

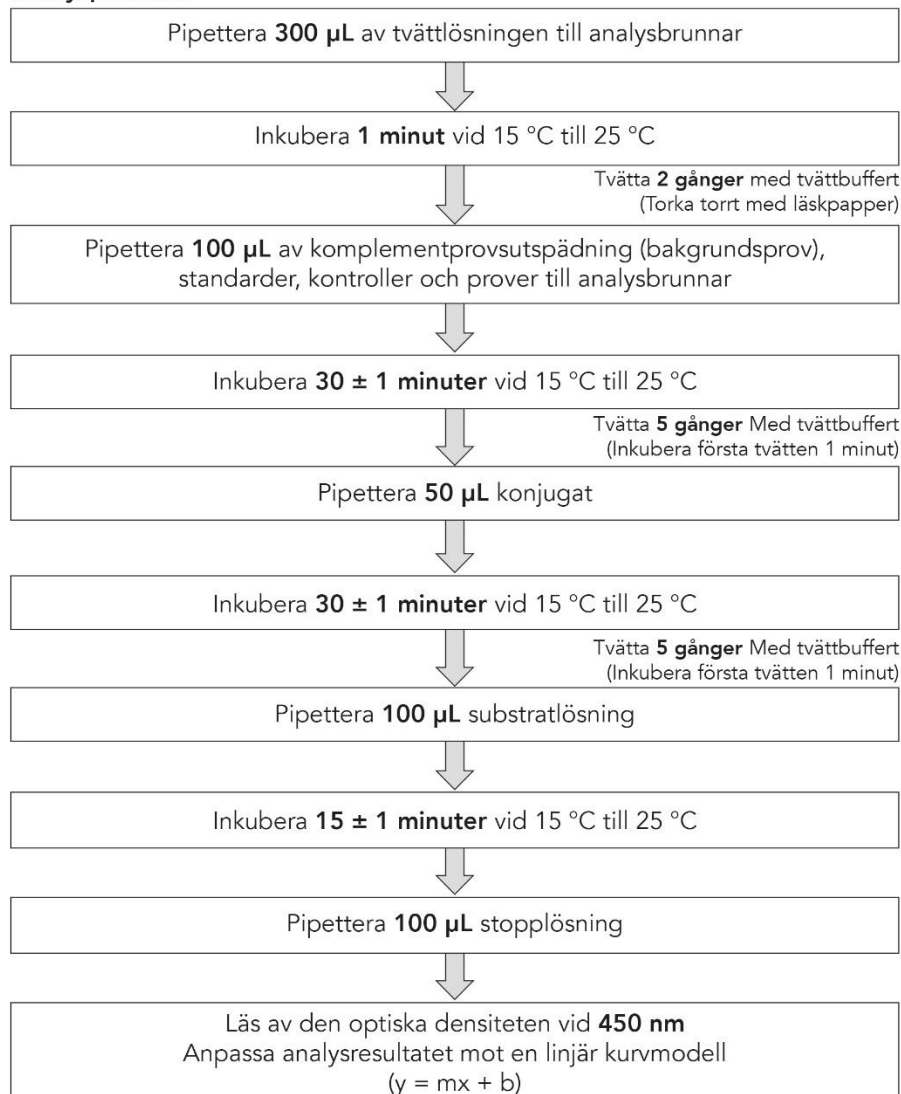
En enzymimmunanalis för kvantifiering av Bb fragmentet från faktor B, en indikator av aktiveringen av den alternativa komplementbanan, i människaplasma och serum

SAMMANDRAG

Reagens, standarder, kontroller och provförberedelse

- Späd tvättbuffertkoncentratet 1:20 med destillerat vatten.
- Rekonstruera varje standard och kontroll med 1,0 mL hydratiserande reagens (låt det stå i 15 minuter och blanda försiktigt före användning)
- Späd ut plasmaprover 1:10 med komplementprovsutspädning (t ex 50 μ L + 450 μ L) (pipettera till analysbrunnar inom 30 minuter)
- Späd ut serumprover 1:20 med komplementprovsutspädning (t ex 25 μ L + 475 μ L) (pipettera till analysbrunnar inom 30 minuter)

Analysprocedur





AVSEDD ANVÄNDNING

MicroVue Bb Plus enzymimmunanalys kit mäter mängden av komplementfragmentet Bb, ett aktiveringsfragment till Faktor B i den alternativa komplementvägen, i humanplasma eller -serum. Mätning av Bb i humanplasma eller -serum tillhandahåller bevis för inblandning av den alternativa komplementvägen. Mätning av aktivering av den alternativa vägen är en hjälp vid diagnos av ett flertal njursjukdomar, t ex kronisk glomerulonefrit och lupusnefrit, såväl som flera hudsjukdomar, t ex dermatitis herpetiformis och pemphigus vulgaris (blåsdermatos). Andra sjukdomar hos vilka man observerat aktivering av den alternativa komplementvägen inkluderar reumatisk artrit, sickle cell-anemi och gramnegativa bakteriella infektioner.

SAMMANDRAG OCH FÖRKLARING

Den alternativa komplementvägen ger medfött skydd mot mikrobiella agenser vid avsaknad av specifik antikropp.¹⁻⁵ Aktiveringen av denna komplementväg kan utlösas av en mängd olika substanser inklusive mikrobiella polysackarider eller lipider, gramnegativa bakteriella lipopolysackarider och ytmarkörer, som finns på några virus, parasiter, virusinfekterade däggdjursceller och cancerceller. Vid autoimmuna sjukdomar kan den alternativa komplementvägen direkt bidra till vävnadsskada.

En centralt viktig reaktion som uppstår under aktivering av den alternativa vägen är konverteringen av Faktor B- zymogen med en molekylärvikt på 93 kD till ett aktivt proteolytiskt enzym. Detta genomförs i en tvåstegsreaktion. Under det första reaktionssteget bildar Faktor B ett magnesium-beroende komplex med C3(H₂O) eller C3b.⁴ C3(H₂O),B-komplexet bildas endast i vätskefas medan C3b,B-komplexet kan bildas antingen i vätskefas eller på en målyta.¹⁻⁴ Faktor B, som finns i C3(H₂O),B eller C3b,B-komplexet, klyvs i det andra reaktionssteget av enzymet i den alternativa vägen, Faktor D, i fragmenten Ba (33 Kd) och Bb (60 Kd).¹⁻⁴ Det resulterande C3b,Bb-bimolekylära komplexet är den alternativa vägens C3- konverteringsenzym. Bb-subenheten är komplexets katalytiskt aktiva site som är kapabel att klyva C3 i fragmenten C3a och C3b.^{1-4,6} Ytterligare C3b-fragment som framställts på detta sätt kan bilda det trimolekylära komplexet C3b,Bb,C3b som är den alternativa vägens C5- konverteringsenzym. Detta C5-konvertas är kapabelt att klyva C5 i fragmenten C5a och C5b.^{1-4,6}

Den alternativa vägens C3- och C5-konvertaser kan stabiliseras av Faktor P (också kallad properdin), en komponent i den alternativa vägen som normalt finns i humanplasma eller -serum,¹⁻⁴ eller av nefritfaktor C3, en autoantikropp som produceras hos några patienter som upplever en omfattande aktivering av den alternativa vägen.⁵ Den alternativa vägens konvertaser C3 och C5 kan dissocieras och därmed inaktiveras genom spontan sönderfallsdissociering⁷ eller genom bindning av Faktor H eller komplementreceptor (Complement Receptor) 1 (CR1).^{4,8} Bb-fragmentet som dissocieras från någondera konvertaser bibehåller några biologiska aktiviteter, t ex retention av funktionell hemolytisk aktivitet,^{4,9} förmågan att framkalla makrofagspridning,¹⁰ och plasminogen aktivering.¹¹

Fastän aktivering av den alternativa vägen tros uppträda primärt vid frånvaro av specifik antikropp, uppstår många situationer, i vilka aktivering av den alternativa vägen kan uppstå som resultat av aktivering av den klassiska vägen. Till exempel kan immunkomplex som finns hos patienter med autoimmuna sjukdomar utlösa aktivering av den klassiska komplementvägen med en resulterande produktion av C3b-fragment. Såsom beskrivits ovan, är dessa C3b-molekyler kapabla att binda Faktor B och initiera klyvning av denna i fragmenten Ba and Bb. Således kan aktivering av den alternativa vägen uppstå i tillstånd av antikroppsmedierad autoimmun sjukdom och kan väsentligt bidra till ökad komplementaktivering och åtföljande vävnadsförstörelse.

Genom att fastställa Faktor B-klyvningsprodukter i prover kan man uppskatta omfattningen av användandet av den alternativa vägen som uppstår vid tiden för provtagning i det sjukdomstillstånd som är under utredning. MicroVue Bb Plus EIA tillhandahåller en enkel, snabb, icke-radioaktiv, högst noggrann och kvantitativ procedur för mätning av Faktor B-aktivering. Den är idealisk för undersökningar som involverar

den alternativa komplementvägens roll eller status i ett stort antal forsknings- och kliniska miljöer och för att följa bildandet av Bb *in vitro*.

PROCEDURENS PRINCIP

MicroVue Bb Plus EIA (enzymimmunanlys) för kvantifiering av Bb i humanserum, -plasma eller andra prover är en trestegsprocedure, där man använder (1) en mikroanalysplatta som är ytbehandlad med en monoklonal antikropp från mus som specifikt binder till human-Bb, (2) ett HRP-konjugerat murint anti-humant Bb och (3) ett kromogent substrat.

I det första steget tillsätts standarder, kontroller och testprover till mikroanalysbrunnar som i förväg är ytbehandlade med en specifik anti-Bb-monoklonal antikropp. Bb, men inte Faktor B eller andra komplementaktiveringsprodukter, som finns i standarder, kontroller eller prover, kommer att binda till den immobiliserade anti-Bb-monoklonala antikroppen. Efter inkubering avlägsnar en tvättprocedure obundet material.

I det andra steget tillsätts pepparrotsperoxidase- (horseradish peroxidase) (HRP) konjugerad murin anti-Bb-antikropp till varje testbrunn. Det enzym-konjugerade anti-Bb:t binds till Bb som har bundits in till mikroanalysbrunnarna. Efter inkubering avlägsnar en tvättprocedure obundet överskott av konjugat.

I det tredje steget tillsätts ett kromogent enzymsubstrat till varje mikroanalysbrunn. Det bundna HRP-konjugerade materialet reagerar med substratet och bildar en blå färg. Efter inkubering stoppas enzymreaktionen kemiskt, färgen ändrar sig till gul och färgintensiteten mäts spektrofotometriskt vid 450 nm. Reaktionsblandningens färgintensitet är proportionell till den Bb-koncentration som finns i testproverna, standarderna och kontrollerna.

INGÅENDE REAGENSER OCH MATERIAL

96 analyser för Faktor B:s Bb-fragment

MicroVue Bb Plus Enzymimmunanlys innehåller följande:

A Bb Plus Standarder	Del A9948-A9952	var och en 1 mL
B (lyofiliserad) Var och en innehåller en känd koncentration av Bb i humanserum utspätt i PBS,		
C proteinstabilisatorer, 0,035 % ProClin® 300		
D		
E		
L Bb Plus Låg Kontroll	Del A9953	1 mL
(lyofiliserad) Innehåller en känd koncentration av Bb i humanserum utspätt i PBS, proteinstabilisatorer, 0,035% ProClin 300		
H Bb Plus Hög Kontroll	Del A9955	1 mL
(lyofiliserad) Innehåller en känd koncentration av Bb i humanserum utspätt i PBS, proteinstabilisatorer, 0,035% ProClin 300		
1 Mikroanalysplatta	Del A9559	12 x 8 brunnar
12 åttabrunnsremсор ytbehandlade med en renad monoklonal antikropp från mus specifik för human-Bb i en återförslutningsbar foliepåse		
2 Stopplösning	Del A9947	12 mL
Innehåller 1N saltsyra		
3 20X Tvättlösning Koncentrat	Del A9957	50 mL
Var och en innehåller fosfatbuffrad saltlösning (PBS), 1,0 % Tween-20®, och 0,035 % ProClin 300		
4 Komplementprovspädningsvätska	Del A3670	50 mL
Innehåller PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% proteinstabilisatorer, 0,035% ProClin 300		

- | | | |
|----------|---|--------------------------------------|
| 5 | TMB Substrat
Innehåller 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) och Väteperoxide (H ₂ O ₂) | Del 5059

12 mL |
| 6 | Bb Plus-konjugat
Innehåller pepparrotsperoxidas-konjugerat murint anti-human-Bb upplöst i HRP-stabiliseringsbuffert med skyddsmedel | Del A9956

7 mL |
| 8 | Hydratiserande reagens
Innehåller 0,035% ProClin 300 | Del A3675

25 mL |

Tween-20® är ett varumärke som tillhör ICI Americas Inc.
ProClin® är ett varumärke som tillhör Rohm and Haas Company.

ERFORDERLIGA MEN EJ INGÅENDE MATERIAL

- Timer (60 minuters)
- Miniräknare eller annan databaserad metod för utvärdering av analysen
- Rena, oanvända mikroanalysplattor och/eller provrör och ställ
- Behållare för utspädd tvättbuffert
- Tvättflaska eller annat tvättsystem för immunanalys
- Justerbar multikanalpipett (8 eller 12 kanaler) eller repetermikropipetter (valfritt)
- Rena pipetter, 1 mL, 5 mL och 10 mL
- Mikropipetter och pipettspetsar
- Plattavläsare som kan läsa av en optisk densitet på mellan 0,0 och 2,0
- Avjonat eller destillerat vatten

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- För *in vitro*-diagnostisk användning.
- Användning av heparinplasma i denna analys kan ge felaktiga resultat.
- Behandla proverna som potentiellt riskavfallsmaterial. Följ allmänna försiktighetsåtgärder vid hantering av innehållet i detta kit och eventuella patientprover.
- Använd de tillhandahållna reagenserna som en sammanhängande enhet före det utgångsdatum som finns angivet på förpackningsetiketten.
- Lagra analysreagenserna enligt föreskrift.
- Använd inte de ytbehandlade remsorna om det har gått hål på påsen.
- Vid tillförande eller utsugning av vätskor från mikroanalysbrunnarna, skrapa inte i eller vidrör botten på brunnarna.
- Användning av andra inkuberingstider och -temperaturer än de som föreskrivits i Procedur-avsnittet kan ge felaktiga resultat.
- Låt inte mikroanalysbrunnarna torka ut när analysen väl har börjat.
- Använd inte samma mikroanalysbrunn för mer än ett test.
- Användning av multikanalpipetter eller repeterpipetter rekommenderas för försäkran om tillsättning av reagens på utsatt tid.
- För exakt mätning av prover, tillsätt prover och standarder i exakt mängd. Pipettera noggrant och använd endast kalibrerad utrustning.
- Korrekt insamling och lagring av prover är väsentlig för noggranna resultat (se *INSAMLING OCH FÖRBEREDANDE AV PROVER*, sid 4).
- Undvik mikrobiell eller korskontaminering av prover, reagenser eller material. Oriktiga resultat kan erhållas vid kontaminering.
- Varje donerat prov som använts vid framställningen av standarder och kontrollserum har testats med en FDA-godkänd metod beträffande befintlighet av antikropp riktad mot humant immunodeficiensvirus, (HIV 1 och 2) och hepatit C-virus, såväl som beträffande hepatit B-ytantigen, och proverna har befunnits vara negativa (där de inte har varit upprepat reaktiva). Eftersom emellertid ingen testmetod kan erbjuda en fullständig försäkran om att infektiösa agenser inte finns, bör dessa reagenser hanteras på biosäkerhetsnivå 2, såsom rekommenderas för eventuellt potentiellt infektiöst

humanserum eller -blodprov i manualen "Biosäkerhet på mikrobiologiska och biomedicinska laboratorier" ("Biosafety in Micro-biological and Biomedical Laboratories") 2007 på centra för sjukdomskontroll/statliga hälsovårdsinstitut.

- ProClin 300 används som ett skyddsmedel. Tillfällig kontakt med eller förtäring av buffertar eller reagenser som innehåller ProClin kan orsaka irritation på huden, i ögonen eller munnen. Använd god laboratoriepraxis (GLP) för att reducera exponering. Sök medicinsk vård vid eventuella symptom.
- **Substratkoncentratet är ljuskänsligt. Undvik utdragen exponering för starkt eller direkt ljus. Lagra reagenserna i mörker när de inte används.**
- För undvikande av aerosolbildning vid tvättning kan man använda en apparat för att suga ut tvättvätskan i en flaska som innehåller hushållsblekningsmedel.
- **En sprutflaska bör användas för att tvätta plattan. För bästa resultat, använd inte en multkanalpipett för att tvätta av mikroanalysplattan.**
- Värmeinaktiverade, hyperlipemiska eller kontaminerade prover kan ge felaktiga resultat.
- Testning ska utföras i utrymmen med tillräcklig ventilation.
- Kassera behållare och oanvänt innehåll i enligt gällande nationella och lokala reglerings föreskrifter.
- Använd lämpliga skyddskläder, -handskar och -glasögon/ansiktsskydd vid hantering av kitets innehåll.
- Tvätta händerna grundligt efter hantering.
- För ytterligare information om farosymboler, säkerhet, hantering och bortskaffande av delarna som ingår i denna sats, hänvisas till säkerhetsdatabladet (SDS) på quidel.com.

FÖRBEREDANDE AV REAGENS

Värm alla reagenser och material till 15°C till 25°C före användning.

Lägg efter borttagning av de reagenser och material som behövs tillbaka de oanvända artiklarna i sin rätta lagringstemperatur (se *LAGRING*).

Ytbehandlade Remsor

Bestäm antalet remsor som behövs för analysen. Ta bort det önskade antalet remsor. Fäst de remsor som ska användas i plattans ram. Lägg tillbaka de remsor som inte behövs i lagringspåsen, förslut påsen och lagra den vid 2°C till 8°C.

Tvättlösning

Förbered tvättlösningen för tvättning av mikroanalysbrunnarna genom att späda ut 50 mL av 20X-tvättlösningskoncentratet med destillerat eller avjonat vatten till en slutlig volym på en liter. Blanda ordentligt före användning. Tvättlösningen håller sig i 30 dagar, om den lagras i ett rent kärl vid 2°C till 8°C. Om grumlighet uppstår, kassera reagensen.

Bb Plus Standard- och Kontrollspädning

Tillsätt 1,0 mL hydratiserande reagens till varje standardvial (A-E) och till den låga kontrollen och den höga kontrollen. Låt de rekonstituerade vialerna rehydrera i minst 15 minuter i rumstemperatur. Blanda noggrant. Undvik skum- eller bubbelbildning under blandandet. Rekonstituerade standarder och kontroller håller sig i 30 dagar vid lagring vid 2°C till 8°C.

Provutspädning

WARNING: Behandla alla prover som om de vore potentiellt infektiösa. Använd inte värmeinaktiverade eller kontaminerade prover.

Det rekommenderas att plasmaprover späds ut 1:10 i provutspädning för användning i MicroVue Bb Plus enzymimmunanalys. Det rekommenderas att serumprover späds ut 1:20 i provutspädning. När de väl späts ut måste proverna tillsättas till mikroanalysbrunnarna inom 30 minuter. Lagra eller återanvänd inte utspädda prover. Eventuella återstående prover ska kasseras.

Prover med höga nivåer av komplementaktivering kan fordra högre provspädning än de tidigare nämnda.

Tillsättning av utspädda prover i mikrotiterbrunnarna

Endera av två metoder kan användas för att tillsätta utspädda prover, standarder, kontroller och buffertar till brunnarna (se Steg 3 i *ANALYSPROCEDUR*) För små analyskörningar, där endast ett fåtal prover testas, kan de utspädda proverna och andra reagenser tillsättas direkt till sina anvisade brunnar med en mikropipett (100 µL/brunn). För små eller stora körningar, men särskilt för större körningar, rekommenderar vi användning av en multikanalspipett för tillsättande av prover enligt följande (**En multikanalspipett kan användas för att på ett bekvämt sätt tillsätta konjugatet och substratet, såväl som stopplösningen**).

För att ladda mikroanalysbrunnarna med standarder, kontroller och utspädda prover så snabbt som möjligt kan man använda sig av en "replica plating"-procedur. Istället för att tillsätta 100 µL av vart och ett av standard, kontroll eller utspätt prov till de antikroppsytbehandlade brunnarna var för sig, kan 120-130 µL av varje lösning tillsättas till var och en av brunnarna på en tom platta (ingår ej) som motsvarar det slutliga, önskade EIA-mönstret. Sedan alla lösningar som ska testas har tillsatts till mikroanalysbrunnarna på den tomma plattan, ska 100 µL snabbt överföras från varje brunn för bakgrundsbestämning till de antikroppsytbehandlade brunnarna med användning av en multikanalsmikropipett. För att undvika möjligheten till korskontaminering måste pipettspetsar bytas ut varje gång man byter till annan provsammansättning som ska överföras.

LAGRING

Lagra oöppnat kit vid 2°C till 8°C Sedan kitet öppnats, kan 20X-tvättlösningskoncentratet och den hydratiserande reagensen lagras vid 2°C till 25°C.

Alla reagenser måste tas fram i rumstemperatur (15°C till 25°C) före användning. Lägg alla oanvända mikroanalysremсор i lagringspåsen, återförslut påsen och lagra vid 2°C till 8°C.

INDIKATIONER PÅ INSTABILITET ELLER FÖRSÄMRING HOS REAGENSER

Grumlighet i tvättlösningen indikerar försämring av denna reagens. Om detta inträffar, ska lösningen kasseras.

INSAMLING OCH FÖRBEREDANDE AV PROVER

Hantera och kasta alla prover med användande av allmänna försiktighetsåtgärder.

Korrekt insamling och lagring av prover är viktig, eftersom Faktor Bb är känslig för proteolys i felaktigt insamlade eller lagrade prover.

Beroende på komplementaktivering som uppkommer under koagulering blir Bb-koncentrationen i normala humanserumprover högre än de som erhålls med EDTA-plasmaprover. Bb-nivåerna i EDTA-plasma kan därför på ett mera riktigt sätt representera *in vivo*-koncentrationerna.

Serumprover eller EDTA-plasmaprover ska samlas in aseptiskt med användande av standardtekniker. Proverna ska testas omedelbart eller lagras vid 4°C eller på is tills analys är gjord. Denna korttidslagring på is får emellertid inte överskrida fyra timmar.

För långtidslagring ska serum eller plasma frysas vid -70°C eller lägre inom två timmar efter insamling.

Tina frusna ($\leq -70^\circ\text{C}$) prover snabbt i 37°C-vattenbad tills det precis tinat. Lägg tinade prover omedelbart på is (i högst fyra timmar) för att förhindra komplementaktivering före utspädning. **Låt inte proverna ligga kvar i 37°C.** Tina inte prover i rumstemperatur eller vid 4°C, eftersom detta kan leda till

komplementaktivering. Frusna prover ska testas så snart som möjligt efter upptining. Upprepad infrysning och upptining rekommenderas ej. Om prover måste frysas om för ytterligare analys, föreslår Quidel att man fryser in multipla aliquoter av proverna för att förhindra upprepade infrysnings-/upptiningscykler.

ANALYSPROCEDUR

Läs hela produktbladet innan analysen påbörjas.

Se *VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER* och *REAGENSFÖRBEREDELSE*.

1. Registrera mikroanalysbrunnarnas positioner i förhållande till brunnen/-arna för bakgrundsbestämning, alla testprover, standarder och kontroller, såväl som de angivna serienummerna från etiketterna på vialerna. Sätt en etikett på ett hörn av mikroanalysplattan för orienteringens skull.
2. Förbered mikroanalysremssorna på följande sätt:
 - a. Tillsätt med användning av en tvättflaska eller automatisk plattvättningssystem ca 300 µL tvättlösning till varje brunn. **OBS: För bästa resultat, använd inte en multikanalpipett för att tvätta av mikroanalysplattan.**
 - b. Inkubera brunnarna i en minut vid 15°C till 25°C.
 - c. Sug ut innehållet från varje brunn.
 - d. Tillsätt ca 300 µL tvättlösning till varje brunn.
 - e. Sug ut innehållet från varje brunn.
 - f. Upprepa steg d-e en gång till, totalt tre tvättningar.**
 - g. Vänd upp och ner på plattan och knacka den hårt mot ett absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska.
3. Tillsätt 100 µL av provutspädning, rekonstruerade standarder, kontroller eller utspädda prover till de därför avsedda brunnarna.
4. Inkubera vid 15°C till 25°C i 30 ± 1 minuter.
5. Tvätta mikroanalysbrunnarna totalt 5 gånger med användning av följande procedur:
 - a. Sug ut innehållet från varje brunn.
 - b. Tillsätt med användning av en tvättflaska eller automatisk plattvättningssystem ca 300 µL tvättlösning till varje brunn. **OBS: För bästa resultat, använd inte en multikanalpipett för att tvätta av mikroanalysplattan.**
 - c. Inkubera brunnarna i 1 minut vid 15°C till 25°C.
 - d. Sug ut innehållet från varje brunn.
 - e. Tillsätt ca 300 µL tvättlösning till varje brunn.
 - f. Sug ut innehållet från varje brunn.
 - g. Upprepa steg e-f ytterligare tre gånger.**
 - h. Vänd efter den femte tvättomgången upp och ner på plattan och knacka den hårt mot absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska.
6. Fördela genom användning av en multikanals- eller repeterpipett 50 µL Bb-konjugat till varje tvättad testbrunn, inklusive brunnen/-arna för bakgrundsbestämning.
7. Inkubera mikroanalysremssorna vid 15°C till 25°C i 30 ± 1 minuter.
8. Tvätta mikroanalysbrunnarna efter 30-minutersinkuberingen (steg 7) som det beskrivs under *ANALYSPROCEDUR*, steg 5. **OBS: För bästa resultat, använd inte en multikanalpipett för att tvätta av mikroanalysplattan.**
9. Fördela omedelbart efter tvättproceduren 100 µL av TMB-substratlösningen till varje brunn, inklusive den/de för bakgrundsbestämning **OBS: TMB-substratet måste skyddas mot ljus under förvaring och inkubation. TMT-substratet bör inte dispenserar i en reagensreservoar eller annan apparatur i vilken exponering för ljus kunde vara möjlig, förrän alldeles innan man dispenserar i mikroanalysbrunnarna.**
10. Inkubera mikroanalysremssorna vid 15°C till 25°C i 15 ± 1 minuter i mörker.
11. Tillsätt 100 µL stopplösning till varje brunn för att stoppa den enzymatiska reaktionen. Stopplösningen ska tillsättas till brunnarna i samma ordning och i samma takt som substratlösningen har tillsatts.
12. Knacka försiktigt plattan mot bänkens översida för att sprida färgutvecklingen fullständigt och jämnt.

13. Bestäm absorberingsavläsningen vid 450 nm för varje testbrunn inom en timma efter tillsättandet av stopplösningen (steg 11) genom att göra en bakgrundskorrigerig enligt det använda spektrofotometriska systemet.
14. Kasta de återstående utspädda proverna, kontrollerna, substraten och de använda mikroanalysremorna (se *VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER*).

KVALITETSKONTROLL

Analyscertifikatet som finns med i detta kit är serienummerspecifikt och ska användas för att verifiera att resultaten som erhållits av ert laboratorium är liknande dem som erhållits på Quidel Corporation. De tillhandahållna värdena för optisk densitet är endast avsedda som riktlinje. De resultat som erhålls av ert laboratorium kan avvika.

Intervallerna för kvalitetskontroll tillhandahålls. Kontrollvärdena är avsedda att verifiera kurvans och provresultatens validitet. Varje laboratorium bör etablera sina egna parametrar för acceptabla analysgränser. Om kontrollvärdena INTE är inom ert laboratoriums acceptansgränser, bör analysresultaten anses diskutabla och provtagningarna bör upprepas.

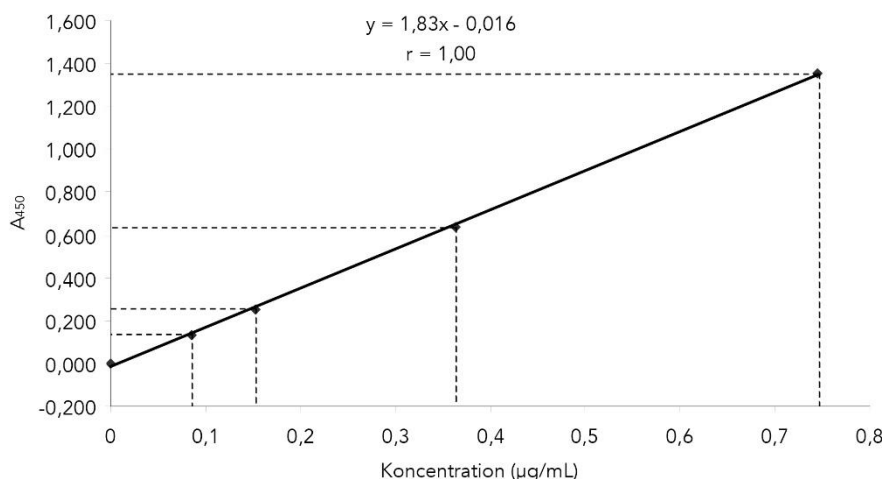
TOLKNING AV RESULTAT

Användning av standardkurvan

Standardkurvan för Bb EIA har tagits fram genom att man använt de frändragna A_{450} - bakgrundsvärdena för varje standard (på Y-axeln) och den anvisade koncentrationen för varje standard (på x-axeln). Efter linjär regression måste den framtagna standardkurvan möta valideringskraven (se nedan). De flesta datorer och miniräknare klarar av att utföra dessa beräkningar.

Alternativt kan data visas grafiskt på manuell väg och värdena ($\mu\text{g/mL}$) på testproverna avläsas direkt från den bäst anpassade trendlinjen på standardkurvan. Ett exempel på en typisk standardkurva visas i Figur 1.

Figur 1
Representativ Standardkurva



Beräkning av faktisk Bb-koncentration i prover

Den faktiska Bb-koncentration som finns i varje utspätt testprov fastställs genom multiplicering av den Bb/mL-koncentration, som bestämts ur kitets standardkurva, med det reciproka värdet av den använda provutspädningsfaktorn.

Om A_{450} -värdena för ett givet testprov är högre än det för Bb-högsta-kit-standarden (E), ska resultaten rapporteras som "högre än" den högsta-kit-standarden (E) Bb-koncentration multiplicerad med provutspädningsfaktorn. Om ett mera noggrant Bb-koncentrationsvärde erfordras, kan testproverna

omanalyseras med användning av en högre utspädningsfaktor. I alla oanalyser måste Bb-kit-standarder och -kontroller också köras.

VALIDERING

Bestäm lutningen, interceptet och korrelationskoefficienten på den erhållna bäst anpassade trendlinjen. Värdena måste vara inom de specificerade intervallerna för att kvalificera analysen:

korrelationskoefficient (r):	> 0,96
lutning (m):	mellan 1,094 och 2,558
y-avskärning (b):	mellan (-)0,145 och 0,113

Se analyscertifikatet angående godtagbart intervall för Bb-koncentrationer för höga och låga kontroller.

BEGRÄNSNINGAR

MicroVue Bb-Plus enzymsimmunanalys (MicroVue Bb Plus Enzyme Immunoassay) har använts för att testa prover insamlade som serum eller plasma i EDTA. Heparinplasma är INTE lämplig för denna analys. Andra anti-koagulerande medel har inte testats.

UTFÖRANDE AV TESTET

Begränsningar

LOD: Detektionsgränsen (The limit of detection) (LOD) för Bb Plus-analysen är 0,018 µg/mL, bestämd av den övre 3SD-gränsen i en nollstandardstudie.

LLOQ: Den lägre gränsen för kvantifiering (The lower limit of quantitation) (LLOQ) för Bb Plus-analysen är 0,033 µg/mL, den lägsta koncentration på standardkurvan som mötte NCCLS:s kriterier för noggrannhet och precision.

ULOQ: Den övre gränsen för kvantifiering (The upper limit of quantitation) (ULOQ) för Bb Plus-analysen är 0,836 µg/mL, den högsta koncentration som mötte NCCLS kriterier för noggrannhet och precision.

Interfererande Substanser

Na⁺ Heparin vid 14 U/mL (den koncentration som överensstämmer med heparinplasmainsamlingsrör) interfererar med Bb Plus-analysen och rekommenderas därför inte för användning som ett plasmaantikoagulerande medel för provinsamling.

Följande substanser testades i Bb Plus-analysen och befanns inte interferera med analysen:

Substans	Koncentration
Bilirubin	40 mg/dL
Hemoglobin	500 mg/dL
Triglycerider	3000 mg/dL
Albumin	6000 mg/dL
Glukos	1200 mg/dL
Kolesterol	500 mg/dL

Precision

Intra- och interkörningsprecision bestämdes genom analys av 20 replikat av 2 plasmaprover och 2 serumprover i 10 olika körningar.

Prove	Bb (µg/ml)	Intrakörning ¹ C.V. (%)	Interkörning ² C.V. (%)
EDTA Plasma	1,550	2,4	7,7
	0,517	2,5	6,7

Prove	Bb (µg/ml)	Intrakörning ¹ C.V. (%)	Interkörning ² C.V. (%)
Serum	2,129	3,1	6,2
	2,375	4,0	9,1

¹n = 20 replikat ²n = 10 körningar

Linjäritet

Linjäritet utfördes genom seriespädning av prover och genom att jämföra observerade värden med förväntade värden. Representativa resultat presenteras nedan.

Prøv	Utspädn,- Faktor	Observerat Bb (µg/ml)	Förväntat Bb (µg/ml)	Återvinning (%)
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%

PROVVÄRDEN

EDTA-plasma från trettiosex (36) och serum från fyrtionio (49) normala donatorer testades i MicroVue Bb Plus-enzymimmunanalys- (MicroVue Bb Plus Enzyme Immunoassay) kitet. Resultaten presenteras nedan.

	n	Medel (µg/mL)	Intervall (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

Anmärkning: Medelvärdes- och standardavvikelse- (Standard Deviation) (SD) beteendet hos Bb-fragmentkoncentrationer som är bestämda för plasma- eller serumprover kan variera mellan laboratorier. Därför rekommenderas att varje laboratorium bestämmer medelvärdet för Bb-fragmentkoncentration och standardavvikelsevärdena för prover.

SUPPORT

För tjänster utanför USA: kontakta en lokal distributör för Quidel-produkter. Ytterligare information om Quidel, våra produkter eller distributörer finns på vår hemsida quidel.com.

REFERENSER

1. 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.
2. 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, neopeptide 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. Pawluczowycz, 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

PIA027003SV00 (09/21)

ORDLISTA

REF

Katalognummer



CE-märkning om överensstämmelse

EC REP

Auktoriserad representant inom europeiska gemenskapen

LOT

Satskod



Använd före



Tillverkare



Temperaturbegränsning



Avsedd användning



Konsultera e-märkning bruksanvisning



Biologisk risk

IVD

För *in vitro*-diagnostik



Innehållet räcker till 96 bestämningar

CONT

Innehåll/innehåller

CONTROL

Kontroll
