

Et immunoassay til kvantitering af Ba fragmentet af Factor B, en indikator for aktivering af den Alternative komplementvej, i human urin, plasma og serum

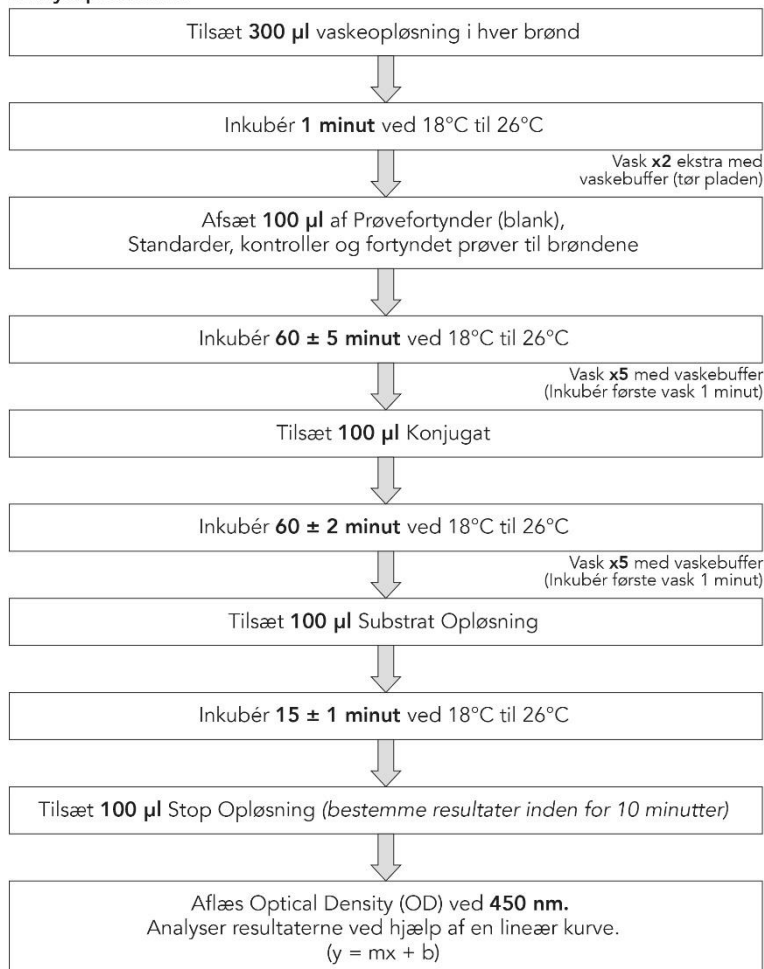
Til *in vitro*-diagnostisk brug. Kun til eksport. Ikke til salg eller brug i USA eller Canada.

OPSUMMERING

Reagenser , standarder , kontroller og prøve forberedelse

- Fortynd Vaskeopløsning Koncentrat **1:20** med destilleret vand
- Fortynd urinprøver **1:15** med Prøvefortynder
(f.eks. 25 µl + 350 µl)
- Fortynd plasmaprøver **1:1000** med Prøvefortynder i to trin
(f.eks. 10 µl prøve + 990 µl prøvefortynder >
40 µl fortyndet prøve + 360 µl prøvefortynder)
- Fortynd serumprøver **1:2000** med Prøvefortynder i to trin
(f.eks. 10 µl prøve + 990 µl prøvefortynder >
20 µl fortyndet prøve + 380 µl prøvefortynder)

Analyseprocedure





ANVENDELSES OMRÅDE

MicroVue Ba Enzym Immunoassay Kit bestemmer mængden af komplement fragmentet Bb, et aktiveringsfragment af Factor B fra den alternative komplementvej, i human urin, plasma eller serum. Aflæsning af Ba i human urin, plasma eller serum giver dokumentation for, at den alternative vej er involveret. Aflæsning af den aktiverede alternative vej, hjælper til diagnosticering af flere nyre sygdomme, f.eks kronisk glomerulonephritis, lupus nephritis så vel som flere hudsygdomme f.eks dermatitis herpetiformis og pemphigus vulgaris. Andre sygdomme hvor aktivering af den alternative komplementvej er observeret, inkludere aldersrelateret makulær degenerering, ufrivillig abort ved risikobehæftet graviditet, rheumatoid arthritis (RA), og sickle cell anemia.^{1, 4, 14-22}

OVERSIGT OG BESKRIVELSE AF TESTEN

Den alternative komplement vej giver naturlig beskyttelse mod mikrobielle organismer, ved fravær af specifikke antistoffer.⁵⁻⁹ Aktivering af denne komplement vej kan udløses af mange substanser, inklusiv mikrobielle polysaccharider eller lipider, gramnegative bakteriel lipopolysaccharider og overflade determinanter præsenteret på visse vira, parasitter, viral inficerede mammalian celler og cancer celler. I autoimmune sygdomme kan aktivering af den alternative komplement kaskade, bidrage direkte til vævs ødelæggelse.

En central og vigtig reaktion sker under aktivering af den alternative vej, konvertering af 93 Kd Factor B zymogen til et aktivt proteolytisk enzym. Dette sker i to trin. Under første reaktion former Factor B et magnesium-afhængig kompleks med C3(H₂O) eller C3b.⁸ C3(H₂O),B komplekset dannes kun i væske-fase mens C3b,B komplekset kan dannes enten i væske-fase eller på en overflade.⁵⁻⁸ Factor B, som er tilstede i C3(H₂O),B eller C3b,B komplekset, bliver kløvet til Ba (33 Kd) og Bb (60 Kd) fragmenter i det andet trin ved hjælp af enzymet Faktor D i den alternative vej.^{5-8,13}

Selvom den alternative aktiveringsvej menes at foregå primært ved fravær af specifikt antistof, opstår mange situationer, i hvilken den alternative aktiveringsvej vil ske som et resultat af aktivering af den klassiske aktiveringsvej. For eksempel kan immunkomplekser der er til stede i patienter med autoimmune sygdomme, udløse den klassiske aktiveringsvej med det resultat, at der produceres C3b fragmenter. Som beskrevet herover er disse C3b molekyler i stand til, at binde Factor B og initierer kløvning til Ba og Bb fragmenter. Således kan den alternative aktiveringsvej optræde i antistof medieret autoimmune tilstande, og kan bidrage signifikant til forstærket komplement aktivering, og deraf følgende vævs destruktion.

Ved aflæsning af Factor B kløvnings produkter i prøver udtaget på sygdomstidspunktet, kan man estimere omfanget af den alternative aktiveringsvej. MicroVue Ba EIA giver en simpel, hurtig, ikke-radioaktiv, høj specifik og kvantitativ procedure til aflæsning af Factor B aktivering. Det er ideelt til undersøgelse af rolle eller status, af den alternative komplement aktiveringsvej i adskillig forskning, klinisk baggrund, og for monitorering af generering af Ba *in vitro*.

PROCEDURE PRINCIP

MicroVue Ba Enzym Immunoassay til kvantitering af Ba i human urin, serum eller plasma er en tretrin procedure, der anvender (1) en microassay plade coatet med et musse monoklonalt antistof, der binder specifikt til human Ba, (2) et HRP-konjugeret polyklon anti-human faktor-B antistof, og (3) et kromogent substrat.

I første trin tilsættes standarder, kontroller og prøvemateriale til brøndene præcoatede med et specifikt anti-Ba monoclonalt antistof. Ba, men ikke Factor B, eller andre komplement aktiverings produkter der er til stede i standarder, kontroller eller prøver, vil binde sig til det immobiliserede anti-Ba monoklonale antistof. Efter inkubation fjerner et vasketrin ubundet materiale.

I andet trin tilsættes horseradish peroxidase (HRP)-konjugeret polyklon anti-human faktor-B antistof til hver brønd. Det enzym konjugerede anti-human faktor-B antistof binder til Ba bundet i brøndene. Efter inkubation fjernes overskydende ubundet konjugat ved en vaskeprocedure.

I tredje trin tilsættes et farvet enzym substrat til hver brønd. Det bundne HRP-konjugat reagerer med substratet og danner en blå farve. Efter inkubation stoppes enzym reaktionen kemisk, farven skifter til gul og farve intensiteten aflæses spektrofotometrisk ved 450 nm. Farve intensiteten er proportional med koncentrationen af Ba tilstede i prøverne, standarder og kontroller.

MEDFØLGENDE REAGENSER OG MATERIALER

96 Assay for Ba fragment af Factor B

MicroVue Ba Enzym Immunoassay kit indeholder følgende:

A Ba Standarder	Del 5159 – 5163	1 x 1,5 ml
B Klar til brug. Indeholder humant serum med tildelt Ba koncentration (ng /ml), protein stabilisatorer		
C		
D		
E		
L Ba Lav Kontroller	Del 5164	1,5 ml
Klar til brug. Indeholder humant serum med tildelt Ba koncentration (ng /ml), protein stabilisatorer		
H Ba Høje Kontroller	Del 5165	1,5 ml
Klar til brug. Indeholder humant serum med tildelt Ba koncentration (ng /ml), protein stabilisatorer		
1 Microassay Plade	Del 5166	12 x 8 brønde
Otte-brønds strips belagt med murine monoklonale antistof i genlukkelig foliepose		
2 Stopopløsning	Del A9947	12 ml
Indeholder 1N (4%) Syre-Hydrochloric		
3 20X Wash Solution Koncentrat	Del A9957	2 x 50 ml
Hver indeholder fosfat bufferet saltvand (PBS), 1,0 % Tween®-20, og 0,035 % ProClin® 300		
4 Speciment Diluent	Del A3670	50 ml
Indeholder PBS, 0.05 % Tween-20, 2,5 % protein stabilisatorer, 0,035 % ProClin 300		
5 TMB Substrat	Del 5059	12 ml
Klar til brug. Indeholder 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB)		
6 Konjugat	Del 5167	12 ml
Indeholder horseradish peroxidase-konjugeret polyklon anti-human faktor-B antistof opslemmet i HRP stabiliseret buffer med konserveringsmiddel		

Tween®-20 er et registreret varemærke af ICI Americas Inc.

ProClin® er et registreret varemærke af Rohm og Haas Company.

NØDVENDIGE MATERIALER DER IKKE MEDFØLGER

- Timer (60 minutter)
- Plade med 96 brønde til fortynding eller testrør og racks til prøvefortynding (valgfrit)
- Rene, ubrugte mikroplader til replika-plademetoden
- Graderet beholder til vaskebufferfortynding
- Vaskeflaske eller andet valideret vaskesystem til immunanalyse
- Mikropipetter og steril pipettespidser disponible
- Justerbar multikanalpipette (8 eller 12 kanaler) eller repeat-mikropipetter (valgfri)
- Reagensbeholdere til tilsætning af konjugat, substrat og stopopløsning til pladen (brug rene, ubrugte beholdere til hvert reagens)

- Pladelæser til optiske densitets aflæsninger ved A_{450} mellem 0,0 og 3,0
- Demineraliseret eller destilleret vand

ADVARSLER OG FORSIGTIGHEDS REGLER

- Til *in vitro* Diagnostik.
- Behandel prøver, som potentielt biologisk skadelige stoffer. Følg 'Universale Forholdsregler' ved håndtering af indholdet af dette kit, og alle patient prøver.
- Brug de leverede reagenser som en integreret enhed, inden udløbsdatoen angivet på pakken.
- Opbevar assay reagenser som angivet.
- Brug ikke de coatede strips, hvis posen er punkteret.
- Proclin 300 anvendes som konserveringsmiddel. Tilfældig kontakt med eller indtagelse af buffere eller reagenser der indeholder Proclin, kan forårsage irritation af hud, øjne eller mund. Anvend god laboratoriepraksis for at reducere eksponeringen. Søg lægehjælp, hvis der er symptomer.
- Stopopløsnig betragtes som ætsende, og kan forårsage irritation. Må ikke indtages. Undgå kontakt med øjne, hud og tøj. Hvis kontakt, skyl straks berørte område med vand. Ved indtagelse, ring til en læge.
- Hver enkelt donor, der anvendes i udarbejdelsen af standarder og kontrol sera af dette produkt er blevet testet af en FDA-godkendt metode, for tilstedeværelse af antistof mod human immundefekt virus (HIV 1 og HIV2) og hepatitis C-virus, såvel som for hepatitis B overflade-antigen. Da ingen testmetode kan give fuldstændig sikkerhed for, at smittefarlige stoffer ikke er til stede, skal disse reagenser behandles på biosikkerhed niveau 2, som anbefalet for alle potentielt infektiøse human serum eller blodprøve, i Centers for Disease Control / National Institutes of Health manual "Biosafety i Mikrobiologiske og Biomedical Laboratories."²³
- Brug af multikanal pipetter eller gentage pipetter anbefales.
- For nøjagtig måling af prøver, tilføj prøver og standarder præcist. Pipettér grundigt ved hjælp af kalibreret udstyr.
- Korrekt indsamling og opbevaring af prøveemner er afgørende for nøjagtige resultater (se Modellen Håndtering Og Tilberedning).
- Undgå mikrobiel eller krydskontaminering af prøver eller reagenser.
- Test hver prøve i dublikat.
- Brug ikke en brønd til mere end én test.
- Andre inkuberingstider og temperaturer end dem, der er angivet i afsnittet *ANALYSEPROCEDURE*, kan give fejlagtige resultater.
- TMB Substrat skal beskyttes mod lys og kontakt med metal eller gummi, under opbevaring og inkubation. Undgå kontakt med øjne, hud og tøj. Hvis kontakten er lavet, skyl straks de berørte område med vand.
- Tillad ikke microassay brønde at tørre, når analysen er begyndt.
- Når du fjerner væske fra microassay brønde, skrab eller rør ikke i bunden af brøndene.
- Varmeinaktiveres, hyperlipemic, eller forurenede prøver kan give fejlagtige resultater.
- For at undgå aerosoldannelse under vask, brug et apparat til at suge vask væske i en flaske med blegemiddel til husholdningsbrug.
- En vaskeflaske eller automatisk påfyldning enhed skal bruges til at vaske pladen (*ANALYSEPROCEDURE*, Trin 6). For det bedste resultat, skal du ikke bruge en multikanalpipette at vaske microassay plade med.
- Testning skal udføres i et område med tilstrækkelig ventilation.
- Bortskaf beholdere og ubrugt indhold i henhold til gældende kliniske retningslinjer for bortskaffelse af biologisk farligt materiale.
- Bær egnet beskyttelsestøj, handsker og øjen/ansigtsbeskyttelse ved håndtering af indholdet i dette kit.
- Vask hænderne grundigt efter håndtering.
- For yderligere oplysninger om faresymboler, sikkerhed, håndtering og bortskaffelse af komponenterne i dette kit henvises til sikkerhedsdatabladet (SDS), der findes på quidel.com.

OPBEVARING

Opbevar det uåbnede kit ved 2°C til 8°C.

TEGN PÅ USTABILITET ELLER FORRINGELSE AF REAGENSER

Uklarhed eller misfarvning af vaskeopløsningen, indikerer en forringelse af reagenset. Hvis dette sker, skal opløsningen kasseres.

PRÆPARATHÅNDTERING OG FORBEREDELSE

Håndtering og bortskaffelse af alle prøver, se "Universal Forholdsregler".

Alle prøvehåndtering skal udføres ved 2°C til 8°C.

Prøvetagning

Serum/Plasma

Pga. den komplementaktivering, der forekommer under koagulering, vil Ba koncentration i normale serumprøver typisk være højere end dem, der opnås med EDTA behandlet normale plasmaprøver. Værdier for Ba niveau i EDTA plasma kan derfor mere præcist repræsentere *in vivo* koncentrationer.

Ba-fragmentet for faktor-B har tendens til proteolyse i utilstrækkeligt indsamlede eller lagrede prøver, og da Ba kan genereres ved ukorrekt håndtering af prøverne gennem kunstig komplementaktivering, er korrekt udtagning, behandling og opbevaring af prøverne vigtig.²⁴ K2 EDTA-prøvetagningsrør anbefales for, at få optimale resultater fra plasma.

Serum eller EDTA plasma prøver skal indsamles aseptisk, ved hjælp af standard teknikker.²⁵ Prøverne bør testes straks, eller opbevares på is i længere tidsrum end to timer, før de analyseres.

Hvis prøven ikke kan testes inden for to timer i henhold til retningslinjer beskrevet ovenfor, bør prøverne fryses ved -70°C eller mindre.

Urin

MicroVue Ba-analysen kan udføres ved, at benytte en konserveringsmiddelfri urinprøve, der stammer fra den første eller anden morgenurin. Det anbefales, at prøverne udtages inden kl. 10:00 for at forebygge den potentielle påvirkning, som skyldes dagvariationer. Opbevar urinprøven i køleskab (2°C til 8°C) i højst 1 dag, eller frys prøven ved $\leq -70^{\circ}\text{C}$ for længere opbevaring. Udsæt ikke prøven for mere end 5 fryse/optøningscykler. **Undgå at udsætte for lys gennem længere tid, især sollys.** Under den rutinemæssige behandling påvirkes prøverne ikke af normal, kunstig laboratoriebelysning.

Optøning af frosne prøver

Håndteringstiden for prøver kan minimeres ved, at opsætte en fortyndingsplade (eller -rør) og tilsætte den korrekte mængde fortynder (som beskrevet i afsnittet *Prøvefortynding* nedenfor), inden prøverne optøes mhp. evaluering.

Optø frosne prøver hurtigt ved 37°C. Overfør straks optøede prøver til is for, at forhindre komplementaktivering inden fortynding. **Prøverne må højst ligge på is i to timer. Lad ikke prøver stå ved 37°C, da komplement aktivering kan forekomme.** Optø ikke prøver ved stuetemperatur eller på is, da dette kan føre til komplement-aktivering og påvirke resultaterne. Prøver bør testes hurtigst muligt efter optøning. Prøverne kan kun nedfryses/optøes fem gang, uden det påvirker dem. Hvis prøverne har brug for yderligere frysning for yderligere analyse, anbefaler Quidel frysning af flere portioner af prøverne for at ikke at overskride det anbefalede antal gange for nedfrysning/optøning.

Prøve fortynding

FORSIGTIG: Alle prøver bør behandles som potentiel infektiøs. Anvend ikke varme-inaktiverede eller kontaminerede prøver.

BEMÆRK: Se *Prøvetagning og Opbevaring* for vigtige notater om de rigtige metoder til, at optø frosne prøver. Korrekt håndtering af prøver er afgørende for nøjagtige resultater.

Prøverne skal fortyndes, således, at værdier er over LLOQ og ikke overstiger A_{450} værdien af ULOQ. Prøver med målinger uden for dette interval bør re-analyseres på en ny fortynding.

Forbered en passende fortynding (se næste afsnit) af hver prøve med prøvefortynderen. Bland grundigt, men undgå dannelse af skum og bobler. Opbevar eller genbrug ikke fortyndede prøver. Når prøverne er fortyndet, skal de tilsættes brøndene indenfor 30 minutter.

Urin

Det anbefales at fortynde urin prøver 1:15 i prøvefortynder inden brug af MicroVue Ba Enzym Immunoassay.

Plasma

Det anbefales at fortynde plasmaprøver 1:1000 i prøvefortynder i to trin.

1. 10 μ L plasmaprøver + 990 μ L prøvefortynder, og
2. 40 μ L fortyndet plasmaprøver + 360 μ L prøvefortynder.

Serum

Det anbefales at fortynde serum prøver 1:2000 i prøvefortynder i to trin.

1. 10 μ L serumprøver + 990 μ L prøvefortynder, og
2. 20 μ L fortyndet serumprøver + 380 μ L prøvefortynder.

Prøver med høje værdier af komplement aktivering kan kræve højere fortynding end de angivne.

Tilsætning af fortyndet prøve til microtiterbrøndene

Tilsætning af fortyndede prøver til mikrotiter brønde skal være afsluttet indenfor 5 minutter efter anvendelsen af den første prøve. En af to metoder kan anvendes ved tilsætning af fortyndede prøver, standarder, kontroller og buffer til brøndene (se Trin 4 af *ANALYSEPROCEDURE*). Ved et lille antal prøver der skal testes, kan fortyndede prøver og andre reagenser, tilsættes direkte til deres respektive brønde med en mikropipette (100 μ L/brønd). For et lille eller stort antal prøver, specielt et stort antal, anbefaler vi at bruge en multikanel pipette ved tilsætning af prøver. Quidel anbefaler at bruge "kopi plade" nedenstående procedure for at tilføje standarder, kontroller og fortyndede prøver til microassay brønde, så hurtigt som muligt.

Istedet for at tilsætte 100 μ l af hver standard, kontrol eller fortyndet prøve til de antistof-coatede brønde individuelt, anbefaler vi at bruge en multikanel pipette, der tilføjes 120 μ l til 130 μ l af hver løsning til de enkelte brønde, i en blank plade (medfølger ikke), svarende til den endelige EIA ønskede mønster. Efter at alle opløsninger, der skal testes, er blevet tilføjet til microassay brønde i den blanke plade, overfør hurtigt 100 μ l fra hver tom brønd, til de antistof-coatede brønde med en multikanel micropipette. For at undgå mulig krydskontaminering, skal pipettespidser skiftes hver gang, der sker en ændring i sammensætningen af prøven, der skal overføres.

"Kopi plade" procedure kan også anvendes til at tilføje konjugat, substrat, og stopopløsning.

REAGENS FORBEREDELSE

Bring alle reagenser og materialer op til 18°C til 26°C før brug.

Efter fjernelse af de nødvendige reagenser og materialer, returnér ubrugte varer i deres passende lagrings temperaturer (se *OPBEVARING*).

Coated Strips

Bestem antallet af brønde der er nødvendige for analysen. Det anbefales, at de tomme brønde, kontroller og standarder, testes i duplikat. Fjern overflødige strips og placér dem i opbevaringsposen, tilluk posen, og opbevar ved 2°C til 8°C. Tryk de strips der skal benyttes grundigt ned.

Vaskeopløsning

Bland 20X vaskeopløsning koncentrat ved, at vende flasken flere gange. Hvis 20X vaskeopløsning koncentrat er blevet opbevaret ved 2°C til 8°C, kan krystaller blive dannet. For at opløse krystallerne, varm flasken i et 37°C til 50°C vandbad, indtil alle krystallerne er opløst, bland grundigt. Forbered vaskeopløsning ved fortynding af hele indholdet, til 20X vaskeopløsning koncentrat, op til en liter, med destilleret eller deioniseret vand. Bland grundigt. Vaskeopløsningen er stabil i 30 dage, når den opbevares i en ren beholder ved 2°C til 8°C. Hvis misfarvning eller uklarhed opstår, kasseres reagenset.

Ba Standarder og kontroller

Standarder og kontroller kræver ikke fortynding eller forberedelse forud for brug.

ANALYSEPROCEDURE

Læs hele brugsanvisningen inden opstart af assayet.

Se ADVARSLER OG FORSIGTIGHEDSREGLER og REAGENS FORBEREDELSE.

1. Registrer brøndenes position sammenholdt med de blanke brønde, alle prøver, standarder og kontroller så vel som lot numre fra glassenes mærkater. Markér et hjørne af pladen af hensyn til retningen.
2. Forbered microassay strips'ene som følger:
 - a. Tilsæt ca. 300 µL wash solution til hver brønd ved hjælp af enten en sprøjteflaske eller en automatiseret plade vasker.
 - b. Inkubér brøndene i 1 minut ved 18°C til 26°C.
 - c. Opsug indholdet fra hver brønd.
 - d. Tilsæt ca. 300 µL Wash Solution til hver brønd.
 - e. Opsug indholdet fra hver brønd.
 - f. **Gentag step d-e yderligere én gang for at opnå 3x vask.**
 - g. Vend pladen på hovedet og bank hårdt på absorberende papir for at fjerne tiloversblevet væske.
3. Vælg en eller flere brønde til at fungere som tom. Tilsæt 100 µL af prøvefortynder til brønd(e) der bliver anvendt som blank.
4. Tilsæt 100 µL Rekonstituerede Standarder, Kontroller eller fortyndet prøve til de tildelte mikrobrønde duplikeres. **Tilsætning af fortyndede prøver til mikrotiter brønde skal være afsluttet indenfor 5 minutter, efter anvendelsen af den første prøve.**
5. Inkubér ved 18°C til 26°C i 60 ± 5 minut.
6. Vask brøndene 5 gange efter følgende procedure:
 - a. Opsug indholdet fra hver brønd.
 - b. Tilsæt ca. 300 µL Vaskeopløsning til hver brønd ved hjælp af en sprøjteflaske eller automatisk vasker.
 - c. Inkubér brøndene i 1 minut ved 18°C til 26°C.
 - d. Opsug indholdet fra hver brønd.
 - e. Vend pladen på hovedet og bank hårdt på absorberende papir for at fjerne tiloversblevet væske.
 - f. Tilsæt ca. 300 µL vaskeopløsning til hver brønd.
 - g. Opsug indholdet fra hver brønd.
 - h. Vend pladen på hovedet og bank hårdt på absorberende papir for at fjerne tiloversblevet væske mellem hver vask.
 - i. **Gentag step f-h yderligere tre gange for i alt fem gange vask.**

- j. Efter den femte vask, vendes pladen på hovedet og bank solidt på absorberende papir for at fjerne tiloversblevet væske.
7. Dispensér 100 µL af Ba konjugat til hver vasket brønd, inklusiv de(n) blank(e) brønd(e) ved hjælp af en multikanal pipette eller en repetér pipette.
 8. Inkubér strips'ene ved 18°C til 26°C i 60 ± 2 minut.
 9. Vask brøndene efter 60-minutters inkubation (step 8), som beskrevet under *ANALYSEPROCEDURE*, step 6.
 10. Straks efter vaskeproceduren dispenseres 100 µL TMB Substrate Solution til hver brønd inklusiv de(n) blanke.
 11. Inkubér strips'ene ved 18°C til 26°C i 15 ± 1 minut.
 12. Tilsæt 100 µL Stop Solution til hver brønd for at stoppe enzym reaktionen. Stop Solution skal tilsættes brøndene i samme rækkefølge som Substrate Solution blev tilsat.
 13. Bank forsigtigt pladen på bordpladen for at fordele farveudviklingen helt og jævnt. **BEMÆRK: Optimale resultater kan opnås ved hjælp af pladelæser's auto-mix funktion (hvis den findes) lige inden aflæsning af pladen.**
 14. Aflæs absorbans ved 450 nm for hver brønd indenfor 10 minutters efter tilsætning af Stop Solution (step 12), og anvend de(n) blanke som korrektion i overensstemmelse med det anvendte spectrofotometriske system.
 15. Bestem koncentrationen af prøver og kontroller fra standardkurven.
 16. Bortskaf overskydende fortyndede prøver, kontroller, substrat og de brugte strips (se *ADVARSLER OG FORSIGTIGHEDS REGLER*).

KVALITETS KONTROL

Analyse certifikatet, der er inkluderet i dette kit, er lot specifik og skal anvendes til, at verificere, at resultater opnået i laboratoriet er tilsvarende dem Quidel Corporation har opnået.

Kvalitetskontrol intervaller er opgivet. Kontrolværdierne er tiltænkt til verificering af prøve resultater og validering af kurven. Hvert laboratorium bør etablere egne parametre for acceptable grænseværdier. Hvis kontrol værdierne IKKE er indenfor laboratoriets acceptable grænser, bør test resultaterne betragtes som tvivlsomme og prøverne bør gentages.

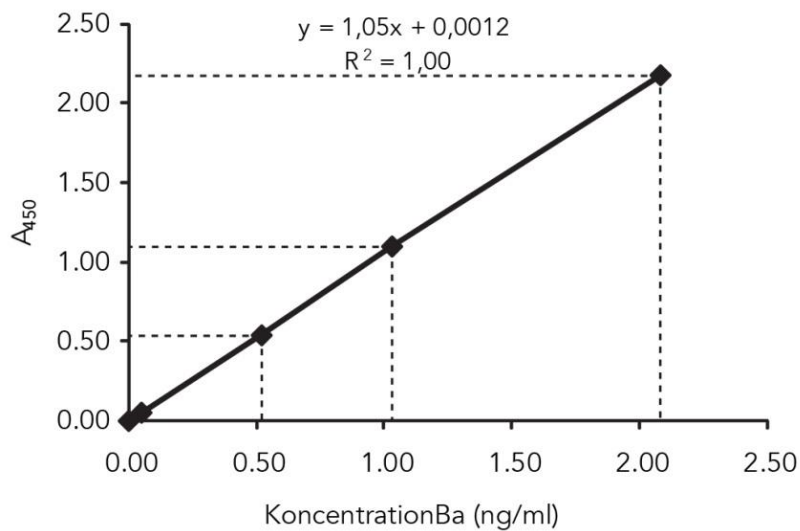
TOLKNING AF RESULTATER

Brug af standardkurve

Standardkurven for Ba EIA er skabt ved, at anvende den blanke A_{450} værdi subtraheret fra hver standard værdi (på y akse), og den fastsatte koncentration for hver standard (på x akse). Efter lineær regression må den generede standardkurve opfylde valideringskravene (se herunder). De fleste computere og lommeregnerne er i stand til at udføre disse kalkulationer.

Alternativt kan dataene afbilledes manuelt og værdierne (ng/ml) af testprøverne aflæses direkte fra den bedst-egnet linje af standardkurven. Et eksempel på en typisk standardkurve er vist i figur 1.

Figur 1
Repræsentativ Standardkurve



Prøve	A ₄₅₀	ng/ml
Standarder A	0,000	0
Standarder B	0,052	0,05
Standarder C	0,539	0,52
Standarder D	1,098	1,03
Standarder E	2,176	2,08
r = 1,000	m = 1,05	b = 0,0012

Beregning af aktuel Ba koncentration i test prøver

Den aktuelle Ba koncentration der er til stede i hver ufortyndet prøve, bestemmes ved at multiplicere koncentrationen af Ba ng/ml aflæst på kit standardkurven, med den reciprokke værdi af den anvendte fortyndingsfaktor.

Hvis A₄₅₀ værdien for en given prøve er større end den højeste Ba kit standard (E), skal resultatet afgives som "større end" Ba koncentrationen af den højeste kit standard (E) ganget med fortyndings faktoren. Hvis en mere præcis Ba koncentration kræves, skal prøven re-analyseres med en højere fortyndings faktor. I alle gentagne assay skal Ba kit standarder og kontroller også inkluderes.

Validering

Fastlæg hældningen, skæringen og korrelations koefficienten af den afledte bedst-egnet linje. For at assayet kan anses som godkendt, skal værdierne være indenfor den specificerede grænse:

korrelations koefficient (r):	≥ 0,98
hældning (m):	mellem 0,52 og 1,63
y-skæring (b):	mellem (-)0,05 og 0,05

Se glas etiketterne for gennemsnits værdi af Ba koncentration for den høje og lave kontrol.

BEGRÆNSNINGER

MicroVue Ba Enzym Immunoassay har været anvendt til prøver taget som urin, serum eller plasma i K2 EDTA. Andre antikoagulanter har ikke været testet.

PRØVE VÆRDIER

EDTA plasma fra femogtredive (35), serum fra niogtyve (29) og urin fra seksten (16) normale donorer blev testet i MicroVue Ba Enzym Immunoassay kit. Resultaterne er præsenteret herunder.

Prøve	n	Gennemsnitlig (ng/ml)	Område (ng/ml)
EDTA Plasma	35	658	226 til 2153
Serum	29	1642	436 til 3362
Urine	16	7.7	0.6 til 27.0

BEMÆRK: Ba koncentrationer bestemmes for plasma eller serum prøver kan variere mellem laboratorier, og derfor anbefales det, at hvert laboratorium fastlægger sit eget koncentrationsinterval. Koncentrationerne angivet ovenfor bør alene betragtes som en retningslinje.

EFFEKTIVITET

Begrænsninger

LOD: Detektionsgrænsen (LOD) for Ba assay er 0,011 ng/ml, fastlagt ved øverste 3SD grænse i et nul-standard studie.

LLOQ: Den laveste grænse for kvantitering (LLOQ) for Ba assay er 0,033 ng/ml, den laveste koncentration på standardkurven der opfylder CLSI kriterier for nøjagtighed og præcision.

ULOQ: Den øverste grænse for kvantitering (ULOQ) for Ba assay er 3,239 ng/ml, den højeste koncentration der opfylder CLSI kriterier for nøjagtighed og præcision.

Interfererende Substancer

Følgende substanser blev testet i Ba assay og fundet ikke interfererende med assayet, når du bruger plasma eller serum prøver:

Substans	Koncentration
Bilirubin	40 mg/dl
Hæmoglobin	500 mg/dl
Triclycerid	3000 mg/dl
Glukose	1200 mg/dl
Kolesterol	500 mg/dl
Albumin	6000 mg/dl
Gamma-Globulin	6000 mg/dl

Følgende substanser blev testet i Ba assay og fundet ikke interfererende med assayet, når du bruger urinprøver:

Substans	Koncentration
Acetone	1000 mg/dl
Kreatinine	500 mg/dl
Glukose	2000 mg/dl
Bilirubin	0,25 mg/dl
Hemoglobin	200 mg/dl
Urea	6000 mg/dl

Følgende substanser blev fundet at interferere med assayet ved hjælp af urinprøver:

Substans	Koncentration
Albumin	340 mg/dl
Natriumklorid	170 mg/dl

Præcision

Under kørsel og mellem kørsler, blev præcision aflæst ved kørsel af 20 replikater af 1 plasma prøve, 1 serum prøve og 2 urin prøver i 10 forskellige kørsler.

Prøve	Ba (ng/ml)	Under kørsel ¹ C.V. (%)	Mellem kørsler ² C.V. (%)
EDTA Plasma	376,0	3,3	2,4
Serum	1111	2,3	8,1
Urin	1,925	2,2	7,6
	22,98	2,2	3,4

¹n=20 replikater ²n=10 kørsler

Linearitet

Linearitet blev foretaget ved seriel fortynding af prøver, og observerede værdier sammenlignet med forventede værdier. Typiske resultater er vist herunder.

Prøve	Fortyndingsfaktor	Observeret (ng/ml) ³	Forventet (ng/ml) ³	Recovery (%)
EDTA Plasma	1:1000	0,634	0,634	100,0
	1:1500	0,424	0,423	100,3
	1:2000	0,323	0,317	101,9
	1:3000	0,219	0,211	103,6
Serum	1:2000	1,464	1,464	100,0
	1:3000	0,986	0,976	101,0
	1:4000	0,734	0,732	100,3
	1:5000	0,580	0,586	99,0
Urin	1:15	0,106	0,106	100,0
	1:20	0,078	0,0795	98,1
	1:25	0,064	0,0636	100,6
	1:30	0,058	0,053	109,4

³Fortyndingsfaktor ikke inkluderet

Spiking Inddrivelse

Spiking inddrivelse blev udført ved, at spike prøverne med en kendt kvantitet oprenset Ba, og sammenligne de observerede værdier med de forventede værdier.

Prøve	Ba (ng/ml)	Spike (ng/ml)	Resultat (ng/ml)	Inddrivelse (%)
Plasma 1	593,1		857,8	103,8
Plasma 2	356,6	233,3	646,4	109,6
Plasma 3	590,0		845,5	102,7
Serum 1	1194		1664	99,0
Serum 2	2088	486,4	2648	102,8
Serum 3	2497		2953	99,0
Urine 1	1,115		4,026	92,5
Urine 2	1,711	3,237	4,891	98,8
Urine 3	21,37		23,97	97,4

ASSISTANCE

For services udenfor U.S.A eller for teknisk assistance, kontakt venligst din lokale distributør. Yderligere information om Quidel, vores produkter og vore distributører kan findes på quidel.com.

REFERENCER

1. Wan K.C, Lewis W.H.P, Leung P.C., Chien P. Hung L.K. 1998. "A longitudinal study of C3, C3d and factor Ba in burn patients in Hong Kong." *Burns* 24(3): 241-44.
2. Sundsmo J., Chin J., Papin R., Fair D., Werb Z. 1985. "Factor B, The complement alternative pathway serine proteinase, is a major constitutive protein synthesized and secreted by resident and elicited mouse macrophages." *J Exp Med* 161:306-22.
3. Ueda A., Kearney J., Roux K., Volanakis J. 1986. "Probing functional sites on complement protein B with monoclonal antibodies." *J Immunology* 138 (4):1143-49.
4. Ambrus J., Peters M., Fauci A., Brown E. 1990. "The Ba fragment of complement factor B inhibits human B lymphocyte proliferation." *J Immunology* 144(5):1549-53.
5. Schreiber, R.D. and Muller-Eberhard, H.J. 1980. New developments in the activation of the alternative pathway of complement. in *Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980's*. Alan R. Liss, Inc., New York. 411-31.
6. Gotze, O. and Muller-Eberhard, H.J. 1976. The alternative pathway of complement activation. *Adv. Immunol.* 24:1-35.
7. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1980. Current concepts in immunology: the alternative pathway of complement – a system for host resistance to microbial infection. *New Engl J Med* 303(5):259-63.
8. Pangburn, M.K. and Muller-Eberhard, H.J. 1984. The alternative pathway of complement. *Springer Seminars in Immunopathol* 7:163.
9. Ratnoff, W.E., Fearon, D.T., and Austen, K.F. 1983. The role of antibody in the activation of the alternative complement pathway. *Springer Seminars in Immunopathol* 6:361.
10. Hugli, T.E. 1986. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *Complement* 3:111-27.
11. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1977. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosanbound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 74(4):1683-87.
12. Fearon, D.T. 1979. Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 76(11): 5867-71.
13. Fishelson, Z. and Muller-Eberhard, H.J. 1984. Residual hemolytic and proteolytic activity expressed by Bb after decay-dissociation of C3b, Bb. *J Immunol* 132(3):1425-29.
14. Gotze, O., Bianco, C. and Cohn, Z.A. 1979. The induction of macrophage spreading by Factor B of the properdin system. *J Exe Med* 149:372.

15. Kolb, W.P., Morrow, P.R. and Tamerius, J.D. 1989. Ba and Bb Fragments of Factor B activation: Fragment production, biological activities, neopeptide expression and quantitation in clinical samples. *Complement And Inflammation* 6:175.
16. Sefton, M.V., et al. 1994. "Using ELISA to evaluate complement activation by reference biomaterials." *J Mat Sci* 5:622-27.
17. Mold, C. Tamerius, J.D., et al. 1995 "Complement activation during painful crisis in sickle cell anemia" *Clinical Immunology And Immunopathology* 70(3):314-20.
18. Manzi, S. Rairie, J. et al. 1996 "Sensitivity and Specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity" *Arthritis And Rheumatism* 39(7):1178-88.
19. Buyon J, Tamerius J. et al. 1992. "Assessment of Disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus" *Arthritis And Rheumatism* 35(9):1028-36.
20. Oppermann M., Kurts C., Zierz R., Quentin E., Weber M., and Gotze O. 1991. "Elevated plasma levels of the immunosuppressive complement fragment Ba in renal failure." *Intl Soc Nephrology* 40:939-47.
21. Prydzial E., Iesenman D. 1987. "Alternative complement pathway activation fragment Ba binds to C3b." *JBC* 262(4):1519-25.
22. Buyon J., Tamerius J., Ordorcia S., Young B., Abramson S. 1992. "Activation of the alternative complement pathway accompanies disease flares in systemic lupus erythematosus during pregnancy." *Arth And Rheum* 35(1):56-61.
23. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 2007. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition*. Washington: U.S. Government Printing Office.
<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>.
24. Mollnes, T.E., P. Garred, and G. Bergseth. 1988. Effect of time, temperature and anticoagulants on *in vitro* complement activation: Consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clin Exp Immunology*. 73:484-88.
25. Centers for Disease Control. 1987. "Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings." *MMWR*. 36 (suppl. No. 2S):001.

REF A034 – MicroVue Ba Fragment EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA034000DA00 (02/17)

ORDLISTE

REF

Katalognummer



CE-mærket for overensstemmelse

EC REP

Autoriseret repræsentant i det Europæiske

LOT

Batch-code



Anvendes inden



Producent



Temperaturbegrænsning



Tilsigtet anvendelse



Konsultere brugsanvisningen e-mærkning af



Biologisk fare

IVD

Til *in vitro* diagnostisk anvendelse



Indeholder nok til 96 bestemmelser

CONT

Inghold/Indeholder

CONTROL

Prøve
