

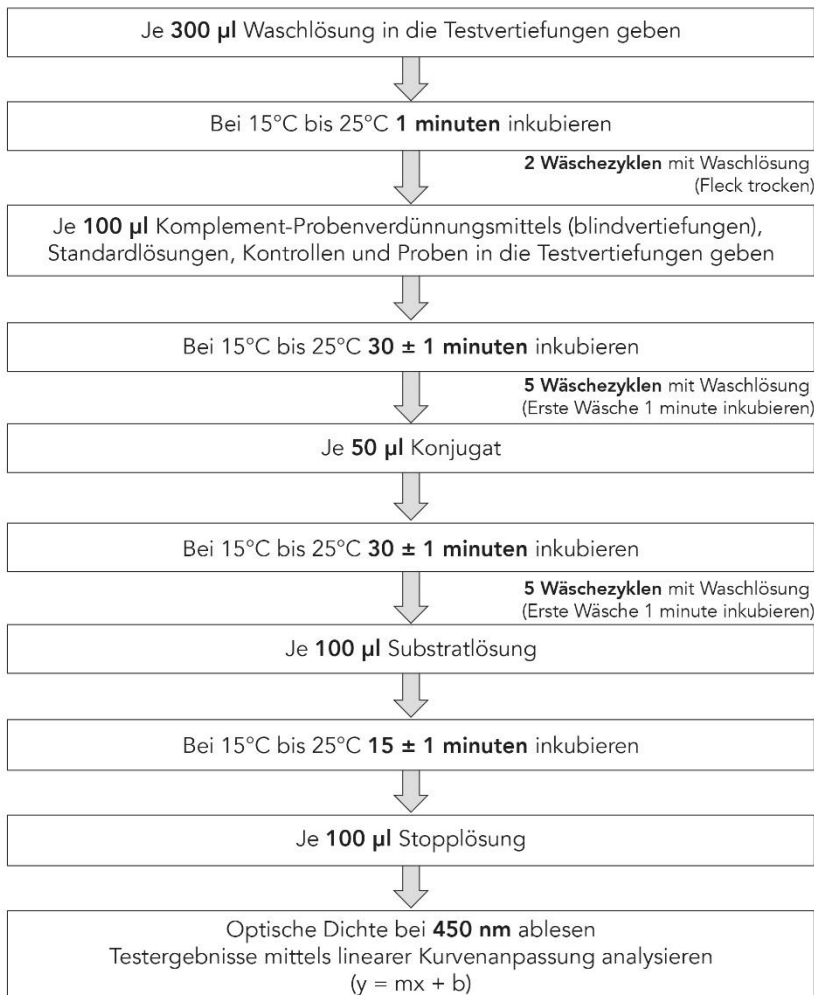
**Ein immunassay für die Quantifikation des Komplementfragments Bb von Faktor B, eine Anzeige der Aktivierung der alternativen wegs, in Plasmaproben oder Humanserum**

## ZUSAMMENFASSUNG

### Vorbereitung von Reagenzien und Proben

- Verdünnt konzentrierte Waschlösung 1:20 mit vollentsalztem Wasser
- Jede Standardlösungen und Kontrolle wiederherstellen mit 1.0 ml Hydrierungsreagenz (15 Minuten lang ruhen lassen und vor Gebrauch vorsichtig mischen)
- Plasmaproben verdünnen 1:10 mit Komplement-Probenverdünnungsmittel (z.B. 50 µl + 450 µl) (innerhalb von 30 Minuten in die Testvertiefungen pipettieren)
- Serumproben verdünnen 1:20 mit Komplement-Probenverdünnungsmittel (z.B. 25 µl + 475 µl) (innerhalb von 30 Minuten in die Testvertiefungen pipettieren)

### Testverfahren





## VERWENDUNGSZWECK

Der MicroVue Bb Plus Enzymimmunoassay misst die Menge des Komplementfragments Bb in Humanserum oder Plasmaproben. Die Bestimmung des Bb in Humanserum, Plasma oder anderen biologischen Flüssigkeiten dient als Nachweis für die Aktivierung des alternativen Komplementwegs. Die Messung der Aktivierung des alternativen Wegs ist hilfreich für die Diagnose mehrerer Nierenerkrankungen, z. B. chronischer Glomerulonephritis, Lupusnephritis sowie einiger Hauterkrankungen wie Dermatitis herpetiformis Duhring und Pemphigus vulgaris.

Andere Erkrankungen, bei denen die Aktivierung des alternativen Wegs des Komplementsystems beobachtet wurde, umfassen rheumatoide Arthritis, Sichelzellanämie und gram-negative bakterielle Infektionen.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Der alternative Weg des Komplementsystems stellt einen angeborenen Schutz gegen mikrobielle Erreger in Abwesenheit eines spezifischen Antikörpers bereit.<sup>1-5</sup> Die Aktivierung dieses Komplementwegs kann durch eine Reihe von Substanzen, darunter mikrobielle Polysaccharide oder Lipide, gram-negative bakterielle Lipopolysaccharide, Oberflächendeterminanten einiger Viren, Parasiten, viral infizierte Mastzellen und Krebszellen ausgelöst werden. Bei Autoimmunerkrankungen kann der alternative Komplementweg direct zu Gewebsschäden führen.

Eine Reaktion von zentraler Bedeutung, die während der Aktivierung des alternativen Wegs stattfindet, ist die Konversion des 93 kDa großen Faktor-B-Zymogens in ein aktives proteolytisches Enzym. Dies wird in einer Zweischrittreaktion erzielt. Während des ersten Reaktionsschritts bildet der Faktor B einen magnesiumabhängigen Komplex mit C3(H<sub>2</sub>O) oder C3b.<sup>4</sup> Der C3(H<sub>2</sub>O),B-Komplex wird nur in der Flüssig-Phase gebildet, während der C3b,B-Komplex entweder in der Flüssig-Phase oder auf einer Targetoberfläche gebildet werden kann.<sup>1-4</sup> Faktor B, der im C3(H<sub>2</sub>O),B- oder im C3b,B-Komplex vorliegt, wird in einem zweiten Reaktionsschritt durch Faktor D, einem Enzym des alternativen Komplementwegs, in Ba (33 kDa)- und Bb (60 kDa)-Fragmente gespalten. Der dadurch entstehende C3b, Bb-bimolekulare Komplex ist das C3-Konvertaseenzym des alternativen Komplementwegs. Die Bb-Untereinheit bildet die katalytisch aktive Stelle des Komplexes, die zur Spaltung von C3 in C3a- und C3b-Fragmente fähig ist.<sup>1-4,6</sup> Die auf diese Weise produzierten zusätzlichen C3b-Fragmente bilden den C3b,Bb,C3b-trimolekularen Komplex, das C5-Konvertaseenzym des alternativen Wegs. Diese C5-Konvertase ist in der Lage, C5 in C5a- und C5b-Fragmente zu spalten.<sup>1-4,6</sup>

Die C3- und C5-Konvertasen des alternativen Wegs können durch Faktor P (auch als Properdin bekannt), eine Komponente des alternativen Wegs, die normalerweise in Humanplasma oder Serum<sup>1-4</sup> vorliegt, oder durch C3-Nephritic-Factor, einen Autoantikörper, der bei manchen Patienten mit extensiver Aktivierung des alternativen Komplementwegs<sup>5</sup> gebildet wird, stabilisiert werden. Die C3- und C5-Konvertasen des alternativen Wegs können durch spontanen Zerfall<sup>7</sup> oder durch die Bindung an Faktor H oder Komplementrezeptor 1 (CR1)<sup>4,8</sup> dissoziiert und dadurch inaktiviert werden. Das von einer der Konvertasen dissoziierte Bb-Fragment behält einige biologische Aktivitäten bei, wie z.B. die Retention der funktionellen hämolytischen Aktivität<sup>4,9</sup>, die Fähigkeit, das Ausschwärmen von Makrophagen zu induzieren<sup>10</sup> und die Plasminogenaktivierung.<sup>11</sup>

Obwohl davon ausgegangen wird, dass die Aktivierung des alternativen Wegs des Komplementsystems in erster Linie in Abwesenheit eines spezifischen Antikörpers stattfindet, treten viele Situationen auf, in denen die Aktivierung des alternativen Wegs durch die Aktivierung des klassischen Wegs bedingt wird. Immunkomplexe, die bei Patienten mit Autoimmunerkrankung vorliegen, können zum Beispiel die Aktivierung des klassischen Komplementweges mit daraus resultierender Produktion von C3b-Fragmenten auslösen. Wie oben beschrieben sind diese C3b-Moleküle in der Lage, Faktor B zu binden und dessen Spaltung in Ba- und Bb-Fragmente einzuleiten. Daher kann die Aktivierung des alternativen Wegs bei

antikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen auftreten und in signifikantem Ausmaß zu einer verstärkten Komplementaktivierung und begleitender Gewebsdestruktion beitragen.

Durch die Bestimmung der Faktor-B-Spaltprodukte in Testproben kann das Ausmaß der Aktivierung des alternativen Komplementwegs zum Zeitpunkt der Probennahme im untersuchten Krankheitszustand beurteilt werden. Der MicroVue Bb Plus EIA stellt ein einfaches, schnelles, nicht-radioaktives, hochspezifisches Verfahren zur quantitativen Messung der Faktor-B-Aktivierung bereit. Er eignet sich hervorragend für Untersuchungen, die die Rolle oder den Status des alternativen Komplementwegs in zahlreichen Forschungs- und klinischen Bereichen betreffen, sowie für das Monitoring der Bildung von Bb *in vitro*.

## FUNKTIONSPRINZIP

Dem MicroVue Bb Plus Enzymimmunoassay zur Quantifizierung von Bb in Humanserum, Plasma oder anderen Proben liegt ein Dreischrittverfahren zugrunde. Zur Durchführung des Assays werden (1) eine Mikroassayplatte, die mit einem spezifisch humanes Bb bindenden monoklonalen Maus-Antikörper beschichtet ist, (2) ein HRP-konjugierter muriner anti-humaner Bb-Antikörper und (3) ein chromogenes Substrat eingesetzt.

In einem ersten Schritt werden Standardlösungen, Kontrollen und Testproben in die Testvertiefungen, die mit einem spezifischen monoklonalen anti-Bb-Antikörper vorbeschichtet sind, hinzugegeben. Das Bb, jedoch nicht Faktor B oder andere Komplementaktivierungsprodukte, die in den Standardlösungen, Kontrollen oder Proben vorliegen, bindet sich an den immobilisierten monoklonalen anti-Bb-Antikörper. Nach der Inkubation wird durch einen Waschzyklus ungebundenes Material entfernt.

In einem zweiten Schritt wird ein muriner, mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierter anti-Bb-Antikörper in jede Testvertiefung hinzugegeben. Das enzymkonjugierte anti-Bb bindet sich an das Bb, das in den Testvertiefungen eingefangen wurde. Nach der Inkubation wird ungebundenes, überschüssiges Konjugat durch einen Waschzyklus entfernt.

In einem dritten Schritt wird ein chromogenes Enzymsubstrat in jede Testvertiefung gegeben. Das gebundene HRP-Konjugat reagiert mit dem Substrat und bildet eine blaue Färbung. Nach der Inkubation wird die Enzymreaktion chemisch gestoppt, es erfolgt eine Farbänderung von blau nach gelb und die Farbintensität wird bei 450 nm spektrophotometrisch gemessen. Die Farbintensität des Reaktionsgemischs verhält sich proportional zur Konzentration des Bb, das in den Testproben, Standardlösungen und Kontrollen vorliegt.

## MITGELIEFERTE REAGENZIIEN UND MATERIALIEN

### 96 Assays zur Bestimmung des Bb-Fragments des Faktor B

Der MicroVue Bb Plus Enzymimmunoassay enthält folgende Komponenten:

<b>A</b>	<b>Bb Plus Standardlösungen</b>	<b>Art.-Nr. A9948-A9952</b>	<b>je 1 ml</b>
<b>B</b>	(lyophilisiert) Enthält eine bekannte Menge an Bb in Humanserum, verdünnt in PBS,		
<b>C</b>	Proteinstabilisatoren, 0,035% ProClin® 300		
<b>D</b>			
<b>E</b>			
<b>L</b>	<b>Niedrige Bb Plus Kontrolle</b>	<b>Art.-Nr. A9953</b>	<b>1 ml</b>
	(lyophilisiert) Enthält eine bekannte Menge an Bb in Humanserum, verdünnt in PBS,		
	Proteinstabilisatoren, 0,035% ProClin 300		
<b>H</b>	<b>Hohe Bb Plus Kontrolle</b>	<b>Art.-Nr. A9955</b>	<b>1 ml</b>
	(lyophilisiert) Enthält eine bekannte Menge an Bb in Humanserum, verdünnt in PBS,		
	Proteinstabilisatoren, 0,035% ProClin 300		

<b>1</b>	<b>Mikroassay-Platte</b> 12 Teststreifen mit jeweils 8 Vertiefungen, beschichtet mit einem gereinigten monoklonalen Maus-Antikörper, der spezifisch für humanes Bb ist, in einem wiederverschließbaren Folienbeutel	<b>Art.-Nr. A9559</b>	<b>je 12</b>
<b>2</b>	<b>Stopplösung</b> Enthält 1N Salzsäure	<b>Art.-Nr. A9947</b>	<b>12 ml</b>
<b>3</b>	<b>20fach konzentrierte Waschlösung</b> Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 1,0% Tween-20® und 0,035% ProClin 300	<b>Art.-Nr. A9957</b>	<b>50 ml</b>
<b>4</b>	<b>Komplement-Proben-verdünnungsmittel</b> Enthält PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% Proteinstabilisatoren, 0,035% ProClin 300	<b>Art.-Nr. A3670</b>	<b>50 ml</b>
<b>5</b>	<b>TMB Substrat</b> Enthält 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) und Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	<b>Art.-Nr. 5059</b>	<b>12 ml</b>
<b>6</b>	<b>Bb Plus Konjugat</b> Enthält murines mit Meerrettichperoxidase konjugiertes anti-humanes Bb, suspendiert in HRP-stabilisierendem Puffer mit Konservierungsmittel	<b>Art.-Nr. A9956</b>	<b>7 ml</b>
<b>8</b>	<b>Hydrierungsreagenz</b> Enthält 0,035% ProClin 300	<b>Art.-Nr. A3675</b>	<b>25 ml</b>

Tween® 20 ist ein eingetragenes Warenzeichen der ICI Americas Inc.  
ProClin® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Rohm and Haas Company.

## BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)

- Stoppuhr (über einen Bereich von 60 Minuten)
- Taschenrechner oder anderes Rechenverfahren zum Validieren der Testergebnisse
- Saubere, unbenutzte Mikroassay-Platten und/oder Proberöhrchen und Ständer
- Behälter für die Verdünnung des Waschpuffers
- Waschflasche oder anderes für Immunassays geeignetes Waschsysteem
- Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanäle) oder Mehrfachmikropipetten (optional)
- Saubere Pipetten, 1 ml, 5 ml und 10 ml
- Mikropipetten und Pipettenspitzen
- Plattenlesegerät für Extinktionsmessungen über den Bereich von 0,0 bis 2,0
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Zur *In-vitro*-Diagnostik.
- Die Verwendung von heparinisiertem Plasma kann in diesem Assay zu falschen Ergebnissen führen.
- Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln. Bei der Arbeit mit diesem Kit und den Patientenproben allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen befolgen. .
- Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Die Reagenzien des Assays wie angegeben lagern.
- Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
- Beim Hinzufügen oder Ansaugen von Flüssigkeiten zu bzw. von den Mikroassay-Vertiefungen nicht den Boden der Vertiefungen ankratzen oder berühren.
- Durch die Verwendung von Inkubationszeiten oder –temperaturen, die von den unter *Testverfahren* angegebenen Werten abweichen, können falsche Ergebnisse erhalten werden.
- Die Mikroassay-Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
- Die Mikroassay-Vertiefungen jeweils nur für einen Test verwenden.
- Für ein zügiges und effizientes Dosieren der Reagenzien wird der Gebrauch von Mehrkanal- oder Mehrfachpipetten empfohlen.
- Zum Gewährleisten genauer Messungen bei der Zugabe der Proben und Standardlösungen genau arbeiten. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen und nur kalibrierte Geräte verwenden.

- Für den Erhalt genauer Ergebnisse müssen die Proben fachgerecht entnommen und aufbewahrt werden (siehe *PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG*, Seite 4).
- Eine mikrobielle Kontamination bzw. Kreuzkontamination von Proben, Reagenzien oder Materialien vermeiden. Eine Kontamination kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Jede Blutspende, die für die Zubereitung der Standardlösungen und Kontrollseren verwendet wurde, wurde mit einer von der FDA zugelassenen Methode auf Antikörper gegen HIV 1 und 2, Hepatitis C sowie Hepatitis-B-Oberflächenantigen getestet und als negativ befunden (waren nicht wiederholt reaktiv). Da jedoch keine Testmethode die absolute Gewähr bieten kann, dass die Reagenzien pathogenfrei sind, sollten sie nach den gleichen Sicherheitsrichtlinien, wie sie für potenziell infektiöse Humanserum- oder Blutproben gelten, behandelt werden. Das Centers for Disease Control/National Institutes of Health Handbuch "Biosafety in Micro-biological and Biomedical Laboratories" 2007 beschreibt, wie diese Materialien zu handhaben sind.
- ProClin 300 wird als Konservierungstoff verwendet. Der unbeabsichtigte Kontakt mit Pufferlösungen oder Reagenzien, die ProClin enthalten, bzw. deren Einnahme kann zu Reizungen der Haut, der Augen oder des Mundes führen. Die Anforderungen guter Laborpraxis beachten, um die Exposition möglichst gering zu halten. Beim Auftreten der ersten Symptome einen Arzt aufsuchen.
- **Das konzentrierte Substrat ist lichtempfindlich. Es darf daher nicht über längere Zeit hellem Licht oder direkter Lichteinstrahlung ausgesetzt werden. Die Reagenzien bei Nichtgebrauch im Dunklen lagern.**
- Um beim Waschen die Bildung von Aerosolen zu vermeiden, eine Vorrichtung verwenden, mit der die Waschflüssigkeit in eine Flasche mit haushaltsüblichem Bleichmittel gesaugt wird.
- **Zum Waschen der Platte eine Waschflasche verwenden. Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassayplatte verwenden.**
- Hitzeinaktivierte, hyperlipämische oder kontaminierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
- Testverfahren in Bereichen mit angemessener Belüftung durchführen.
- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.
- Bei der Handhabung der Kitkomponenten geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
- Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt (SDB) auf [quidel.com](http://quidel.com), um weitere Informationen zu Gefahrensymbolen, Sicherheit, Handhabung und Entsorgung der Komponenten in diesem Kit zu erhalten.

## VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

**Alle Reagenzien und Materialien vor dem Test auf 15°C bis 25°C bringen.**

Nach der Entnahme der erforderlichen Reagenzien und Materialien die nicht mehr benötigten Komponenten wieder auf die erforderliche Lagertemperatur bringen (siehe *LAGERUNG*).

### Beschichtete Teststreifen

Die benötigte Anzahl von Streifen für den Assay bestimmen und dem Beutel entnehmen. Die Teststreifen im Plattenrahmen befestigen. Die nicht benötigten Teststreifen wieder in den Beutel legen, den Beutel verschließen und bei 2°C bis 8°C lagern.

### Waschlösung

Die Waschlösung zum Waschen der Testvertiefungen vorbereiten, indem 50 ml der 20fach konzentrierten Waschlösung mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf 1 Liter verdünnt werden. Vor Gebrauch gründlich mischen. Die Waschlösung ist bei Lagerung in einem sauberen Behälter bei 2°C bis 8°C für 30 Tage stabil. Das Reagenz beim Auftreten von Trübungen entsorgen.

### Rekonstituieren der Bb Plus Standardlösungen und Kontrollen

1,0 ml des Hydrierungsreagenz in jedes Standardfläschchen (A-E) und in die Kontrollen für den niedrigen und den hohen Bereich geben. Die rekonstituierten Fläschchen mindestens 15 Minuten bei

Raumtemperatur rehydrieren lassen. Sorgfältig mischen, dabei jedoch die Bildung von Schaum oder Blasen vermeiden. Rekonstituierte Standardlösungen und Kontrollen sind für 30 Tage stabil, wenn sie bei 2°C bis 8°C gelagert werden.

## Probenverdünnung

**Vorsicht:** Alle Proben als potenziell infektiös behandeln. Keine hitzeinaktivierten oder kontaminierten Proben verwenden.

Es wird empfohlen, für den MicroVue Bb Plus Enzymimmunassay Plasmaproben in einem Verhältnis von 1:10 mit Probenverdünnungsmittel zu verdünnen. Serumproben sollten in einem Verhältnis von 1:20 mit Probenverdünnungsmittel verdünnt werden. Nach der Verdünnung müssen die Proben innerhalb von 30 Minuten in die Testvertiefungen gegeben werden. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden. Restproben sollten entsorgt werden.

**Bei Proben mit starker Komplementaktivierung können höhere Verdünnungen als aufgeführt notwendig sein.**

## Zugabe der verdünnten Proben in die Mikrotiter-Vertiefungen

Eine der beiden nachfolgenden Methoden kann für die Zugabe der verdünnten Proben, Standardlösungen, Kontrollen und Puffer in die Testvertiefungen verwendet werden. (siehe Schritt 3 des *TESTVERFAHRENS*). In kleinen Testläufen, bei denen nur wenige Proben getestet werden, können die verdünnten Proben und anderen Reagenzien direkt in die zugeteilten Vertiefungen mit einer Mikropipette (100 µL/Vertiefung) zugegeben werden. Bei kleinen oder großen Testläufen, insbesondere bei größeren Läufen, empfehlen wir den Gebrauch einer Mehrkanalpipette, um die Proben wie folgt zuzugeben. **(Eine Mehrkanalpipette kann auch für die bequeme Zugabe des Konjugats, Substrats und der Stopplösung verwendet werden.)**

Um die Standardlösungen, Kontrollen und verdünnten Proben so schnell wie möglich in die Testvertiefungen zu geben, kann die „Replica-Plating“-Methode angewendet werden. Statt 100 µL jeder Standardlösung, Kontrolle oder verdünnter Probe einzeln in die antikörperbeschichteten Testvertiefungen zu geben, können 120-130 µL jeder Lösung in die einzelnen Vertiefungen einer unbeschichteten Mikrotiterplatte (nicht im Lieferumfang enthalten) entsprechend dem gewünschten EIA-Endmuster gegeben werden. Nachdem alle zu testenden Lösungen in die Mikroassay-Vertiefungen der unbeschichteten Platte gegeben worden sind, zügig 100 µL von jeder unbeschichteten Vertiefung in die antikörperbeschichteten Testvertiefungen mit Hilfe einer Mehrkanalmikropipette transferieren. Um die Möglichkeit einer Kreuzkontamination zu vermeiden, müssen die Pipettenspitzen jedes Mal gewechselt werden, wenn sich die Zusammensetzung der zu übertragenden Proben verändert.

## LAGERUNG

Den ungeöffneten Kit bei 2°C bis 8°C lagern. Nachdem der Kit geöffnet wurde, sollten die 20fach konzentrierte Waschlösung und das Hydrierungsreagenz bei 2°C bis 25°C gelagert werden.

Alle Reagenzien müssen vor Verwendung auf Raumtemperatur (15°C bis 25°C) gebracht werden. Alle nicht benötigten Mikroassaystreifen in den Beutel legen, den Beutel wieder verschließen und bei 2°C bis 8°C lagern.

## ANZEICHEN FÜR INSTABILITÄTEN ODER ZERSETZUNGSVORGÄNGE DER REAGENZIEN

Eine Trübung der Waschlösung weist auf einen Zersetzungsvorgang dieses Reagenz hin. In diesem Fall sollte die Lösung entsorgt werden.

## PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG

**Beim Handhaben und Entsorgen aller Proben die allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten.**

Die korrekte Entnahme und Aufbewahrung der Proben ist unbedingt erforderlich, da der Faktor Bb bei nicht ordnungsgemäßer Entnahme oder Lagerung empfindlich gegen Proteolyse ist.

Aufgrund der Komplementaktivierung, die während der Koagulation auftritt, wird die Bb-Menge in normalen Humanserumproben höher als die in EDTA-Plasmaproben sein. Die Bb-Mengen, die in EDTA-Plasma bestimmt werden, repräsentieren daher in genauerem Maße die *in vivo* vorliegenden Konzentrationen.

Serum-oder EDTA-Plasmaproben sollten unter keimfreien Bedingungen mit Standardverfahren entnommen werden. Die Proben sollten sofort getestet oder bei 4°C oder auf Eis bis zur Durchführung des Assays gelagert werden. Die kurzzeitige Aufbewahrung auf Eis sollte jedoch einen Zeitraum von vier Stunden nicht überschreiten.

Für eine Lagerung über einen längeren Zeitraum sollte das Serum oder das Plasma bei –70°C oder tiefer innerhalb von zwei Stunden nach der Entnahme eingefroren werden.

Eingefrorene Proben ( $\leq -70^{\circ}\text{C}$ ) in einem 37°C warmen Wasserbad schnell auftauen. Die aufgetauten Proben sofort auf Eis legen (nicht länger als vier Stunden), um eine Komplementaktivierung vor der Verdünnung zu verhindern. **Die Proben nicht bei 37°C liegen lassen.** Die Proben nicht bei Raumtemperatur oder 4°C auftauen, da dies zur Komplementaktivierung führen kann. Eingefrorene Proben sollten so schnell wie möglich nach dem Auftauen getestet werden. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen wird nicht empfohlen. Wenn Proben für weitere Analysen wieder eingefroren werden müssen, empfiehlt Quidel, die Proben in mehrere Aliquote eingeteilt einzufrieren, um ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen zu vermeiden.

## TESTVERFAHREN

**Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.**

*Vor dem Fortfahren die unter WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN und VORBEREITUNG DER REAGENZIEN gegebenen Informationen einsehen.*

1. Die Positionen der Blindvertiefung(en), aller Proben, Standardlösungen und Kontrollen auf der Mikroassay-Platte sowie die auf den Flaschenetiketten angegebenen Chargennummern auf einem Datenblatt schriftlich festhalten. Die Ausrichtung der Mikroassay-Platte durch die Markierung einer Plattenecke festhalten.
2. Die Mikroassay-Teststreifen wie folgt vorbereiten:
  - a. Unter Verwendung einer Waschflasche oder einer automatischen Plattenwaschvorrichtung etwa 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung hinzugeben. **HINWEIS: Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassayplatte verwenden.**
  - b. Die Vertiefungen eine Minute lang bei 15°C bis 25°C inkubieren.
  - c. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
  - d. Etwa 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung geben.
  - e. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
  - f. Die Schritte d-e noch einmal wiederholen, insgesamt drei Waschschr**itte durchführen.
  - g. Die Platte umdrehen und kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
3. 100 µL des Probenverdünnungsmittels, der rekonstituierten Standardlösungen, Kontrollen oder verdünnten Proben in die zugewiesenen Vertiefungen geben.
4. Bei 15°C bis 25°C für 30 ± 1 Minuten inkubieren.
5. Die Mikroassay-Vertiefungen insgesamt fünfmal wie nachfolgend beschrieben waschen:
  - a. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.

- b. Mit einer Waschflasche oder einer automatischen Plattenwaschgerät etwa 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung füllen. **HINWEIS: Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassayplatte verwenden.**
- c. Die Vertiefungen 1 Minute lang bei 15°C bis 25°C inkubieren.
- d. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
- e. Etwa 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung füllen.
- f. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
- g. Die Schritte e-f dreimal wiederholen.**
- h. Nach dem fünften Waschzyklus die Platte umdrehen und kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
6. Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette 50 µL des Bb-Konjugats in die gewaschenen Testvertiefungen und Blindvertiefung(en) geben.
7. Die Mikroassay-Teststreifen bei 15°C bis 25°C für 30 ± 1 Minuten inkubieren.
8. Die Mikroassay-Vertiefungen nach der 30 Minuten dauernden Inkubation (Schritt 7) wie unter *TESTVERFAHREN* Schritt 5 beschrieben waschen. **HINWEIS: Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassayplatte verwenden.**
9. Unmittelbar nach dem Waschschrift je 100 µL der TMB-Substratlösung in jede Vertiefung, inklusive der Blindvertiefung(en), geben. **HINWEIS: Das TMB-Substrat muss während der Lagerung und des Inkubierens vor Licht geschützt werden. Das TMB-Substrat darf vor dem Dispensieren in die Mikroassay-Vertiefungen nicht in ein Reagenzreservoir oder eine andere Vorrichtung gegeben werden, wo eine Lichtexposition vorkommen kann.**
10. Die Mikroassay-Teststreifen bei 15°C bis 25°C für 15 ± 1 Minuten im Dunkeln inkubieren.
11. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion 100 µL der Stopplösung in jede Vertiefung geben. Die Zugabe der Stopplösung in die Vertiefungen sollte in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Zugabe der Substratlösung erfolgen.
12. Die Platte auf dem Labortisch vorsichtig antippen, damit sich die Farbentwicklung vollständig und gleichmäßig verteilt.
13. Innerhalb von einer Stunde nach der Zugabe der Stopplösung (Schritt 11) die Extinktion für jede Testvertiefung bei 450 nm bestimmen und je nach verwendetem Spektrophotometer eine Blindwertkorrektur vornehmen.
14. Die verbleibenden verdünnten Proben, Kontrollen, Substrat und die benutzten Mikroassay-Teststreifen entsorgen (siehe *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*).

## QUALITÄTSKONTROLLE

Das in diesem Kit enthaltene Analysenzertifikat ist chargenspezifisch und dient zur Überprüfung, ob die von Ihrem Labor erzielten Ergebnisse mit denen der Quidel Corporation übereinstimmen. Die mitgelieferten Werte für die optische Dichte sind nur als Richtlinie gedacht. Die in Ihrem Labor gemessenen Ergebnisse können abweichen.

Qualitätskontrollbereiche werden zur Verfügung gestellt. Die Kontrollwerte dienen dazu, die Validität der Standardkurve und der Probenergebnisse zu verifizieren. Jedes Labor sollte eigene Parameter für akzeptable Testlimits erstellen. Wenn die Kontrollwerte NICHT innerhalb des Akzeptanzbereichs Ihres Labors liegen, sollten die Testergebnisse in Frage gestellt und die Proben erneut getestet werden.

## AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

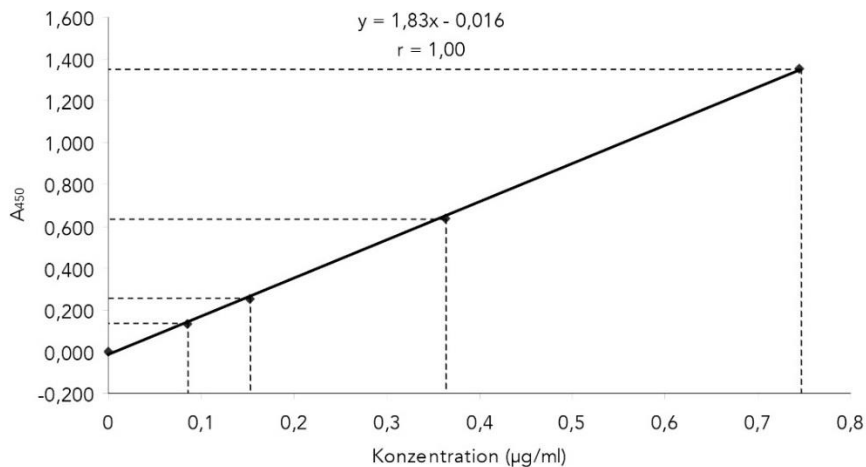
### Erstellung der Standardkurve

Die Standardkurve für den Bb EIA wird mit den Blindwert-korrigierten  $E_{450}$ -Werten der verschiedenen Standardlösungen (auf der y-Achse) und den entsprechenden Standardkonzentrationen (auf der x-Achse) erstellt. Nach der Durchführung einer linearen Regressionsberechnung muss die Standardkurve den Validierungsanforderungen gerecht werden (siehe unten). Diese Berechnung wird von den meisten Rechnern und Taschenrechnern unterstützt.



Alternativ können die Daten auch ohne Rechnerunterstützung, d.h. zeichnerisch, in ein Diagramm eingetragen werden und die Werte ( $\mu\text{g/ml}$ ) der Testproben können dann direkt von der Ausgleichsgeraden der Standardkurve abgelesen werden. Ein Beispiel für eine typische Standardkurve ist in Abbildung 1 dargestellt.

**Abbildung 1.**  
**Typische Standardkurve**



### Berechnung der tatsächlichen Bb-Konzentration in den Testproben

Die tatsächliche Bb-Konzentration in jeder unverdünnten Testprobe wird bestimmt, indem die aus der Kit-Standardkurve abgelesene Bb/ml-Konzentration mit dem Kehrwert des verwendeten Probenverdünungsfaktors multipliziert wird.

Wenn die  $A_{450}$ -Werte einer bestimmten Testprobe höher sind als die des höchsten Kit-Standards (E), sollten die Ergebnisse als „größer als“ die Bb-Konzentration des höchsten Kit-Standards (E) multipliziert mit dem Probenverdünungsfaktor vermerkt werden. Wenn ein genauerer Wert der Bb-Menge erforderlich ist, sollte die Testprobe unter Verwendung eines höheren Verdünungsfaktors nochmals getestet werden. Bei allen Wiederholungstests müssen auch die Bb-Kit-Standardlösungen und Kontrollen mitgeführt werden.

### VALIDIERUNG

Die Steigung, den Schnittpunkt und den Korrelationskoeffizienten der Ausgleichsgeraden bestimmen. Die Werte müssen innerhalb der folgenden Bereiche liegen, damit der Assay gültig ist:

Korrelationskoeffizient (r): $> 0,96$
Steigung (m): zwischen 1,094 und 2,558
y-Schnittpunkt (b): zwischen $(-0,145$ und $0,113$

Die Werte der Bb-Konzentration für die hohen und niedrigen Kontrollen des Akzeptanzbereichs sind im Analysezertifikat einzusehen.

### GRENZEN DER METHODE

Der MicroVue Bb Plus Enzymimmunoassay wurde verwendet, um Serum- oder EDTA-Plasmaproben zu untersuchen. Heparinisiertes Plasma ist für diesen Test NICHT geeignet. Andere Antikoagulanzen wurden nicht getestet.

## LEISTUNGSMERKMALE DES TESTS

### Grenzwerte

**LOD:** Die Nachweisgrenze (LOD) für den Bb Plus Assay beträgt 0,018 µg/ml, sie wurde im Rahmen einer Nullstandard-Präzisionsstudie an der 3fachen Standardabweichung festgelegt.

**LLOQ:** Die untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) für den Bb Plus Assay liegt bei 0,033 µg/ml, die niedrigste Konzentration aus der Standardkurve, die den Kriterien für Fehlerfreiheit und Präzision des NCCLS (Nationales Komitee für klinische Laborstandards) entspricht.

**ULOQ:** Die obere Bestimmungsgrenze (ULOQ) für den Bb Plus Assay liegt bei 0,836 µg/ml, die höchste Konzentration, die den Kriterien für Fehlerfreiheit und Präzision des NCCLS (Nationales Komitee für klinische Laborstandards) entspricht.

### Störsubstanzen

Eine Na+Heparin-Konzentration von 14 U/ml (entspricht der Konzentration von Heparin-Plasmaröhrchen) beeinträchtigt den Bb Plus Assay und wird deshalb zur Verwendung als Plasma-Antikoagulant für die Probennahme nicht empfohlen.

Die folgenden Substanzen wurden mit den angegebenen Konzentrationen in dem Bb Plus Assay getestet und sie stellten keine Störung für diesen Assay dar.

Substanz	Konzentration
Bilirubin	40 mg/dl
Hämoglobin	500 mg/dl
Triglyceride	3000 mg/dl
Albumin	6000 mg/dl
Glukose	1200 mg/dl
Cholesterin	500 mg/dl

### Präzision

Die Präzision „in der Serie“ und „von Serie zu Serie“ wurde für 20 Replikate von 2 Plasmaproben und 2 Serumproben in 10 verschiedenen Testserien ermittelt.

Probe	Bb (µg/ml)	In der Serie <sup>1</sup> C.V. (%)	Von Serie zu Serie <sup>2</sup> C.V. (%)
EDTA Plasma	1,550	2,4	7,7
	0,517	2,5	6,7
Serum	2,129	3,1	6,2
	2,375	4,0	9,1

<sup>1</sup>n = 20 replicate    <sup>2</sup>n = 10 testserien

## Linearität

Die Linearität wurde ermittelt, indem eine serielle Verdünnungsreihe der Proben erstellt wurde und die gemessenen Werte mit den erwarteten Werten verglichen wurden. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

Probe	Verdünnungsfaktor	Gefunden Bb (µg/ml)	Erwartet Bb (µg/ml)	Wiedergewinnung (%)
EDTA Plasma	1:10	0,160	*	*
	1:16	0,107	0,100	106,9%
	1:20	0,079	0,080	98,7%
	1:32	0,052	0,050	103,9%
Serum 1	1:20	0,161	*	*
	1:32	0,103	0,101	102,0%
	1:40	0,069	0,081	85,4%
	1:64	0,044	0,050	87,2%
Serum 2	1:20	0,597	*	*
	1:25	0,467	0,478	97,7%
	1:30	0,420	0,398	105,4%
	1:40	0,310	0,299	103,8%
	1:50	0,230	0,239	96,2%
	1:60	0,196	0,199	98,4%
	1:80	0,133	0,149	89,0%

## Probenwerte

Das EDTA-Plasma von sechsdreißig (36) und das Serum von neunundvierzig (49) normalen Spendern wurden mit dem MicroVue Bb Plus Fragment Enzymimmunoassay getestet. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

	n	Mittelwert (µg/ml)	BEREICH (µg/ml)	
			± 2 SD	± 3 SD
EDTA Plasma	36	0,96	0,49-1,42	0,26-1,65
Serum	49	3,53	0,80-6,26	0,0-7,62

Achtung: Der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) für die Bb-Fragmentkonzentrationen, die in Plasma oder Serumproben bestimmt werden, können von Labor zu Labor variieren. Daher wird empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Mittelwert für die Bb-Fragmentkonzentration und eigene Werte für die Standardabweichung von Proben erstellt.

## KUNDENDIENST

Zum Aufgeben einer Bestellung oder für technischen Kundendienst wenden Sie sich an Ihre Vertretung vor Ort. Zusätzliche Informationen zu Quidel, unseren Produkten und Vertretungen finden Sie auf unserer Website [www.quidel.com](http://www.quidel.com).

## LITERATURVERWEISE

- Schreiber, R.D. and Müller-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. p.411.
- Gotze, O. and Müller-Eberhard, H.J. 1976. The alternative pathway of complement activation. *Adv. Immunol.* 24:1.

3. 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: 259
4. Pangburn, M.K. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol* 7:163.
5. Ratnoff, W.E., Fearon, D.T., and Austen, K.F. 1983. The role of antibody in the activation of the alternative complement pathway. *Springer Semin Immunopathol* 6:361.
6. Hugli, T.E. 1986. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *Complement* 3:111
7. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1977. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 74:1 1683.
8. 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: 5867.
9. Fishelson, Z. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. Residual hemolytic and proteolytic activity expressed by Bb after decay-dissociation of C3b,Bb. *J. Immunol.* 132:1425.
10. 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.
11. Sundsmo, J.S. and Wood, L.M. 1981. Activated factor B(Bb) of the alternative pathway of complement activation cleaves and activates plasminogen. *J. Immunol.* 127:877.
12. 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.
13. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
14. Sefton, M.V., et al. 1994. "Using ELISA to evaluate complement activation by reference biomaterials" *J. Mat. Sci* 5:622-627,.
15. Mold, C. Tamerius, J.D., et al. 1995" Complement activation during painful crisis in sickle cell anemia" *Clinical Immunology and Immunopathology* 70:3,314-320.
16. 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)1178-1188.
17. J.Jarvis, Taylor, H. 1994. "Complement activation and immune complexes in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis: a longitudinal study" *J Rheumatology* 21(6) 1124-1127.
18. Aggarwal, et al. 2000." Evidence for activation of the alternative complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis" *Rheumatology* 39:189-192.
19. J. Buyon, Tamerius J. et al.1992. "Assessment of Disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus" *Arthritis and Rheumatism* 35(9) 1028-1036.
20. D. Shaw, Rustagi, P. et al. 1997. "Effects of Synthetic Oligonucleotides on human complement and coagulation" *Biochemical Pharmacol* 53(8)1123-1132.
21. Mollnes. T.E., et al. 1999. "Complement activation in patients with systemic lupus erythematosus without nephritis" *Rheumatology* 38:933-940.
22. Sturfelt, G, Truedsson, L. 2005. "Complement and its breakdown products in SLE" *Rheumatology* 44:1227-1232.
23. Alexander, J.J. et al. 2005. "Complement-dependent apoptosis and inflammatory gene changes in murine lupus cebritis" *J. Immunology* 175:8312-8319.
24. Thurman, J., Holers, V.M. 2006. "The central role of the alternative pathway in human disease" *J. Immunology* 176:1305-1310.
25. Pawluczakowycz, A.W et al. 2007. "Hematin promotes complement alternative pathway-mediated deposition of C3 activation fragments on human erythrocytes: potential implications for the pathogenesis of anemia in malaria" *J. Immunology* 179:5543-5552.
26. Atkinson, C. et al. 2008. "Low-dose targeted complement inhibition protects against renal disease and other manifestations of autoimmune disease in MRL/lpr mice" *J. Immunology* 180:1231-1238.

**REF** A027 – MicroVue Bb Plus 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](http://quidel.com)

**PIA027003DE00 (09/21)**

## GLOSSAR

---

**REF**

Katalog-Nr.



CE-Konformitätskennzeichnung

---

**EC REP**

Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft

**LOT**

Chargencode

---



Verwenden bis



Hersteller

---



Temperaturbegrenzung



Verwendungszweck

---



Consult E-Beschriftung  
Gebrauchsanweisung beachten



Biogefährdung

---

**IVD**

Zur *In-vitro*-Diagnostik



Inhalt ist ausreichend für 96 Bestimmungen

---

**CONT**

Inhalt/Enthält

**CONTROL**

Kontrolle

---