| | Contient du 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) | |
| ⑥ Conjugué Ba | Réf: 5167 | 12 ml |
| | Contient un conjugué de peroxydase de raifort et d'anticorps polyclonal anti-Facteur B en solution dans un tampon stabilisant pour la peroxydase de raifort avec conservateur | |

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

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Minuteur (60 minutes)

- 1 plaque de dilution de 96 puits ou des tubes à essai et des portoirs pour la dilution d'échantillons (facultatif)
- Plaques à usage unique pour la méthode de la double plaque
- Récipient gradué pour la dilution de la Solution de Lavage
- Bouteille de lavage ou tout autre équipement de lavage validé
- Micropipettes et embouts de pipette jetables
- Des récipients pour ajouter le conjugué, le substrat et les solutions d'arrêt à la plaque (utiliser des récipients propres et non utilisés pour chaque réactif)
- Multipipette ajustable (8 ou 12 canaux) ou pipetteur automatique
- Pipettes de 1 ml, 5 ml et 10 ml
- Lecteur de plaques pouvant lire des densités optiques A_{450} comprises entre 0,0 et 3,0
- Eau désionisée ou distillée

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Pour utilisation *In vitro*.
- Traiter tous les échantillons comme des produits potentiellement dangereux. Suivre les précautions standard lors de la manipulation de cette trousse et des échantillons de patients.
- Utiliser ensemble tous les réactifs avant la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de la boîte.
- Suivre les recommandations pour la conservation des réactifs.
- Ne pas utiliser les barrettes de puits si leur emballage est abîmé.
- Le ProClin 300 est un conservateur. Tout contact ou ingestion accidentels de tampons ou de réactifs contenant du ProClin peut entraîner une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Appeler un médecin si on observe ces symptômes.
- La solution d'Arrêt est une solution corrosive et peut provoquer des irritations. Ne pas ingérer. Eviter tout contact avec les yeux, la peau et les vêtements. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.
- Chaque prélèvement utilisé dans la préparation des standards et des contrôles de ce kit provient d'un donneur individuel, et a subi à l'aide d'une méthode approuvée par la FDA un dépistage négatif pour HIV1, HIV2, HCV et HBsAg. Aucune méthode de test ne pouvant garantir totalement l'absence d'agents infectieux, ces réactifs doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.²³
- L'utilisation de multipettes ou de pipetteurs automatiques est recommandée pour limiter le temps de distribution des réactifs.
- Pour obtenir une mesure précise des échantillons, pipeter avec précautions les échantillons et les standards en utilisant du matériel calibré.
- Pour obtenir des résultats précis, il est indispensable de recueillir et de conserver correctement les échantillons. (Se reporter au paragraphe « *RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS* »).
- Eviter toute contamination microbienne ou croisée des échantillons ou des réactifs.
- Doser chaque échantillon en double.
- Ne pas utiliser un puits pour plus d'un test.
- Toute modification du temps et de la température d'incubation indiqués dans le protocole de dosage peut entraîner des résultats erronés.
- Le substrat TMB doit être protégé de la lumière et de tout contact avec du métal ou du caoutchouc pendant le stockage et l'incubation. Éviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau.
- Ne pas laisser les puits sécher pendant le dosage.
- Lors de l'addition ou de l'aspiration des liquides dans les puits, ne pas gratter ou toucher le fond des puits.
- Des échantillons inactivés par la chaleur, lipidiques ou contaminés peuvent donner des résultats erronés.
- Pour éviter la formation d'aérosols pendant le lavage, aspirer le liquide de lavage dans une bouteille contenant de l'eau de javel.

- On utilisera une bouteille de lavage ou un système de remplissage automatique pour laver les microplaques (voir le protocole de *DOSAGE*, étape 6). Ne pas utiliser de multipipette pour le lavage de 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 à 2°C à 8°C avant ouverture.

INDICATIONS D'INSTABILITÉ OU DE DÉTÉRIORATION DES RÉACTIFS

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

RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Manipuler et éliminer les échantillons selon la réglementation en vigueur.

Toutes les manipulations d'échantillons doivent être faites à 2°C à 8°C.

Recueil des échantillons

Sérum/Plasma

Pendant la coagulation, on observe une activation du complément, c'est pourquoi la concentration de Ba mesurée dans les échantillons de sérum humain est supérieure à celle qu'on observera dans les échantillons de plasma EDTA. Les taux de Ba présents dans le plasma EDTA peuvent donc être considérés comme plus représentatifs de la concentration *in vivo*.

Le fragment Ba du Facteur B est susceptible d'entraîner une protéolyse dans des échantillons prélevés ou stockés de manière inappropriée, et le Ba peut être généré lors de manipulations inadéquates à travers une activation artificielle du complément. C'est pourquoi, *le recueil, la manipulation et la conservation des échantillons sont importants dans la mesure.*²⁴ Pour obtenir des résultats optimaux sur le plasma, il est recommandé d'utiliser des tubes de prélèvement EDTA K2.

On prélèvera les échantillons de sérum ou de plasma EDTA de façon aseptique, selon les techniques standard.²⁵ Doser immédiatement les échantillons ou bien les conserver sur de la glace (2 heures maximum) jusqu'au dosage.

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

Urine

Le dosage de Ba MicroVue peut être effectué sur des prélèvements d'urine réalisés sans conservateur sur la première ou la deuxième miction du matin. Il est recommandé de procéder aux prélèvements avant 10 h du matin pour remédier à toute influence potentielle de variations diurnes. Conserver l'échantillon d'urine à 2°C à 8°C pendant au maximum 24 heures, ou le congeler à ≤ -70°C. Ne pas soumettre les échantillons à plus de 5 cycles de congélation/ décongélation. **Éviter toute exposition prolongée à la lumière, en**

particulier au soleil. Pendant le dosage, les échantillons ne sont pas affectés par la lumière normale, artificielle du laboratoire.

Congélation/Décongélation des Échantillons

Afin de réduire au maximum la durée de manipulation des échantillons, préparer une plaque de dilution (ou des tubes) et ajouter le volume de diluant indiqué (comme décrit ci-dessous dans la section *DILUTION DE L'ÉCHANTILLON*) avant de décongeler les échantillons pour l'évaluation.

Décongeler rapidement les échantillons congelés à 37°C. Placer immédiatement les échantillons tout juste décongelés sur de la glace avant de faire la dilution, afin d'empêcher l'activation du complément. *Ne pas laisser les échantillons sur la glace plus de deux heures. Ne pas laisser les échantillons à 37°C, car on risque d'observer une activation du complément.* Ne pas décongeler les échantillons à température ambiante ou sur de la glace, ce qui pourrait entraîner une activation du Ba, et modifier les résultats. Doser aussitôt que possible les échantillons après leur décongélation. Il est possible de réaliser jusqu'à cinq cycles de congélation/ décongélation sans que cela affecte les échantillons. S'il est nécessaire de recongeler des échantillons pour une analyse ultérieure, Quidel recommande de préparer plusieurs aliquotes, afin d'éviter de dépasser le nombre de cycles gel-dégel recommandé.

Dilution des échantillons

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

REMARQUE: Se reporter au paragraphe *CONGELATION/ DECONGELATION DES ECHANTILLONS* pour savoir comment bien décongeler les échantillons. Une bonne manipulation des échantillons est essentielle pour obtenir des résultats fiables.

Les échantillons **doivent** être dilués de telle sorte que les valeurs de A_{450} observées soient supérieures à la PPQM et ne soient pas supérieures à la valeur de A_{450} de la LQS. Les échantillons dont les valeurs de A_{450} se trouvent en dehors de cette fourchette doivent être redosés avec une autre dilution.

Préparer une dilution appropriée (voir la section suivante) de chacun des échantillons à l'aide du Diluant pour échantillon. Mélanger doucement en évitant la formation de mousse ou de bulles. Ne pas conserver ou réutiliser les échantillons dilués. Après dilution, les échantillons doivent être pipetés dans les puits dans les 30 minutes qui suivent la dilution.

Urine

Dans le dosage MicroVue Ba, il est recommandé de diluer les échantillons d'urine au 1:15 avec le Diluant pour Echantillon.

Plasma

Dans le dosage MicroVue Ba, il est recommandé de diluer les échantillons de plasma au 1:1000 avec le Diluant pour Echantillon en deux étapes:

1. 10 µl plasma à doser + 990 µl Diluant pour Echantillon
2. 40 µl de la dilution précédente + 360 µl Diluant pour Echantillon

Sérum

Dans le dosage MicroVue Ba, il est recommandé de diluer les échantillons de sérum au 1:2000 avec le Diluant pour Echantillons en deux étapes:

1. 10 µl sérum à doser + 990 µl Diluant pour Echantillon
2. 20 µl de la dilution précédente + 380 µl Diluant pour Echantillon

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

Addition des échantillons dilués dans les puits

Cette opération doit durer moins de 5 minutes. L'une des 2 méthodes suivantes pourra être utilisée pour l'addition des échantillons dilués, des standards, des contrôles et du tampon dans les puits (voir l'étape 4 du *DOSAGE*). Pour doser quelques échantillons, les échantillons dilués et les autres réactifs peuvent être ajoutés directement dans les puits correspondants à l'aide d'une micropipette (100 µl/puits). Pour des séries, en particulier si le nombre d'échantillons est important, Quidel recommande d'utiliser la méthode décrite ci-dessous:

Afin d'ajouter les Standards, Contrôles et échantillons dilués aussi vite que possible dans les puits, à l'aide d'une multipipette, on ajoute 120 µl à 130 µl de chaque Standard, Contrôle ou échantillon dilué dans les puits d'une plaque vierge (non fournie), en respectant le même ordre que la microplaque du kit. Lorsque tous les échantillons à tester ont été ajoutés dans les puits de la plaque vierge, on pourra rapidement, à l'aide d'une multipipette, transférer 100 µl de chaque puits de cette plaque vierge vers les puits recouverts d'anticorps. Afin d'éviter toute contamination croisée, on changera les embouts de la multipipette à chaque nouvelle série d'échantillons.

On peut également employer cette technique de deuxième plaque pour ajouter le Conjugué, le Substrat et la Solution d'Arrêt.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Amener tous les réactifs à 18°C à 26°C avant usage.

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

Barrettes de puits

Déterminer le nombre de barrettes nécessaires pour le dosage. Il est conseillé de doser les blancs, les Standards et les Contrôles en duplicatas. Placer ces barrettes sur le support, refermer avec soin la pochette contenant le reste des barrettes et la conserver à 2°C à 8°C.

Solution de Lavage

Mélanger la Solution de Lavage Concentrée 20X en inversant à plusieurs reprises le flacon. Si la Solution de Lavage Concentrée 20X a été conservée à 2°C à 8°C, on peut observer la formation de cristaux. Pour dissoudre ces cristaux, réchauffer le flacon dans un bain Marie à 37°C à 50°C jusqu'à dissolution, et mélanger soigneusement. Préparer la Solution de Lavage en diluant le contenu d'un des flacons de Solution de Lavage Concentrée 20X dans de l'eau distillée ou désionisée, afin d'obtenir un volume final de 1 litre. Bien mélanger. La Solution de Lavage est stable 30 jours à 2°C à 8°C. Éliminer le réactif en cas d'apparition de trouble ou de décoloration.

Les Standards et Les Contrôles Ba

Les Standards et les Contrôles ne nécessitent pas de dilution ou de préparation avant usage.

DOSAGE

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

Voir les paragraphes AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS et PRÉPARATION DES RÉACTIFS.

1. Noter les positions des puits correspondant aux Blancs, Échantillons, Standards et Contrôles, ainsi que les numéros de lot indiqués sur les étiquettes des flacons. Repérer un coin de la plaque.
2. Préparer les barrettes de la façon suivante.
 - a. A l'aide d'un système de lavage ou d'un laveur automatique, ajouter environ 300 µl de Solution de Lavage dans chaque puits.
 - b. Incuber les puits 1 minute à 18°C à 26°C.
 - c. Aspirer le contenu des puits.
 - d. Ajouter environ 300 µl de Solution de Lavage dans chaque puits.
 - e. Aspirer le contenu des puits.
 - f. Répéter les étapes d-e encore une fois, on aura donc au total 3 lavages.**
 - g. Inverser la plaque en la tapotant fermement sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
3. Sélectionner 1 ou plusieurs puits pour servir de blanc(s). Ajouter 100 µl de Diluant pour échantillon dans ces puits.
4. Ajouter 100 µl de chaque Standard de Ba, de Contrôle ou d'échantillon dilué dans les puits choisis pour contenir les doubles. **Cette étape doit être réalisée en moins de 5 minutes.**
5. Incuber à 18°C à 26°C pendant 60 ± 5 minutes.
6. Laver les puits à 5 reprises:
 - a. Aspirer le contenu de chaque puits.
 - b. A l'aide d'un système de lavage ou d'un laveur automatique, ajouter environ 300 µl de Solution de Lavage dans chaque puits.
 - c. Incuber les puits 1 minute à 18°C à 26°C.
 - d. Aspirer le contenu des puits.
 - e. Inverser la plaque en la tapotant fermement sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
 - f. Ajouter environ 300 µl de Solution de Lavage dans chaque puits.
 - g. Aspirer le contenu des puits.
 - h. Inverser la plaque en la tapotant fermement sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
 - i. Répéter les étapes f-h encore trois fois pour un total de cinq lavages.**
 - j. Après le 5^{ème} lavage, inverser la plaque en la tapotant fermement sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
7. A l'aide d'une multipipette, ou d'une pipette automatique, pipeter 100 µl de Conjugué Ba dans chaque puits, y compris ceux qui correspondent au Blanc.
8. Incuber les barrettes à 18°C à 26°C pendant 60 ± 2 minutes.
9. Laver les barrettes après l'incubation (étape 8) selon le procédé décrit à l'étape 6.
10. Aussitôt après le lavage, pipeter 100 µl de la Solution de Substrat TMB dans tous les puits, y compris ceux qui correspondent au Blanc.
11. Incuber les barrettes à 18°C à 26°C pendant 15 ± 1 minutes.
12. Ajouter 100 µl de Solution d'Arrêt dans tous les puits pour arrêter la réaction enzymatique. Ajouter la Solution d'Arrêt dans le même ordre et avec la même vitesse que lors de l'addition de la Solution de Substrat.
13. Tapoter doucement la plaque sur la paille pour permettre un développement uniforme de la coloration. **REMARQUE: On obtiendra de meilleurs résultats si on utilise la fonction auto-mix du lecteur de microplaques (si elle existe) juste avant de lire la plaque.**
14. Lire l'absorption à 450 nm dans 10 minutes qui suit l'addition de la Solution d'Arrêt (étape 12), en faisant une correction pour le blanc en fonction du spectromètre utilisé.
15. Lire la concentration des échantillons et des Contrôles à partir de la courbe standard.
16. Éliminer le reste des échantillons dilués et barrettes utilisées (voir le paragraphe *ATTENTION*).

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le certificat d'Analyse inclus dans le kit est spécifique du lot et doit être utilisé pour vérifier si les résultats obtenus dans votre laboratoire sont semblables à ceux obtenus par Quidel Corporation.

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

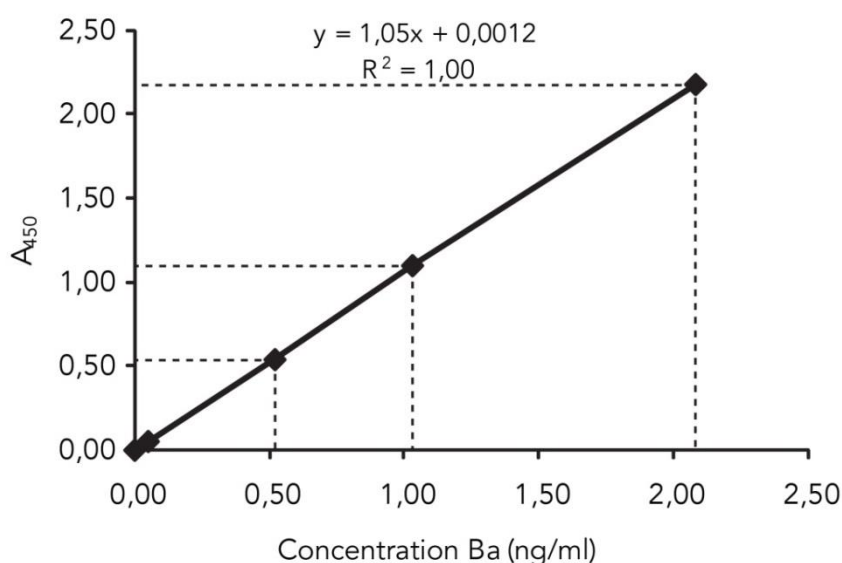
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Exemple de Courbe Standard

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

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

Figure 1
Courbe Représentative



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

Calcul de la concentration de Ba des échantillons

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

Si la valeur obtenue à A_{450} d'un échantillon donné est supérieure à celle du Standard le plus élevé du kit (E), on rendra un résultat « supérieur à » la concentration du Standard le plus élevé du kit (E) multiplié par le facteur de dilution de l'échantillon. Si on souhaite obtenir une valeur plus précise, on redosera l'échantillon en le diluant davantage. On devra également redoser les Standards et les Contrôles du kit Ba.

Validation

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

coefficient de corrélation (r): $\geq 0,98$
pente (m): entre 0,52 et 1,63
interception aec l'axe des y (b): entre (-)0,05 et 0,05

Se reporter aux étiquettes des flacons ou à la fiche de contrôle pour connaître les fourchettes de concentrations correspondant aux Contrôles Fort et Faible.

LIMITATIONS

On a utilisé le kit de dosage enzymatique MicroVue du Ba pour doser des échantillons d'urine, de sérum ou de plasma K2 EDTA. On n'a pas testé d'autres anti-coagulants.

VALEURS OBSERVÉES

On a dosé 35 échantillons de plasmas EDTA, 29 sérums, et 16 urines provenant de donneurs sains à l'aide du kit de dosage enzymatique MicroVue du fragment Ba. Les résultats sont présentés ci-dessous:

Échantillons	n	Moyenne (ng/ml)	Valeurs extrêmes (ng/ml)
EDTA Plasma	35	658	226 à 2153
Sérum	29	1642	436 à 3362
Urine	16	7,7	0,6 à 27,0

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

CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

Limites

LD: La limite de détection (LD) pour le dosage de Ba est de 0,011 ng/ml, calculée comme la limite supérieure obtenue pour 3DS dans une étude de précision réalisée à l'aide du standard zéro.

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

LQS: La limite de quantification supérieure (LQS), mesurable par le dosage de Ba est de 3,239 ng/ml. C'est la plus forte concentration lue à partir de la courbe standard, en suivant les recommandations du CLSI pour l'exactitude et la précision.

Substances Interférantes

On n'a pas observé d'interférences pour les substances suivantes, testées selon les concentrations indiquées en utilisant des échantillons de plasma ou de sérum.

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

On n'a pas observé d'interférences pour les substances suivantes, testées selon les concentrations indiquées en utilisant des échantillons d'urine.

Substance	Concentration
Acétone	1000 mg/dl
Créatinine	500 mg/dl
Glucose	2000 mg/dl
Bilirubine	0,25 mg/dl
Hémoglobine	200 mg/dl
Urée	6000 mg/dl

Les substances suivantes ont montré une interférence dans les échantillons d'urine:

Substance	Concentration
Albumine	340 mg/dl
Chlorure de Sodium	170 mg/dl

Précision

On a dosé à 20 reprises un échantillon de plasma EDTA, un échantillon de sérum, et deux échantillons d'urine (Précision intra essai) et on a dosé ces mêmes échantillons dans 10 dosages différents (Précision inter-essais).

Echantillon	Ba (ng/ml)	CV Intra-essai¹ (%)	CV Inter-essais² (%)
EDTA Plasma	376,0	3,3	2,4
Sérum	1111	2,3	8,1
Urine	1,925	2,2	7,6
	22,98	2,2	3,4

¹n = 20 répliques ²n = 10 dosages

Linéarité

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

Echantillon	Facteur de Dilution	Observé (ng/ml) ³	Attendu (ng/ml) ³	Récupération (%)
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
Sérum	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

³Facteur de dilution non inclus

Récupération

On a calculé le pourcentage de récupération obtenu en surchargeant les échantillons avec une quantité connue de Ba purifié et en comparant les valeurs observées avec les valeurs attendues.

Echantillon	Ba (ng/ml)	Quantité ajoutée (ng/ml)	Résultat (ng/ml)	Récupération (%)
Plasma 1	593,1		857,8	103,8
Plasma 2	356,6	233,3	646,4	109,6
Plasma 3	590,0		845,5	102,7
Sérum 1	1194		1664	99,0
Sérum 2	2088	486,4	2648	102,8
Sérum 3	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

ASSISTANCE

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

RÉFÉRENCES

1. 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 in 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 in 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 Exe 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



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PIA034000FR00 (02/17)

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
