

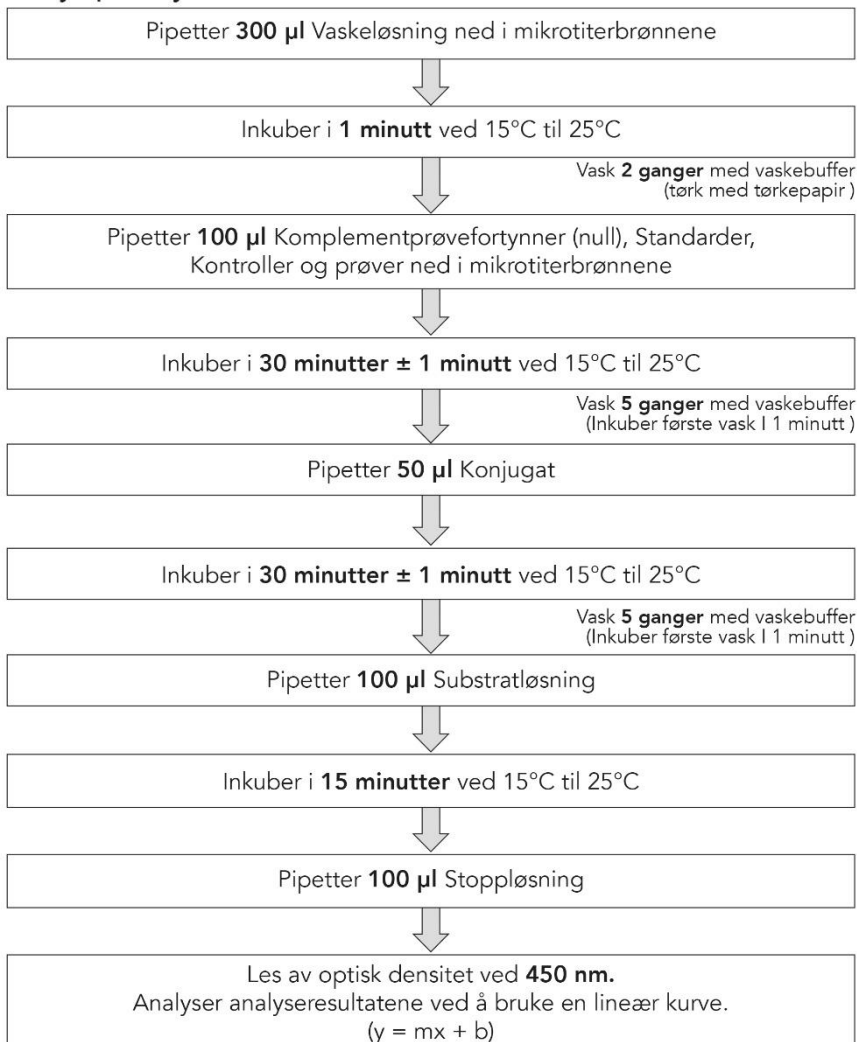
En immunanalyse for kvantifisering av Bb-fragmentet i Faktor B, en indikator for aktivering av alternativ komplementbane i humant plasma og serum

SAMMENDRAG

Forberedelse av Reagenser, Standarder, Kontroller og Prøver

- Fortynn Vaskebufferkonsentratet **1:20** med ikke-ionisert vann
- Fortynn hver Standard og Kontroll med **1.0 ml** Hydratiseringsreagens (la det stå i 15 minutter, og bland forsiktig før bruk)
- Fortynn plasmaprøvene **1:10** med Komplementprøve-fortynner (for eksempel 50 µl + 450 µl) (pipetter ned i mikrotiterbrønnene innen 30 minutter)
- Fortynn serumprøvene 1:20 med Komplementprøve-fortynner (for eksempel 25 µl + 475 µl) (pipetter ned i mikrotiterbrønnene innen 30 minutter)

Analyseprosedyre





BRUKSOMRÅDE

MicroVue Bb Plus Enzyme Immunoassay Kit måler mengden av komplementfragmentet Bb, som er et aktiveringsfragment til Faktor B i komplementets alternative bane i humant plasma eller serum. Måling av Bb i humant plasma eller serum gir belegg for at komplementet har en alternativ bane. Måling av aktivering av en alternativ bane bidrar til å diagnostisere en rekke nyresykdommer, som f.eks. kronisk glomerulonefritt, lupus nefritt, samt flere hudsykdommer, som f.eks. herpesdermatitt og pemfigus vulgaris. Andre sykdommer der man har observert aktivering av komplementets alternative bane, omfatter revmatoid artritt, sigdcelleanemi, og gramnegative bakterieinfeksjoner.

SAMMENDRAG OG FORKLARING

Den alternative komplementbanen gir naturlig beskyttelse mot mikrobielle agens, der spesifikke antistoffer ikke finnes.¹⁻⁵ Aktivering av denne komplementbanen kan utløses av mange forskjellige substanser, som bl.a., mikrobielle polysakkarider eller lipider, gramnegative bakterielle lipopolysakkarider, og overflatedeterminanter som finnes på noen virus, parasitter, virusinfiserte pattedyrceller, og kreftceller. Ved autoimmune sykdommer kan den alternative komplementbanen bidra direkte til å ødelegge vev.

En svært viktig reaksjon som opptrer under aktivering av den alternative banen, er omdanningen av 93 Kd Faktor B zymogen til et aktivt proteolytisk enzym. Dette foregår i en totrinsreaksjon. I det første reaksjonstrinnet danner Faktor B et magnesium-avhengig kompleks med C3(H2O) eller C3b.⁴ C3(H2O),B-komplekset dannes bare i flytende fase, mens C3b,B-komplekset kan dannes, enten i flytende fase, eller på en egnet overflate.¹⁻⁴ Faktor B, som finnes i C3(H2O),B- eller C3b,B-komplekset, spaltes til Ba- (33 Kd) og Bb- (60 Kd) fragmenter i det andre reaksjonstrinnet av alternativ bane enzymet, Faktor D.¹⁻⁴ Det bimolekylære C3b,Bb-komplekset, som er resultatet av dette, er den alternative banens C3 konvertase enzym. Bb-subenheten er det katalytisk aktive stedet av komplekset, som er i stand til å spalte C3 i C3a- og C3b-fragmenter.^{1-4,6} De øvrige C3b-fragmentene som er fremstilt på denne måten, kan danne det C3b-,Bb-,C3b-trimolekylære komplekset, som er den alternative banens C5 konvertase enzym. Dette C5-konvertase enzymet er i stand til å spalte C5 i C5a- og C5b-fragmenter.^{1-4,6}

C3- og C5-konvertase enzymene i den alternative banen kan stabiliseres av faktor P (også kalt Properdin), en komponent av den alternative banen, som vanligvis finnes i humant plasma eller serum,¹⁻⁴ eller av nefrittisk faktor C3, et autoantistoff, som forekommer hos noen pasienter som opplever aktivering av alternativ bane i omfattende grad.⁵ C3- og C5-konvertase enzymene i den alternative banen kan dissosieres ved en spontan nedbrytningsprosess, og blir inaktivert,⁷ eller ved binding av Faktor H eller komplementreseptor 1 (CR1).^{4,8} Bb- fragmentet som er dissosiert fra begge konvertasene beholder noe biologisk aktivitet, for eksempel, bibehold av funksjonell hemolytisk aktivitet,^{4,9} evnen til å indusere makrofag-spredning,¹⁰ og aktivering av plasminogen.¹¹

Selv om man har trodd at aktivering av en alternativ bane hovedsakelig skjer ved fravær av et spesifikt antistoff, dukker det opp situasjoner, der aktivering av alternativ bane kan finne sted som resultat av en tradisjonell aktivering. For eksempel, immunkomplekser hos pasienter med autoimmune sykdommer, kan sette i gang en aktivering av komplementbane på tradisjonelt vis, noe som fører til produksjon av C3 b-fragmenter. Som beskrevet ovenfor, er disse C3 b-molekylene i stand til å binde Faktor B og sette i gang spalting i Ba- og Bb-fragmenter. Derfor kan aktivering av alternativ bane forekomme ved antistoff-medierte autoimmune sykdomstilstander, og kan i betydelig grad bidra til øket aktivering av komplement og derav følgende ødeleggelse av vev.

Ved å vurdere spaltningsproduktene fra Faktor B i testmaterialet ved de sykdomstilstandene man undersøker, kan man anslå i hvilken grad alternative baner benyttes, på det tidspunktet man tar prøver. MicroVue Bb Plus EIA er en enkel, rask, ikke radioaktiv, høyst spesifikk, og kvantitativ prosedyre for å måle aktivering av Faktor B. Den er ideell for undersøkelser som går ut på å studere funksjon eller status av alternative komplementbaner i tallrike forskningsmiljøer, og for å undersøke utviklingen av Bb *in vitro*.

PROSEDYREPRINSIPP

MicroVue Bb Plus Enzyme Immunoassay for kvantitering av Bb i humant serum, plasma, eller andre prøver, er en tretrinns prosedyre der man bruker (1) en mikrotiterplate som er dekket med monoklonalt museantistoff som binder seg spesifikt til humant Bb, (2) et HRP-konjugert murint anti-humant Bb, og (3) et kromogent substrat.

I det første trinnet fordeles standarder, kontroller, og testmaterialet i mikrotiterbrønnene som på forhånd er dekket med et spesifikt monoklonalt anti-Bb antistoff. Bb, men ikke Faktor B eller andre komplementaktiveringsprodukter, som finnes i standardene, kontrollene, eller prøvene, vil binde seg til det monoklonale anti-Bb antistoffet som er i fast fase. Etter inkubasjon fjernes ubundet materiale ved vask.

I det andre trinnet tilsettes pepperrotperoksidase (HRP)-konjugert, murint anti-Bb-antistoff i hver testbrønn. Det enzymkonjugerte anti-Bb binder seg til Bb som er festet i mikrotiterbrønnene. Overflødig og ubundet konjugat fjernes ved vask etter inkubasjon.

I det tredje trinnet tilsettes et kromogent enzymsubstrat i hver mikrotiterbrønn. Det bundne HRP-konjugatet reagerer med substratet og det farges blått. Etter inkubasjon stopper man enzymreaksjonen kjemisk. Fargen skifter til gult, og fargeintensiteten måles med spektrofotometer ved 450 nm. Fargeintensiteten i reaksjonsblandingen er proporsjonal med konsentrasjonen av Bb som finnes i prøvene, standardene og kontrollene.

REAGENSER OG MATERIALE SOM LEVERES

96 Analyser for Bb-fragmentet av Faktor B

MicroVue Bb Plus Enzymimmunanalyse settet inneholder følgende:

A	Bb Plus Standarder	Del A9948-A9952	1 ml hver
B	(lyofiliserte) Hver av dem inneholder en kjent konsentrasjon av Bb i humant serum, fortynnet i PBS,		
C	protein stabilisatorer, 0,035% ProClin® 300		
D			
E			
L	Bb Plus Lav Kontroll	Del A9953	1 ml
	(lyofilisert) Inneholder en kjent konsentrasjon av Bb i humant serum, fortynnet i PBS, proteinstabilisatorer, 0,035% ProClin 300		
H	Bb Plus Høy Kontroll	Del A9955	1 ml
	(lyofilisert) Inneholder en kjent konsentrasjon av Bb i humant serum, fortynnet i PBS, proteinstabilisatorer, 0,035% ProClin 300		
1	Mikrotiterplate	Del A9559	12 x 8 brønner
	12 åtte-brønns strimler dekket med rensert monoklonalt museantistoff, spesifikt for humant Bb i en foliepose som kan forsegles		
2	Stoppløsning	Del A9947	12 ml
	Inneholder 1N Hydrochloric Syre		
3	20X Konsentrert Vaskeløsning	Del A9957	50 ml
	Hver enkelt inneholder fosfatbufret saltløsning (PBS), 1,0% Tween-20®, og 0,035% ProClin 300		
4	Komplementprøvefortynner	Del A3670	50 ml
	Inneholder PBS, 0.05% Tween-20, 2,5% proteinstabilisatorer, 0,035% ProClin 300		
5	TMB Substrat	Del 5059	12 ml
	Indeholder 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) og Hydrogenperoksid (H ₂ O ₂)		
6	Bb Plus Konjugat	Del A9956	7 ml
	Inneholder pepperrotperksidasekonjugert murint anti-humant Bb oppslemmet i HRP stabiliseringsbuffer med konserveringsmiddel		

Tween-20® er et registrert varemerke fra ICI Americas Inc.
ProClin® er et registrert varemerke fra Rohm and Haas Company.

NØDVENDIG MATERIALE SOM IKKE LEVERES

- Signalur (for 60 minutter)
- Kalkulator eller annen datametode til å validere analyseresultater
- Rene, ubrukte mikrotiterplater og/eller prøverør og stativ
- Beholder for fortykning av vaskebuffer
- Vaskeflaske eller annet utstyr for vask av mikrotiterplater
- Justerbar multikanal pipette (8 eller 12 kanaler) eller mikropipetter for flergangsbruk (valgfritt)
- Rene pipetter, 1 mL, 5 mL, og 10 mL
- Mikropipetter og pipette-spisser
- Plateavleser med kapasitet for avlesning av optisk densitet mellom 0,0 og 2,0
- Ikke-ionisert eller destillert vann

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

- Til *In vitro*-diagnostisk bruk.
- Bruk av heparin plasma i denne analysen vil gi feilaktige resultater.
- Håndter prøvemateriale som potensielt smittefarlig. Følg generelle forholdsregler når du håndterer innholdet i dette settet og alle pasientprøvene.
- Bruk de reagensene som er levert, som en vesentlig del før utløpsdatoen som er angitt på pakningen.
- Oppbevar analysereagensen slik som anvist.
- Ikke bruk dekkede strimler hvis det er gått hull på posen.
- Ikke skrap eller rør bunnen av mikrotiterbrønnene når du tilsetter eller fjerner væske.
- Hvis man bruker andre inkubasjonstider og -temperaturer enn de som er angitt i prosedyreavsnittet, kan det gi feilaktige resultater.
- Ikke la mikrotiterbrønnene tørke når analysen har begynt.
- Ikke bruk en mikrotiterbrønn for mer enn en test.
- Det anbefales at man bruker multikanalpipetter eller pipetter for flergangsbruk for å sikre fordeling av reagenser i tide.
- For å oppnå eksakt måling av prøvene, må prøver og standarder tilsettes nøyaktige. Pipetter forsiktig med kalibrert utstyr.
- For å oppnå nøyaktige resultater, er riktig innsamling og oppbevaring av prøvemateriale svært viktig (se *INNSAMLING OG FORBEREDELSE AV PRØVER*, side 4).
- Unngå mikrobiell- eller krysskontaminering av prøvemateriale og reagenser. Feilaktige prøvesvar kan bli resultatet ved kontaminering.
- Hver blodgiverenhet som er brukt til fremstilling av standarder og kontroll-sera i dette produktet ble testet med FDA-godkjent metode for påvisning av antistoff mot humant immunsvikt-virus (HIV1 OG HIV) og mot hepatitt C-virus, samt for hepatitt B-overflateantigen, og funnet å være negative (var ikke gjentatt reaktive). Siden ingen testmetode helt kan garantere fullstendig fravær av smittefarlige stoffer, skal disse reagensene håndteres med grad 2 for biologisk sikkerhetshåndtering, slik som anbefalt for potensielt smittefarlig humant serum eller blodprøver i "Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual" "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2007.
- ProClin 300 brukes som konserveringsmiddel. Utilsiktet kontakt med eller inntak av buffere eller reagenser som inneholder ProClin kan forårsake irritasjon i huden, øynene eller munnen. Bruk god laboratoriepraksis for å redusere faren for å bli utsatt. Hvis symptomer opptrer, bør lege tilkalles.
- **Det konsentrerte substratet er følsomt for lys. Unngå derfor at det utsettes for sterkt og direkte lys over lengre tid. Oppbevar reagenser i mørke når de ikke brukes.**

- For å unngå at det dannes aerosol under vaskeprosedyren, skal man bruke utstyr til å suge væsken opp i en flaske som inneholder husholdningsblekemiddel.
- **Det skal brukes en vaskeplate for å vaske platen. For de beste resultater, skal du ikke bruke en flerkanals pipette til å vaske mikrotiterplaten.**
- Prøver som er inaktivert ved oppvarming, er hyperlipemiske eller forurensede, kan gi feilaktige resultater.
- Testing skal utføres i et område med god ventilasjon.
- Kast beholdere og ubrukt innhold i henhold til føderale, statlige og lokale myndighetskrav.
- Bruk egnede verneklær, hansker og beskyttelse for øyne og ansikt når du håndterer innholdet i dette settet.
- Vask hendene grundig etter håndtering.
- Hvis du ønsker mer informasjon om faresymboler, sikkerhet, håndtering og kassering av komponentene i dette settet, se sikkerhetsdatabladet på quidel.com.

FORBEREDELSE AV REAGENSER

La alle reagensene komme opp i 15°C til 25°C før bruk.

Etter å ha tatt ut reagenser og utstyr som skal brukes, legges det ubrukte materiale tilbake for oppbevaring i riktig temperatur (se *OPPBEVARING*).

Dekkede strimler

Bestem antall strimler som kreves for analysen. Ta ut det nødvendige antall strimler, og fest dem i platerammen. Legg de strimlene som ikke brukes tilbake i oppbevaringsposen, som forsegles igjen, og oppbevares ved 2°C til 8°C.

Vaskeløsning

Forbered vaskeløsning for vask av mikrotiterbrønnene ved å fortynne 50 mL av den 20X konsentrerte vaskeløsningen med opp til en liter destillert eller ikke-ionisert vann. Bland vaskeløsningen grundig før bruk. Vaskeløsningen er holdbar i 30 dager hvis den oppbevares i en ren beholder ved 2°C til 8°C. Hvis reagensen blir grumset, skal den kastes.

Fortynning av Bb Plus standard og kontroll

Tilsett 1,0 ml av hydratiserings-reagensen i hvert hetteglass med standard (A-E), og i hetteglassene med lav og høy kontroll. La de fortynnede hetteglassene hydratiseres igjen i minst 15 minutter ved romtemperatur. Bland grundig og unngå at det dannes skum eller bobler. Fortynnede standarder og kontroller er holdbare i 30 dager hvis de oppbevares ved 2°C til 8°C.

Fortynning av prøver

ADVARSEL: Håndter alt prøvemateriale som potensielt smittefarlig. Prøver som er inaktivert ved oppvarming eller er forurenset, skal ikke brukes.

Det anbefales at plasmaprøver fortynnes 1:10 i prøvefortynner for bruk i MicroVue Bb Plus Enzymimmunanalysen. Det anbefales at serumprøver fortynnes 1:20 i prøvefortynner. Når de er fortynnet, må prøvene tilsettes mikrotiterbrønnene innen 30 minutter. Fortynnede prøver skal ikke oppbevares eller brukes om igjen. Gjenværende prøver skal kastes.

Prøver med høye nivåer av komplementaktivering, kan kreve mer fortynning enn den som er angitt.

Tilsætning af fortyndet prøve til mikrotiterbrøndene

En av to metoder kan brukes for å tilsette fortynnede prøver, standarder, kontroller og buffer, i brønnene of (se trinn 3 *ANALYSE-PROSEDYRE*). For små analyser, der bare noen få prøver skal testes, kan de fortynnede prøvene og andre reagenser, tilsettes direkte i de respektive brønnene med en mikropipette (100 µL/brønn). For små eller store analyser, og spesielt for store analyser, anbefaler vi at det brukes en

multikanalpipette for å tilsette prøver, slik som beskrevet nedenfor. **(En multikanalpipette kan også brukes for å tilsette konjugat, substrat og stoppløsning på en enkel måte.)**

For å fordele standarder, kontroller og fortynnede prøver i mikrotiterbrønnene så raskt som mulig, kan man bruke en "kopi-plate"-prosedyre. Istedenfor å tilsette 100 µL av hver standard, kontroll eller fortynnede prøve i hver enkelt av brønnene som er dekket med antistoff, kan man tilsette 120-130 µL av hver løsning i hver enkelt brønn på en tom plate (ikke levert) som stemmer overens med det endelige EIA-mønsteret man ønsker. Etter at alle løsningene som skal testes, er fordelt i mikrotiterbrønnene på den tomme platen, overfører man raskt 100 µL fra hver null- brønn til de brønnene som er dekket med antistoff ved å bruke en multikanal mikropipette. For å hindre kryss-forurensning, må pipettespissene byttes hver gang sammensetningen av prøvene, som skal testes, er en annen.

OPPBEVARING

Et uåpnet sett skal oppbevares ved 2°C til 8°C. Etter at settet er åpnet, kan den 20X konsentrerte vaskeløsningen og hydratiserings-reagensen oppbevares ved 2°C til 25°C.

Alle reagenser må komme opp i romtemperatur (15°C til 25°C) før bruk. Legg alle ubrukte mikroanalysestrimler i oppbevaringsposen, forsegl den igjen og oppbevar den ved 2°C til 8°C.

TEGN PÅ USTABILITET ELLER FORRINGELSE AV REAGENSER

Uklar vaskeløsning er tegn på forringelse av reagensen. Hvis dette skjer, må løsningen kastes.

INNSAMLING OG FORBEREDELSE AV PRØVER

Håndter og kast alle prøver i overensstemmelse med generelle forholdsregler.

Riktig innsamling og oppbevaring av prøver er viktig, fordi Faktor Bb proteolyseres lett i prøver som er feilaktig innsamlet eller lagret.

På grunn av komplementaktivering som forekommer under koagulasjon, vil Bb-konsentrasjonen i normale, humane serum-prøver være høyere enn de man oppnår med EDTA plasmaprøver. Bb-nivåene i EDTA plasma kan derfor nøyaktigere vise *in vivo*-konsentrasjonene.

Serum- eller EDTA plasmaprøver bør tas aseptisk ved hjelp av standardteknikker. Prøvene bør testes umiddelbart eller oppbevares ved 4°C eller legges på is inntil de skal analyseres. Men den korte lagringstiden på is bør ikke være lenger enn fire timer.

For lengre tids oppbevaring skal serum- eller plasmaprøver fryses ved -70°C eller kaldere innen to timer etter at de er tatt.

Frosne prøver ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) tines raskt i et vannbad på 37°C til de er akkurat tint. Legg de tinte prøvene på is med en gang (men ikke lenger enn fire timer) for å hindre komplementaktivering før fortykning. **Ikke la prøvene ligge ved 37°C.** Ikke tin prøver ved romtemperatur eller 4°C, da dette kan føre til komplementaktivering. Frosne prøver skal testes så snart som mulig etter at de er tint. Gjentatt nedfrysing og opptining anbefales ikke. Hvis prøvene skal fryses igjen for senere analyse, foreslår Quidel å dele opp prøvene i flere deler, for å unngå gjentatt frysing og opptining.

ANALYSEPROSEDYRE

Les pakningsvedlegget før du begynner med analysen.

Se ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER og FORBEREDELSE AV REAGENSER.

1. Noter plasseringene på mikrotiterbrønnene som tilsvarer null-brønn(er), alle prøver som skal testes, standarder og kontroller, samt varepartinumrene som er angitt på pakningen. Merk av et hjørne på mikrotiterplaten til orientering.
2. Forbered mikrotiterstrimlene på følgende måte:
 - a. Ved å bruke en vaskeflaske eller automatisk platevaskutstyr tilsettes ca. 300 µL vaskeløsning i hver brønn. **OBS: For de beste resultater, skal du ikke bruke en flerkanals pipette til å vaske mikrotiterplaten.**
 - b. Inkuber brønnene i ett minutt ved 15°C til 25°C.
 - c. Sug opp innholdet i hver brønn.
 - d. Tilsett ca. 300 µL vaskeløsning i hver brønn.
 - e. Sug opp innholdet i hver brønn.
 - f. **Gjenta trinn d-e en gang til, slik at det blir totalt tre vaskeomganger.**
 - g. Snu platen opp ned og slå den fast mot tørkepapir for å fjerne eventuell gjenværende væske.
3. Tilsett 100 µL prøvefortynner, fortynnete standarder, kontroller, eller fortynnete prøver i de respektive brønnene.
4. Inkuber ved 15°C til 25°C i 30 ± 1 minutter.
5. Vask mikrotiterbrønnene i alt 5 ganger med følgende fremgangsmåte:
 - a. Sug opp innholdet i hver brønn.
 - b. Tilsett ca. 300 µL vaskeløsning i hver brønn ved å bruke en vaskeflaske eller automatisk vaskeutstyr. **OBS: For de beste resultater, skal du ikke bruke en flerkanals pipette til å vaske mikrotiterplaten.**
 - c. Inkuber brønnene i 1 minutt ved 15°C til 25°C.
 - d. Sug opp innholdet i hver brønn.
 - e. Tilsett ca. 300 µL vaskeløsning i hver brønn.
 - f. Sug opp innholdet i hver brønn.
 - g. **Gjenta trinn e-f tre ganger til.**
 - h. Etter den femte vaskeomgangen snus platen opp ned, og slås fast mot tørkepapir for å fjerne eventuell gjenværende væske.
6. Ved å bruke en multikanalpipette eller en pipette for flergangsbruk, fordeles 50 µL av Bb-konjugatet i hver av de vaskede testbrønnene, også null-brønn(ene).
7. Inkuber mikrotiterstrimlene ved 15°C til 25°C i 30 ± 1 minutter.
8. Vask mikrotiterbrønnene etter 30-minutters inkubasjon (trinn 7), slik som beskrevet under *ANALYSE-PROSEDYRE*, trinn 5. **OBS: For de beste resultater, skal du ikke bruke en flerkanals pipette til å vaske mikrotiterplaten.**
9. Umiddelbart etter vaskeprosedyren fordeles 100 µL av TMB-substratløsningen i hver brønn, også null-brønn(ene). **MERK: TMB-substratet må beskyttes mot lys under oppbevaring og inkubasjon. TMB-substratet skal ikke dispenseres til et reagensreservoar eller andre apparater hvor lyseksponering kan skje før umiddelbart før det dispenseres inn i mikrotiterbrønnene.**
10. Inkuber mikrotiterstrimlene ved 15°C til 25°C i 15 ± 1 minutter i mørket.
11. Tilsett 100 µL stoppløsning i hver brønn for å stoppe den enzymatiske reaksjonen. Stoppløsningen skal tilsettes brønnene i samme rekkefølge og med samme fordelingshastighet som med substratløsningen.
12. Slå forsiktig på platen slik at fargeutviklingen fordeler seg helt og jevnt.
13. Bestem absorbansen ved avlesning ved 450 nm for hver testbrønn innen en time etter tilsetning av stoppløsningen (trinn 11), og utfør en null-korreksjon i overensstemmelse med det spektrofotometriske systemet som brukes.
14. Kast det som er igjen av fortynnete prøver, kontroller, substrat, og de brukte mikrotiterstrimlene (se *ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER*).

KVALITETSKONTROLL

Analysesertifikatet i dette settet er spesifikt for dette varenummeret, og skal brukes for å verifisere at de resultatene som er oppnådd i ditt laboratorium tilsvarer de som er oppnådd ved Quidel Corporation. Verdiene for optisk densitet, som er levert, er kun ment som retningslinjer. Resultatene som er oppnådd i ditt laboratorium, kan avvike.

Grenseverdier for kvalitetskontrollen foreligger. Det er meningen at kontrollverdiene skal verifisere validiteten av kurven og prøveresultatene. Hvert laboratorium bør sette opp egne parameter for akseptable analysegrenser. Hvis kontrollverdiene IKKE er innenfor ditt eget laboratoriums godkjente grenser, vil analyseresultatene betraktes som tvilsomme, og prøvene bør gjentas.

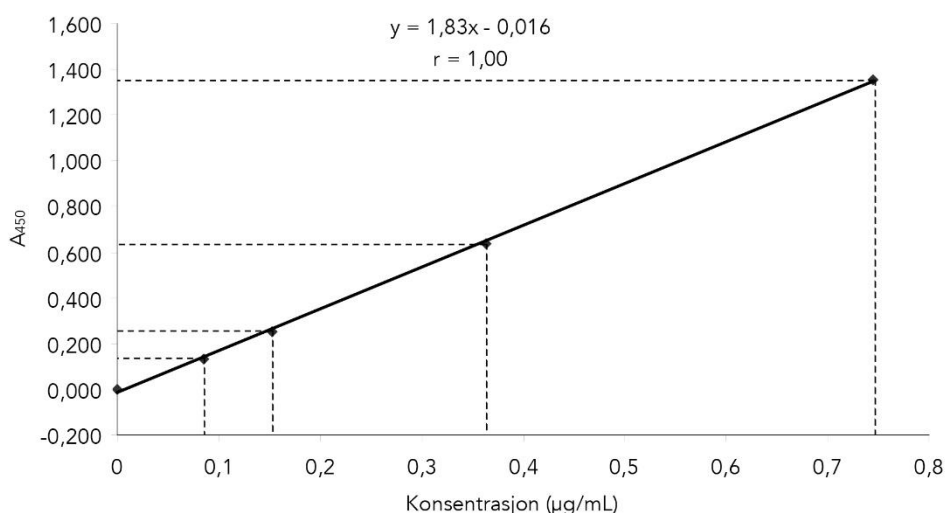
FORTOLKNING AV RESULTATER

Bruk av standardkurve

Standardkurven for Bb EIA har man fått ved å bruke A_{450} -nullverdiene som er trukket fra for hver standard (på y-aksen) og den fastsatte konsentrasjonen for hver standard (på x-aksen). Ved lineær regresjon, må den standardkurven man har fått, oppfylle valideringskriteriene (se nedenfor). De fleste datamaskiner og kalkulatorer kan utføre disse beregningene.

Alternativt kan dataene fremstilles grafisk manuelt, og verdiene ($\mu\text{g/ml}$) for testprøvene leses direkte fra den linjen i standardkurven som passer best. Et eksempel på en typisk standardkurve er vist i figur 1.

Figur 1
Representativ standardkurve



Beregning av virkelig Bb-konsentrasjon i prøvene som testes

Den virkelige Bb-konsentrasjonen i hver enkelt ufortynnet prøve bestemmes ved å multiplisere Bb/ml-konsentrasjonen, fastsatt ved settets standardkurve, med den angjeldende fortynningsfaktoren for prøven.

Hvis A_{450} -verdiene for en bestemt prøve som testes, er høyere enn den høyeste Bb i settets standard (E), skal resultatene rapporteres som "høyere enn" Bb-konsentrasjonen i det høyeste av settets standard (E) multiplisert med prøvens fortynningsfaktor. Hvis man krever en mer nøyaktig Bb-konsentrasjon, må prøven analyseres om igjen ved å bruke en høyere fortynningsfaktor. Bb-standarder og -kontroller må også testes når en analyse utføres om igjen.

VALIDERING

Bestem helningen, krysningpunktet og korrelasjonskoeffisienten for den avledede linjen som passer best. Verdien må ligge innefor de spesifiserte grensene for at analysen skal kunne godkjennes:

korrelasjonskoeffisient (r): $> 0,96$

stigning (m): mellom 1,094 og 2,558

y-krysningpunkt (b): mellom $(-)0,145$ og $0,113$

Se analysesertifikatet for akseptabelt Bb-konsentrasjonsområde for høy og lav kontroll.

BEGRENSNINGER

MicroVue Bb Plus Enzymimmunanalysen er blitt brukt til å teste prøver, som er tatt som serum eller som plasma i EDTA. Heparin plasma er IKKE egnet for denne analysen. Andre antikoagulantia er ikke blitt testet.

TESTENS YTEEVNE

Grenser

LOD: Grensen for påvisning (LOD) med Bb Plus analysen er 0,018 µg/ml, fastsatt ved høyeste 3SD-grense i en null-standard studie.

LLOQ: Den laveste grense for kvantifisering (LLOQ) med Bb Plus analysen er 0,033 µg/ml, den laveste konsentrasjonen på standardkurven som oppfyller NCCLS kriterier for nøyaktighet og presisjon.

ULOQ: Den øverste grense for kvantifisering (ULOQ) med Bb Plus analysen er 0,836 µg/ml, den høyeste konsentrasjonen som oppfyller NCCLS kriterier for nøyaktighet og presisjon.

Interfererende Substanser

Na+ Heparin på 14 U/ml (konsentrasjonen tilsvarer prøverør for heparin plasma) påvirker Bb Plus analysen, og anbefales derfor ikke brukt som antikoagulant for plasmaprøver.

Følgende substanser er testet i Bb Plus analysen, og funnet å ikke påvirke analysen:

Substans	Konsentrasjon
Bilirubin	40 mg/dl
Hemoglobin	500 mg/dl
Triglyserider	3000 mg/dl
Albumin	6000 mg/dl
Glukose	1200 mg/dl
Kolesterol	500 mg/dl

Presisjon

Presisjon i samme analyse og Mellom analyser ble fastsatt ved vurdering av 20 dobbelttester av 2 plasmaprøver og 2 serumprøver i 10 forskjellige analyseomganger.

Prøve	Bb (µg/ml)	I samme analyse ¹ C.V. (%)	Mellom-analyser ² 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

¹n = 20 dobbelttester ²n = 10 omganger

Linearitet

Linearitet ble utført ved å blande serier av fortynnete prøver, og sammenligne de observerte verdiene med forventede verdier. Typiske resultater vises nedenfor.

Prøve	Fortynnings faktor	Observert Bb (µg/ml)	Forventet Bb (µg/ml)	Gjenopprettelse (%)
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%

PRØVEVERDIER

EDTA-plasma fra trettiseks (36) og serum fra førtini (49) normale blodgivere ble testet i MicroVue Bb Plus Enzymimmunanalysen. Resultatene vises nedenfor.

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

MERK: Gjennomsnittsverdien og standardavviket (SD) for Bb-fragment-konsentrasjonene som er fastsatt for plasma- eller serumprøver kan være forskjellige, avhengig av laboratoriet. Derfor anbefales det at hvert laboratorium fastsetter gjennomsnittsverdien for Bb-fragmentkonsentrasjon og standard-avvik for prøvene.

ASSISTANSE

For service utenfor USA, vennligst ta kontakt med din lokale forhandler. Ytterligere informasjon om Quidel, vare produkter og vare fordelere kan bli funnet på vår website på quidel.com.

REFERANSER

- 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.
- 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
- Pangburn, M.K. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol* 7:163.
- 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.
- 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. Aggarwaal, 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. Pawluczkwycz, 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

PIA027003NO00 (09/21)

ORDLISTE

REF

Katalognummer



CE-merking for samsvar

EC REP

Autorisert representant
i EU

LOT

Partikode



Bruk innen



Produsent



Temperaturbegrensning



Bruksområde



Se e-merking instruksjonene før bruk



Biologisk risiko

IVD

Til *in vitro* diagnostisk bruk



Inneholder tilstrekkelig i henhold til
96 bestemmelser

CONT

Innhold/Inneholder

CONTROL

Kontroll
