

Dosaggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa del frammento Ba del Fattore B, un indicatore dell'attivazione della via alternativa del Complemento, in urine, plasma o siero umano

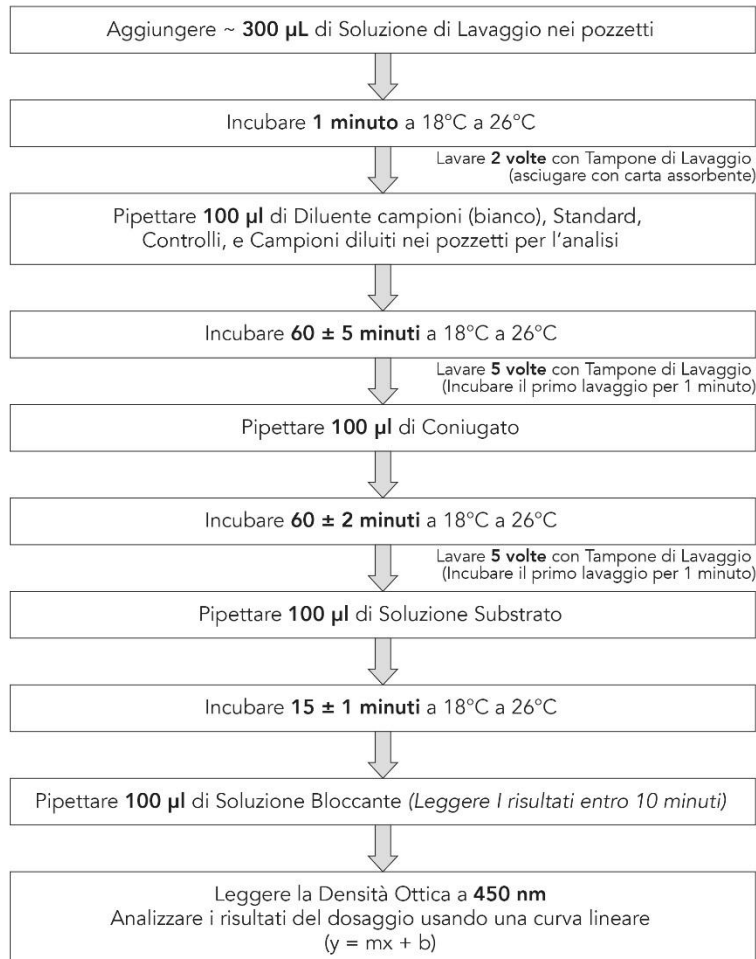
Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per esportazione. Non destinato alla vendita o all'uso negli Stati Uniti o in Canada.

SOMMARIO

Preparazione di Reagenti, Standard, Controlli e campioni

- Diluire il Tampone di Lavaggio Concentrato 1:20 con Acqua DI
- Diluire i campioni di urine 1:15 con il Diluente per Campioni (es. 25 µl muestra + 350 µl diluyente)
- Diluire i campioni di plasma 1:1000 con il Diluente per Campioni (es. 10 µl muestra + 990 µl diluyente > 40 µl muestra diluida + 360 µl diluyente)
- Diluire i campioni di siero 1:2000 con il Diluente per Campioni (es. 10 µl muestra + 990 µl diluyente > 20 µl muestra diluida + 380 µl diluyente)

Procedura di analisi





SCOPO DEL TEST

Il kit per il dosaggio immunoenzimatico MicroVue Ba misura la quantità del frammento del complemento Ba, un frammento di attivazione del Fattore B della via alternativa del complemento, in campioni di urina, siero e plasma umano. La misurazione di Ba in urina, siero o plasma umano fornisce prova del coinvolgimento della via alternativa del complemento. La determinazione dell'attivazione della via alternativa aiuta nella diagnosi di varie malattie renali, per esempio la glomerulonefrite cronica, la nefrite lupica e molte altre malattie del derma, come la dermatite erpetiforme ed il pemfigo volgare. Tra le altre malattie in cui è stata riscontrata l'attivazione della via alternativa del complemento si annoverano la degenerazione maculare legata all'età, la perdita fetale in gravidanze a rischio, l'artrite reumatoide, e l'anemia falciforme. ^{1,4,14-22}

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

La via alternativa del complemento fornisce una protezione congenita contro gli agenti microbici in assenza di anticorpo specifico. ⁵⁻⁹ Vi sono varie sostanze che innescano l'attivazione della via del complemento, tra cui i polisaccaridi microbici o i lipidi, i lipopolisaccaridi batterici gram-negativi, ed i determinanti di superficie presenti su alcuni virus, parassiti, cellule di mammiferi con infezione virale e cellule cancerose. Nelle malattie autoimmuni, la via alternativa del complemento può contribuire direttamente al danneggiamento tissutale.

Una reazione di importanza fondamentale che si verifica durante l'attivazione della via alternativa è la conversione dello zimogeno Fattore B dal peso molecolare di 93 Kd in un enzima proteolitico attivo. Ciò viene conseguito tramite una reazione a due fasi. Durante la prima fase di reazione il Fattore B forma un complesso magnesio dipendente con il fattore C3(H₂O) o C3b. ⁸ Il complesso C3(H₂O),B si forma solo nella fase fluida mentre il complesso C3b,B può formarsi nella fase liquida o su una superficie target. ⁵⁻⁸ Il Fattore B, che è presente nel complesso C3(H₂O),B o nel C3b,B viene scisso nei frammenti Ba (33 Kd) e Bb (60 Kd) nella seconda fase della reazione dall'enzima della via alternativa, il Fattore D. ^{5-8,13}

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

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

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il dosaggio immunoenzimatico (EIA) MicroVue Ba per la determinazione quantitativa del frammento del complemento Ba in urine, siero e plasma umani o è una procedura in tre fasi che utilizza (1) una micro piastra cottata con anticorpo monoclonale di topo che si lega specificatamente al frammento del complemento Ba umano, (2) un anticorpo policlonale anti- Fattore B umano coniugato con HRP, e (3) un substrato cromogenico.

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

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

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

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

96 test per la determinazione del Frammento Ba del Fattore B

Il kit per dosaggio immunoenzimatico MicroVue Ba contiene:

| | | | |
|----------|---|---------------------------|--------------------------|
| A | Ba Standard | Codice 5159 – 5163 | 1,5 ml/1 ciascuno |
| B | Pronti all'uso. Ciascuno contiene siero umano con concentrazione nota di Ba (ng/mL), con stabilizzanti proteici | | |
| C | | | |
| D | | | |
| E | | | |
| L | Ba Controllo Basso | Codice 5164 | 1,5 ml |
| | Pronto all'uso. Contiene siero umano con a concentrazione nota di Ba (ng/mL), e stabilizzanti proteici | | |
| H | Ba Controllo Alto | Codice 5165 | 1,5 ml |
| | Pronto all'uso. Contiene siero umano con concentrazione nota di Ba (ng/mL), e stabilizzanti proteici | | |
| 1 | Strisce Coattate | Codice 5166 | 12 ciascuno |
| | Otto pozzetti ciascuna, coattate con anticorpo monoclonale murino in una busta richiudibile | | |
| 2 | Soluzione Bloccante | Codice A9947 | 12 ml |
| | Contiene 1N (4%) di acido cloridrico | | |
| 3 | 20X Soluzione di Lavaggio Concentrata | Codice A9957 | 2 x 50 ml |
| | Contiene soluzione salina tampone fosfato (PBS), 1,0% Tween-20®, e 0,035% ProClin® 300 | | |
| 4 | Diluente per Campioni | Codice A3670 | 50 ml |
| | Contiene PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% stabilizzatori proteici, 0,035% ProClin 300 | | |
| 5 | TMB Substrato | Codice 5059 | 12 ml |
| | Pronto all'uso. Contiene 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) | | |
| 6 | Ba Coniugato | Codice 5167 | 12 ml |
| | Contiene anticorpo policlonale anti- Fattore B umano coniugato con perossidasi di rafano in tampone stabilizzante HRP con conservante | | |

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

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Timer (intervallo di tempo 60 minuti)
- Micropiastra a 96 pozzetti pulite e non utilizzate e/o provette e rack
- Contenitore graduato per la diluizione del tampone di lavaggio
- Sistemi di lavaggio convalidato per immunodosaggio
- Micropipette e puntali sterili, monouso
- Pipetta multicanale regolabile (8 o 12 canali) o micropipette ripetibili
- Pipette pulite da 1 ml, 5 ml, e 10 ml
- Serbatoi di reagente per l'aggiunta del coniugato, del substrato e della soluzione bloccante alla piastra (usare serbatoi puliti e non utilizzati per ciascun reagente)
- Lettore per piastra in grado di effettuare letture ad una densità ottica A_{450} tra 0.0 e 3.0
- Acqua deionizzata o distillata

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Trattare i campioni come materiale potenzialmente infetto. Seguire le Precauzioni Universali nel maneggiare il contenuto del kit e i campioni dei pazienti.
- Usare i reagenti forniti come un'unica unità entro la data di scadenza riportata sull'etichetta della confezione.
- Conservare i reagenti come indicato.
- Non usare le Strisce Coattate se la busta è forata.
- ProClin 300 viene usato come conservante. Un contatto accidentale o l'ingestione dei tamponi o dei reagenti che lo contengono possono causare irritazione alla pelle, occhi o bocca. Usare le buone pratiche di laboratorio per ridurre l'esposizione. Rivolgersi al medico se i sintomi sono troppo evidenti.
- La Stop Solution è considerata corrosiva e può causare irritazione. Non ingerire. Evitare il contatto con occhi, pelle e indumenti. Se avviene il contatto, lavare immediatamente ed abbondantemente l'area colpita con acqua. Se ingerita, contattare un medico.
- Ogni unità dei donatori utilizzata per la preparazione degli standard e dei sieri di controllo di questo prodotto è stato testato da un metodo approvato dalla FDA per la presenza di anticorpi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV1 e HIV2) e del virus dell'epatite C, così come dell'antigene di superficie dell'epatite B. Dal momento che nessun metodo è in grado di offrire una assoluta certezza che gli agenti infettivi siano assenti, questi reagenti devono essere gestiti a livello di biosicurezza 2 (Biosafety Level 2), come raccomandato per ogni campione di siero o di sangue umano potenzialmente infetto dal Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories."⁽²³⁾
- L'uso di pipette multicanali o pipettatori ripetibili è raccomandato per assicurare la dispensazione contemporanea dei reagenti.
- Per un accurato dosaggio dei campioni, aggiungere standard e campioni in maniera precisa. Pipettare accuratamente usando solo pipette calibrate.
- Raccolta e conservazione adeguate dei campioni sono essenziali per ottenere risultati accurati (vedi TRATTAMENTO CAMPIONI E PREPARAZIONE).
- Evitare contaminazione microbica o cross-contaminazione di campioni o reagenti.
- Dosare ciascun campione in duplicato.
- Non usare lo stesso pozzetto per più di un test.
- L'uso di altri tempi di incubazione e altre temperature rispetto a quelle indicate nella Procedura può dare risultati non corretti.
- Il Substrato TMB deve essere protetto dalla luce e dal contatto con metalli o gomma durante la conservazione e l'incubazione. Evitare il contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti. Se dovesse avvenire il contatto, lavare immediatamente con acqua.
- Non lasciare asciugare i pozzetti durante il dosaggio.
- Rimuovendo il liquido dai pozzetti, non intaccare o anche solo toccare il fondo del pozzetto.
- Campioni contaminati, iperlipemici, inattivati dal calore possono dare risultati errati.

- Per evitare la formazione di aerosol durante il lavaggio, usare un sistema che aspiri il liquido di lavaggio all'interno di una bottiglia contenente candeggina.
- Per lavare la micropiastra si dovrebbe usare un sistema automatico di riempimento o una bottiglia (*PROCEDURA D'ANALISI*, punto 6). Per ottenere migliori risultati, non usare una pipetta multicanale per lavare la micropiastra.
- I test devono essere effettuati in un'area dotata di ventilazione adeguata.
- Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con la normativa nazionale e locale in vigore.
- Indossare indumenti protettivi, guanti, e protezione occhio/viso durante l'utilizzo del kit.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo la manipolazione.
- Per ulteriori informazioni su simboli di pericolo, sicurezza, manipolazione e smaltimento dei componenti di questo kit, consultare la scheda di sicurezza (SDS) reperibile su quidel.com.

CONSERVAZIONE

Conservare il kit non aperto a 2°C a 8°C.

INDICAZIONI DI INSTABILITA' O DETERIORAMENTO DEI REAGENTI

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

TRATTAMENTO CAMPIONI E PREPARAZIONE

Trattare e smaltire i campioni secondo le Precauzioni Universali.

Tutte le operazioni di manipolazione dei campioni devono essere effettuate a 2°C a 8°C.

Raccolta Campione

Siero/Plasma

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

Il frammento Ba del fattore B è suscettibile alla proteolisi in campioni raccolti o conservati in modo scorretto, e il Frammento Ba può essere generato in campioni utilizzati impropriamente attraverso un'attivazione artefatta del complemento; pertanto, è essenziale eseguire correttamente le operazioni di prelievo, conservazione e manipolazione dei campioni. Per risultati ottimali nel plasma, si raccomanda l'uso di provette di prelievo con K2 EDTA.

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

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

Urina

È possibile eseguire il dosaggio MicroVue Ba con i prelievi della prima urina del mattino (FMV) o della seconda urina del mattino (SMV), privi di conservanti. Si consiglia di eseguire i prelievi prima delle ore 10:00 di mattina al fine di ovviare a qualunque possibile influenza della variazione diurna. Mantenere refrigerato il campione di urina (2°C a 8°C) per una conservazione inferiore a 1 giorno oppure congelare il campione a temperatura ≤ -70°C per una tempi più lunghi. Non sottoporre il campione a più di 5 cicli di congelamento/ scongelamento. **Evitare l'esposizione prolungata alla luce, specialmente alla luce del sole.**

Durante il trattamento di routine, i campioni non vengono influenzati dalla luce normale, artificiale e di laboratorio.

Scongelamento dei Campioni Congelati

Per ridurre al minimo il tempo di manipolazione dei campioni, preparare una micropiastra (o provette) di diluizione e aggiungere il volume adeguato di diluente (come descritto nella seguente sezione *Diluizione dei campioni*) prima di scongelare i campionidestinati al dosaggio.

Scongelare i campioni congelati rapidamente a 37°C fino a quasi scongelamento. Trasferire i campioni scongelati immediatamente su ghiaccio per prevenire l'attivazione del complemento prima della diluizione. *Mantenere i campioni nel ghiaccio per non più di due ore. Non lasciare i campioni a 37°C, in modo che avvenga l'attivazione del complemento.* Non scongelare i campioni a temperatura ambiente o su ghiaccio perchè queste procedure possono portare all'attivazione del complemento e influire sui risultati. I campioni dovrebbero essere dosati appena possibile dopo scongelamento. Possono essere effettuati fino a cinque cicli di congelamento/ scongelamento senza influire sui risultati. Se i campioni dovessero richiedere ulteriore congelamento per successive analisi, Quidel raccomanda di congelare più aliquote del campione per evitare cicli di congelamento /scongelamento.

Diluizione del Campione

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

NOTA: Vedere *Scongelamento dei Campioni Congelati* per le indicazioni importanti sui metodi più adatti per scongelare i campioni congelati. Il trattamento adeguato del campione è essenziale per ottenere risultati accurati.

I campioni **devono** essere diluiti in modo che i valori osservati siano al di sopra del LLOQ e non superino l'ULOQ. I campioni con letture al di fuori di questo intervallo devono essere ri-dosati ad una nuova diluizione.

Preparare una diluizione adeguata (come descritto nella sezione seguente)per ciascun campione usando il Diluente per Campioni. Miscelare delicatamente per evitare la formazione di schiuma e bolle. Non conservare o riutilizzare i campioni diluiti. Una volta diluiti, i campioni devono essere aggiunti nei micropozzetti entro 30 minuti.

Urine

Nell'esecuzione del dosaggio si raccomanda di diluire i campioni di urine 1:15 con il Diluente per Campioni.

Plasma

Nell'esecuzione del dosaggio si raccomanda di diluire i campioni di plasma 1:1000 con il Diluente per Campioni in due passaggi:

1. Aggiungere 10 µl campioni a 990 µl diluente
2. Aggiungere 40 µl campioni diluito a 360 µl diluente

Siero

Nell'esecuzione del dosaggio si raccomanda di diluire i campioni di siero 1:2000 in diluente per campioni: in due passaggi:

1. Aggiungere 10 µl campioni a 990 µl diluente
2. Aggiungere 20 µl campioni diluito a 380 µl diluente

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

Aggiungere Campioni Diluiti ai Micropozzetti.

L'aggiunta di campioni diluiti nei micropozzetti deve essere completato entro 5 minuti dalla dispensazione del primo campione. Uno dei due metodi può essere usato per aggiungere campioni diluiti, Standard, Controlli etampone, ai pozzetti (vedere il punto 4 della *PROCEDURA D'ANALISI*). Per il dosaggio di pochi campioni, i campioni diluiti e gli altri reagenti possono essere aggiunti direttamente nei pozzetti con una micropipetta (100 µl/pozzetto). Per dosaggi di molti campioni, Quidel consiglia di usare il sistema "replica plating" descritta di seguito per caricare Standard, Controlli e campioni diluiti nei micropozzetti il più rapidamente possibile.

Usare una pipetta multicanale per aggiungere 120 µl a 130 µl di ciascuna soluzione ai singoli pozzetti in una micropiastra non coattata (non fornita) corrispondente al modello EIA finale desiderato. Dopo che tutte le soluzioni da dosare sono stati aggiunte ai pozzetti nella micropiastra non coattata, si trasferiscono rapidamente 100 µl da ogni pozzetto della micropiastra non coattata in ciascun pozzetto coattato corrispondente, usando una micropipetta multicanale. Per evitare la possibilità di cross-contaminazioni, i puntali devono essere sostituiti ogni volta che vi sia un cambiamento nella composizione dei campioni da trasferire.

La procedura "replica plating" può essere usata per aggiungere comodamente il Coniugato, il Substrato e la Soluzione Bloccante.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti e materiali a 18°C a 26°C prima dell'uso.

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

Strisce per Microdosaggi

Determinare il numero di strisce necessarie per l'analisi. Quidel raccomanda di testare bianco, Standard, e Controlli in duplicato. Alloggiare le strisce da utilizzare nella micropiastra. Rimettere le strisce non necessarie nella busta richiudibile, sigillarla e conservare a 2°C a 8°C. Sistemare le strisce da usare nel dosaggio in un telaio da micropiastra.

Soluzione di Lavaggio

Agitare per inversione il flacone della Soluzione di Lavaggio Concentrata 20X prima dell'uso. Se è stata conservata a 2°C a 8°C, si possono essere formati cristalli. Per scioglierli, scaldare la bottiglia in un bagnetto ad acqua a 37°C a 50°C fino a completa, e proseguire mescolando accuratamente. Preparare la Soluzione di Lavaggio diluendo tutto il contenuto di una delle bottiglie di lavaggio concentrata 20X fino a raggiungere un totale di un litro, con acqua distillata o deionizzata. Mescolare accuratamente. La Soluzione di Lavaggio è stabile per 30 giorni se conservata in un contenitore pulito a 2°C a 8°C. Se si verifica una perdita di colore o torbidità, smaltirla.

Standard e Controlli Ba

Gli Standard e i Controlli sono forniti pronto all'uso e non richiedono diluizione o preparazione prima dell'uso.

PROCEDURA D'ANALISI

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

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

1. Registrare le posizioni dei micropozzetti corrispondenti al/i pozzetto/i del bianco, dei campioni da testare, degli Standard e dei Controlli nonché i numeri di lotto indicati sulle etichette delle fiale. Etichettare un angolo della micropiastra al fine di stabilirne l'orientamento.
2. Preparare le strisce come indicato di seguito:
 - a. Usando un flacone di lavaggio o un dispositivo di lavaggio automatico delle piastre, dispensare circa 300 µL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto.
 - b. Incubare i pozzetti per un minuto a 18°C e 26°C.
 - c. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto.
 - d. Aggiungere circa 300 µL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto.
 - e. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto.
 - f. Ripetere i passaggi d-e un'altra volta, per un totale di tre lavaggi.**
 - g. Capovolgere la piastra e picchiettare energicamente su carta assorbente per rimuovere eventuale liquido rimasto.
3. Selezionare uno o più pozzetti come bianco. Aggiungere 100 µL di Diluente Campione ai pozzetti che saranno usati come bianco.
4. Aggiungere 100 µL di Standard, Controlli o campioni diluiti in duplicato nei pozzetti assegnati in doppio.
Completare entro 5 minuti.
5. Incubare a 18°C a 26°C per 60 ± 5 minuti.
6. Lavare i micropozzetti un totale di 5 volte seguendo questa procedura:
 - a. Aspirare il contenuto da ogni pozzetto.
 - b. Usando un flacone di lavaggio o un dispositivo di lavaggio per micropiastre, dispensare circa 300 µL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto.
 - c. Incubare i pozzetti per 1 minuto a 18°C a 26°C.
 - d. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto.
 - e. Capovolgere la piastra e picchiettare energicamente su carta assorbente per rimuovere l'eventuale liquido rimasto.
 - f. Aggiungere circa 300 µL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto.
 - g. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto
 - h. Capovolgere la piastra e picchiettare energicamente su carta assorbente per rimuovere l'eventuale liquido rimasto tra ogni lavaggio.
 - i. Ripetere i passaggi f-h altre tre volte per un totale di 5 lavaggi.**
 - j. Dopo il quinto ciclo di lavaggio, capovolgere la piastra e picchiettare energicamente su carta assorbente per rimuovere l'eventuale liquido rimasto.
7. Usando una pipetta multicanale o a ripetizione, dispensare 100 µL di coniugato Ba in ogni pozzetto lavato, incluso/i il/i pozzetto/i bianco.
8. Incubare le strisce a 18°C a 26°C per 60 ± 2 minuti.
9. Lavare i micropozzetti dopo l'incubazione di 60 minuti (passaggio 8), come descritto nella *PROCEDURA D'ANALISI*, punto 6.
10. Immediatamente dopo la procedura di lavaggio dispensare 100 µL della soluzione per substrato TMB in ogni pozzetto, incluso/i il/i pozzetto/i bianco.
11. Incubare le strisce a 18°C a 26°C per 15 ± 1 minuti.
12. Aggiungere 100 µL di soluzione bloccante ad ogni pozzetto per bloccare la reazione enzimatica. La soluzione bloccante dovrebbe essere aggiunta ai pozzetti nello stesso ordine rispetto alla soluzione substrato.
13. Picchiettare delicatamente la piastra sulla parte superiore del banco per permettere alla colorazione di svilupparsi uniformemente. **NOTA: Risultati ottimali si possono ottenere usando (se disponibile) la funzione auto-mix del lettore di micropiastra appena prima della lettura della stessa.**
14. Leggere l'assorbanza a 450 nm entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione bloccante (punto 12), effettuando le dovute correzioni secondo il sistema spettrofotometrico in uso.
15. Determinare la concentrazione dei campioni e dei Controlli dalla Curva Standard.
16. Gettare i campioni diluiti, i controlli, il substrato e le strisce rimanenti (cfr *AVVERTENZE E PRECAUZIONI*).

CONTROLLO QUALITÀ

Il Certificato di Analisi fornito con questo kit è specifico per ciascun lotto e deve essere usato per verificare che i risultati ottenuti dal proprio laboratorio siano simili a quelli ottenuti presso Quidel Corporation.

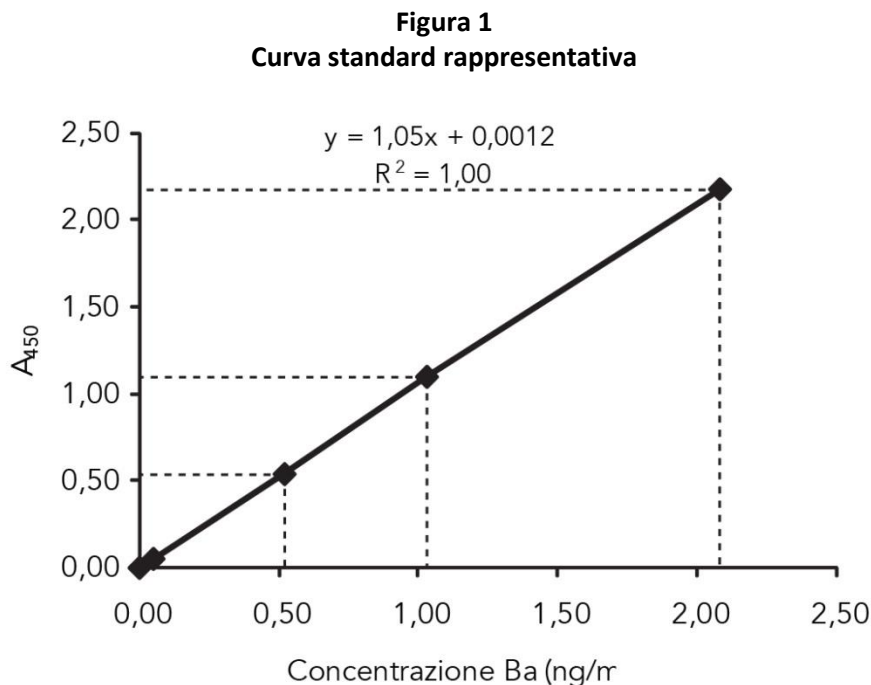
Vengono forniti un intervallo dei valori dei controlli. I valori dei controlli devono essere utilizzati per verificare la validità della curva e i risultati del campione. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca i propri parametri di riferimento come limiti di accettazione del dosaggio. Se i valori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

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Uso della curva standard

La curva standard per il dosaggio immunoenzimatico Ba viene generata interpolando i valori A_{450} , da cui sono stati sottratti quelli del bianco, di ogni standard (lungo l'asse y) e la concentrazione di ciascuno standard (lungo l'asse x). Con una 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 possono essere letti direttamente dalla linea best-fit della curva standard. Un esempio di curva standard tipica è mostrato in Figura 1.



| Campione | 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 |

Calcolo della concentrazione Ba effettiva nei campioni dosati

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

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

Convalida

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

| |
|---|
| coefficiente di correlazione (r): $\geq 0,98$ |
| pendenza (m): 0,052-1,63 |
| intersezione y (b): (-) 0,05-0,05 |

Fare riferimento alle etichette dei flaconi o al prodotto C di A per i valori medi accettabili di concentrazione Ba per i controlli alto e basso.

LIMITI

Il dosaggio immunoenzimatico per la determinazione del frammento Ba prodotto da Quidel è stato utilizzato per esaminare campioni di urine, siero o plasma K2 EDTA. Altri anticoagulanti non sono stati testati.

VALORI ATTESI DEI CAMPIONI

Trentacinque (35) campioni di plasma EDTA, ventinove (29) campioni di siero e sedici (16) campione di urine da donatori normali sono stati testati con il dosaggio immunoenzimatico per la determinazione del frammento Ba. I risultati sono riportati nella Tabella seguente:

| Campione | n | Media (ng/ml) | Intervallo di Valori (ng/ml) |
|-------------|----|---------------|------------------------------|
| Plasma EDTA | 35 | 658 | 226 a 2153 |
| Siero | 29 | 1642 | 436 a 3362 |
| Urina | 16 | 7,7 | 0,6 a 27,0 |

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

PRESTAZIONI DEL TEST

Limiti

LOD: il limite di rilevamento (LOD) del dosaggio Ba è 0,011 ng/ml, determinato dalle 3 deviazioni standard più alte in uno studio su standard zero.

LLOQ: Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) per il dosaggio Ba è 0,033 ng/ml, la concentrazione minore sulla curva standard che ha soddisfatto i criteri CLSI di accuratezza e precisione.

ULOQ: Il limite superiore di quantificazione (ULOQ) per il dosaggio è 3,239 ng/ml, la concentrazione maggiore sulla curva standard che ha soddisfatto i criteri CLSI di accuratezza e precisione.

Sostanze interferenti

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

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

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

| Sostanza | Concentrazione |
|------------|----------------|
| Acetone | 1000 mg/dl |
| Creatinina | 500 mg/dl |
| Glucosio | 2000 mg/dl |
| Bilirubina | 0,25 mg/dl |
| Emoglobina | 200 mg/dl |
| Urea | 6000 mg/dl |

Le seguenti sostanze interferiscono con il dosaggio su campioni di urina:

| Sostanza | Concentrazione |
|------------------|----------------|
| Albumina | 340 mg/dl |
| Cloruro di Sodio | 170 mg/dl |

Precisione

La precisione intra-dosaggio e inter-dosaggio è stata determinata esaminando 20 replicati di 1 campione di plasma, 1 campione di siero e 2 campioni di urine in 10 diverse sedute.

| Campione | Ba (ng/ml) | Intra-dosaggio ¹ C.V. (%) | Inter-dosaggio ² C.V. (%) |
|-------------|---------------|---|---|
| EDTA Plasma | 376,0 | 3,3 | 2,4 |
| Sérum | 1111 | 2,3 | 8,1 |
| Urina | 1,925 | 2,2 | 7,6 |
| | 22,98 | 2,2 | 3,4 |

¹n = 20 replicati ²n = 10 sedute

Linearità

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

| Campione | Fattore di diluizione | Riscontrato (ng/ml) ³ | Atteso (ng/ml) ³ | Recupero (%) |
|-------------|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| Plasma EDTA | 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 |
| Siero | 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 |
| Urina | 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 |

³Non incluso il fattore di diluizione

Recupero (Spike Recovery)

Il recupero dei picchi è stato eseguito testando campioni con una quantità nota di Ba purificato e confrontando i valori osservati con i valori previsti.

| Campione | Ba (ng/ml) | Spike (ng/ml) | Risultato (ng/ml) | Recupero (%) |
|----------|---------------|------------------|----------------------|-----------------|
| 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 |
| Siero 1 | 1194 | | 1664 | 99,0 |
| Siero 2 | 2088 | 486,4 | 2648 | 102,8 |
| Siero 3 | 2497 | | 2953 | 99,0 |
| Urina 1 | 1,115 | | 4,026 | 92,5 |
| Urina 2 | 1,711 | 3,237 | 4,891 | 98,8 |
| Urina 3 | 21,37 | | 23,97 | 97,4 |

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 sito Web quidel.com.

BIBLIOGRAFIA

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 Immunopathology* 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 Immunopathology* 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, neoepitope 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

PIA034000IT00 (02/17)

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
