

Ein Immunassay für die Quantifizierung des Komplementfragments Ba von Faktor B, eine Anzeige der Aktivierung der alternativen Komplementwegs, in Urinproben, Humanplasma oder Humanserum

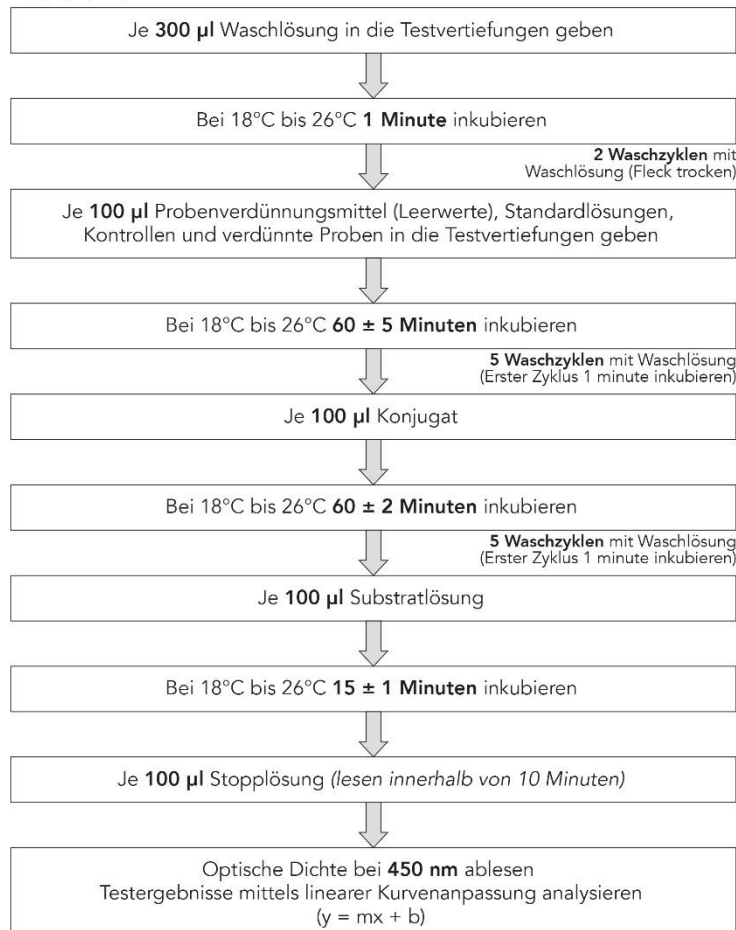
Zur *in-vitro*-diagnostischen Anwendung. Nur für die Ausfuhr. Nicht zum Verkauf oder zur Anwendung in den USA oder Kanada bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG

Vorbereitung von Reagenzien und Proben

- Konzentrierte Waschlösung 1:20 mit dest. Wasser verdünnen
- Urinproben verdünnen 1:15 mit Probenverdünnungsmittel
(z.B. 25 µl + 350 µl)
- Plasmaproben verdünnen 1:1000 mit Probenverdünnungsmittel in zwei Schritten
(z.B. 10 µl probe + 990 µl Verdünnungsmittel >
40 µl verdünnte Probe + 360 µl Verdünnungsmittel)
- Serumproben verdünnen 1:2000 mit Probenverdünnungsmittel in zwei Schritten
(z.B. 10 µl probe + 990 µl Verdünnungsmittel >
20 µl verdünnte Probe + 380 µl Verdünnungsmittel)

Testverfahren





VERWENDUNGSZWECK

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

Andere Erkrankungen, bei denen die Aktivierung des alternativen Wegs des Komplementsystems beobachtet wurde, umfassen altersbedingte Makuladegeneration, Fehlgeburten bei Risikoschwangerschaften, rheumatoide Arthritis, und Sichelzellanämie. ^{1, 4, 14-22}

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Der alternative Weg des Komplementsystems stellt einen angeborenen Schutz gegen mikrobielle Erreger in Abwesenheit eines spezifischen Antikörpers bereit. ⁵⁻⁹ Die Aktivierung dieses Komplementwegs kann durch eine Reihe von Substanzen, darunter mikrobielle Polysaccharide oder Lipide, gram-negative bakterielle Lipopolysaccharide, Oberflächendeterminanten einiger Viren, Parasiten, viral infizierte Mastzellen und Krebszellen ausgelöst werden. Bei Autoimmunerkrankungen kann der alternative Komplementweg direkt zu Gewebsschäden führen.

Eine Reaktion von zentraler Bedeutung, die während der Aktivierung des alternativen Wegs stattfindet, ist die Konversion des 93 kDa großen Faktor-B-Zymogens in ein aktives proteolytisches Enzym. Dies wird in einer Zweischrittreaktion erzielt. Während des ersten Reaktionsschritts bildet der Faktor B einen magnesiumabhängigen Komplex mit C3(H₂O) oder C3b. ⁸ Der C3(H₂O),B-Komplex wird nur in der Flüssig-Phase gebildet, während der C3b,B-Komplex entweder in der Flüssig-Phase oder auf einer Targetoberfläche gebildet werden kann. ⁵⁻⁸ Faktor B, der im C3(H₂O),B- oder im C3b,B-Komplex vorliegt, wird in einem zweiten Reaktionsschritt durch Faktor D, einem Enzym des alternativen Komplementwegs, in Ba (33 kDa)- und Bb (60 kDa)-Fragmente gespalten. ^{5-8, 13}

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

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

FUNKTIONSPRINZIP

Dem MicroVue Ba Enzymimmunoassay zur Quantifizierung von Ba in Humanurin, Serum, Plasma oder anderen Proben liegt ein Dreischrittverfahren zugrunde. Zur Durchführung des Assays werden (1) eine Mikroassayplatte, die mit einem spezifisch humanes Ba bindenden polyklonalen Antikörper beschichtet ist,

(2) ein HRP-konjugierter polyklonaler anti-humaner Faktor B Antikörper, und (3) ein chromogenes Substrat eingesetzt.

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

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

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

MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

96 Assays zur Bestimmung des Ba

Der MicroVue Ba Enzymimmunoassay enthält folgende Komponenten:

A	Ba Standardlösungen	Art.-Nr. 5159 – 5163	1 x 1,5 ml
B	Gebrauchsfertig. Enthält Humanserum mit bekannten Ba-Konzentrationen (ng/ml),		
C	Proteinstabilisatoren		
D			
E			
L	Ba Niedrige Kontrolle	Art.-Nr. 5164	1,5 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält Humanserum mit bekannter Ba-Konzentration (ng/ml), Proteinstabilisatoren		
H	Ba Hohe Kontrolle	Art.-Nr. 5165	1,5 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält Humanserum mit bekannter Ba-Konzentration (ng/ml), Proteinstabilisatoren		
1	Beschichtete Teststreifen	Art.-Nr. 5166	je 12
	8 Vertiefungen, beschichtet mit murinem monoklonalen Antikörper in einem wiederverschließbaren Folienbeutel		
2	Stopplösung	Art.-Nr. A9947	12 ml
	Enthält 1N (4%) Salzsäure		
3	20fach konzentrierte Waschlösung	Art.-Nr. A9957	2 x 50 ml
	Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 1,0% Tween-20® und 0,035% ProClin® 300		
4	Komplement-Proben- verdünnungsmittel	Art.-Nr. A3670	50 ml
	Enthält PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% Proteinstabilisatoren, 0,035% ProClin 300		
5	TMB Substrat	Art.-Nr. 5059	12 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB)		
6	Konjugat	Art.-Nr. 5167	12 ml
	Enthält murines mit Meerrettichperoxidase konjugierten polyklonaler anti-humaner Faktor B Antikörper, suspendiert in HRP-stabilisierendem Puffer mit Konservierungsmittel		

Tween® 20 ist ein eingetragenes Warenzeichen der ICI Americas Inc.

ProClin® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Rohm and Haas Company.

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)

- Stoppuhr (Bereich von 60 Minuten)
- Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen oder Teströhrchen und Ständer für Probenverdünnung (optional)
- Saubere, unbenutzte Mikrotiterplatte für Doppelplattenverfahren (optional)
- Messbehälter für die Verdünnung des Waschpuffers
- Waschflasche oder ein anderes für Immunoassays geeignetes validiertes Waschsystem
- Mikropipetten und sterile Einwegpipettenspitzen
- Reagenzreservoirs für die Zugabe von Konjugat, Substrat und Stopplösung auf die Platte (für jedes Reagenz ein sauberes, unbenutztes Reservoir verwenden)
- Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanal) oder Mehrfachmikropipetten
- Saubere Pipetten, 1 ml, 5 ml und 10 ml
- Plattenlesegerät für Extinktionsmessungen (E_{450} -Wert) für den Bereich von 0,0 bis 3,0
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Für die *In-Vitro*-Diagnostik.
- Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln. Bei der Arbeit mit diesem Kit und den Patientenproben allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Die Testreagenzien wie angegeben lagern.
- Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
- ProClin 300 wird als Konservierungsmittel verwendet. Der unbeabsichtigte Kontakt mit Pufferlösungen oder Reagenzien, die ProClin enthalten, bzw. deren Einnahme kann zu Reizungen der Haut, der Augen oder des Mundes führen. Die Anforderungen guter Laborpraxis beachten, um die Exposition zu verhindern. Beim Auftreten der ersten Symptome einen Arzt aufsuchen.
- Die Stopplösung ist ätzend und kann Reizungen verursachen. Nicht einnehmen. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen. Im Fall der Einnahme Arzt aufsuchen.
- Human Material von Blutspendern, das für die Standardlösungen und Kontrollseren dieses Produkts verwendet wurde, wurden mit einer von der FDA zugelassenen Methode auf Antikörper gegen HIV (HIV1 und HIV2), Hepatitis-C-Viren sowie HBsAg untersucht. Da keine Testmethode mit 100%iger Sicherheit garantieren kann, dass keine infektiösen Substanzen vorliegen, sollten diese Reagenzien wie alle potenziell infektiösen Humanserum- oder Blutproben gemäß Biosafety Level 2 behandelt werden.
- Dementsprechende Empfehlungen sind im Handbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," Centers for Disease Control/National Institutes of Health, beschrieben.²³
- Für ein zügiges und effizientes Dosieren der Reagenzien wird der Gebrauch von Mehrkanal- oder Mehrfachpipetten empfohlen.
- Um korrekte Messungen zu gewährleisten, beim pipettieren der Proben und Standardlösungen genau arbeiten. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen und nur kalibrierte Geräte verwenden.
- Für korrekte Ergebnisse müssen die Proben fachgerecht entnommen und aufbewahrt werden (siehe *PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG*).
- Eine mikrobielle Kontamination oder Kreuzkontamination von Proben oder Reagenzien ist zu vermeiden.
- Jede Probe als Doppelbestimmung messen.
- Die Mikrotiterplatte Vertiefung jeweils nur für einen Test verwenden.
- Wenn die Inkubationszeiten und -temperaturen bei der Testdurchführung von den Vorgaben abweichen, die unter *TESTVERFAHREN* angegeben sind, können falsche Ergebnisse auftreten.
- Das TMB-Substrat muss während der Lagerung und Inkubation vor Licht und Kontakt mit Metall oder Gummi geschützt werden. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen.
- Die Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.

- Beim Entfernen von Flüssigkeiten aus den Vertiefungen den Boden der Vertiefungen nicht ankratzen oder berühren.
- Hitzeinaktivierte, hyperlipämische oder kontaminierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
- Um beim Waschen die Bildung von Aerosolen zu vermeiden, eine Vorrichtung verwenden, mit der die Waschflüssigkeit in eine Flasche mit haushaltsüblichem Bleichmittel gesaugt wird.
- Zum Waschen der Platte eine Waschflasche oder ein automatisiertes Dosiergerät verwenden (siehe *TESTVERFAHREN*, Schritt 6). Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikrotiterplatte verwenden.
- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit oder örtlich geltender Bestimmungen entsorgen.
- Testverfahren in Bereichen mit angemessener Belüftung durchführen.
- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.
- Bei der Handhabung der Kitkomponenten geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
- Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt (SDB) auf quidel.com, um weitere Informationen zu Gefahrensymbolen, Sicherheit, Handhabung und Entsorgung der Komponenten in diesem Kit zu erhalten.

LAGERUNG

Den ungeöffneten Kit bei 2°C bis 8°C lagern.

ANZEICHEN FÜR INSTABILITÄTEN ODER ZERSETZUNGSVORGÄNGE DER REAGENZIEN

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

PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG

Bei der Handhabung und der Entsorgung aller Proben die allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Alle Bearbeitungsvorgänge der Proben sollten bei 2°C bis 8°C durchgeführt werden.

Entnahme von Proben

Humanserumproben/Plasmaproben

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

Das Ba-Fragment von Faktor B ist innerhalb unsachgemäß gesammelter oder gelagerter Proben anfällig für Proteolyse. Entnahme, Bearbeitung und Lagerung der Proben müssen fachgerecht durchgeführt werden, *da bei einer unsachgemäßen Handhabung der Proben durch artefaktische Komplementaktivierung Ba gebildet werden kann.*²⁴ Für optimale Ergebnisse bei Plasma werden K2-EDTA-Blutabnahmeröhrchen empfohlen.

Serum-, EDTA-plasmaproben sollten mit Hilfe eines Standardverfahrens unter keimfreien Bedingungen entnommen werden.²⁵ Die Proben sollten umgehend getestet oder bis zur Testdurchführung für maximal 2 Stunden auf Eis gelagert werden.

Kann eine Probe nicht innerhalb von zwei Stunden nach den oben beschriebenen Richtlinien getestet werden, sollte sie bei -70°C oder tieferen Temperaturen eingefroren werden.

Urinproben

Der MicroVue Ba Assay kann mit nicht konserviertem erstem oder zweitem Morgenurin durchgeführt werden. Um den Einfluss potenzieller diurnaler Schwankungen auszuschließen, sollte die Probenahme vor 10.00 Uhr erfolgen. Die Urinprobe von weniger als einem Tag gekühlt (2°C bis 8°C) aufbewahren frieren die Probe bei $\leq -70^{\circ}\text{C}$ einfrieren. Die Proben dürfen nicht mehr als fünf Gefrier-Tau-Zyklen. Vermeiden Sie längeren Einwirkung von Licht, insbesondere Sonnenlicht. Bei normaler Behandlung werden die Proben nicht durch normale, künstliche Laborbeleuchtung betroffen.

Auftauen eingefrorener Proben

Vor dem Auftauen der Proben für den Test eine Verdünnungsplatte (oder Röhrchen) vorbereiten, und die entsprechende Menge an Probenerdünnungspuffer hinzufügen (wie unten im Abschnitt „*Probenverdünnung*“ beschrieben). Der Zeitraum zwischen dem Auftauen und Verarbeiten der Proben sollte minimal sein.

Gefrorene Proben schnell bei 37°C bis kurz nach dem Auftaupunkt auftauen. Die aufgetauten Proben sofort auf Eis legen, um Komplementaktivierung vor der Verdünnung zu vermeiden. Die Proben nicht länger als zwei Stunden auf Eis lassen. Proben nicht bei 37°C aufbewahren, da sonst Komplementaktivierung auftreten kann. Proben nicht bei Raumtemperatur oder auf Eis auftauen, da dies zur Ba-Aktivierung und das Testergebnis beeinflussen. Proben sollten unmittelbar nach dem Auftauen getestet werden. Es können bis zu fünf Frost-Tau-Zyklen durchgeführt werden, ohne dass die Proben beeinträchtigt werden. Falls Proben zur weiteren Analyse wieder eingefroren werden sollen wird das Einfrieren mehrerer Proben-Aliquote zu vermeiden mehr als die empfohlenen Anzahl von Frost-Tau-Zyklen.

Probenverdünnung

VORSICHT: Alle Proben sind als potenziell infektiös betrachten. Allgemein übliche Vorsichtsmaßnahmen beachten. Hitzeinaktivierte, kontaminierte oder falsch gelagerte Proben dürfen nicht verwendet werden.

HINWEIS: Wichtige Hinweise zum korrekten Auftauen gefrorener Proben sind unter *ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN* aufgeführt. Die korrekte Handhabung der Proben ist für präzise Ergebnisse unerlässlich.

Die Proben **müssen** so weit verdünnt werden, dass die gemessenen E_{450} -Werte oberhalb der LLOQ (unteren Quantifikationsgrenze) liegen und den E_{450} -Wert ULOQ (obere Bestimmungsgrenze) nicht übersteigt. Proben, deren E_{450} -Werte außerhalb dieser Bereiche liegen, sollten in einem anderen Verdünnungsverhältnis neu getestet werden.

Alle Proben mit Probenverdünnungspuffer auf ein geeignetes Verhältnis verdünnen (siehe folgenden Abschnitt). Gründlich mischen, dabei jedoch die Bildung von Schaum und Blasen vermeiden. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden.

Urine

Die Urinproben im Verhältnis 1:15 mit Probenverdünnungsmittels verdünnen für den Einsatz im MicroVue Ba- Enzymimmunoassay.

Plasma

Die Plasmaproben im Verhältnis 1:1000 mit Probenverdünnungsmittels verdünnen. Führen Sie die Verdünnung in zwei Schritten:

1. 10 μl Testprobe + 990 μl Probenverdünnungspuffer, und
2. 40 μl verdünnte Probe + 360 μl Probenverdünnungspuffer.

Serum

Die Serumproben im Verhältnis 1:2000 mit Probenverdünnungsmittels verdünnen. Führen Sie die Verdünnung in zwei Schritten:

1. 10 µl Testprobe + 990 µl Probenverdünnungspuffer, und
2. 20 µl verdünnte Probe + 380 µl Probenverdünnungspuffer.

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

Zugabe der verdünnten Proben in die Mikrotiter-Vertiefungen

Die Zugabe der verdünnten Proben in die Mikrotiterplattevertiefungen muss innerhalb von 5 Minuten abgeschlossen sein. Eine der beiden nachfolgenden Methoden kann für die Zugabe der verdünnten Proben, Standardlösungen, Kontrollen und Puffer in die Testvertiefungen verwendet werden (siehe Schritt 4 des *TESTVERFAHRENS*). In Testläufen bei denen nur wenige Proben getestet werden, können die verdünnten Proben und anderen Reagenzien direkt in die zugeteilten Vertiefungen mit einer Mikropipette (100 µl/Vertiefung) zugegeben werden. Bei kleinen oder großen Testläufen, insbesondere bei größeren Läufen, Quidel empfiehlt Gebrauch einer Mehrkanalpipette, um die Standardlösungen, Kontrollen und verdünnten Proben zuzugeben so schnell wie möglich in die Testvertiefungen zu geben.

Eine Mehrkanalpipette können 120 µl bis 130 µl jeder Lösung in die einzelnen Vertiefungen einer unbeschichteten Mikrotiterplatte (nicht im Lieferumfang enthalten) entsprechend dem gewünschten EIA-Endmuster gegeben werden. Nachdem alle zu testenden Lösungen in die Mikroassay-Vertiefungen der unbeschichteten Platte gegeben worden sind, zügig 100 µl von jeder unbeschichteten Vertiefung in die antikörperbeschichteten Testvertiefungen mit Hilfe einer Mehrkanalmikropipette transferieren. Um die Möglichkeit einer Kreuzkontamination zu vermeiden, müssen die Pipettenspitzen jedes Mal gewechselt werden, wenn sich die Zusammensetzung der zu übertragenden Proben verändert.

Die „Replica-Plating“-Methode kann auch für die bequeme Zugabe des Konjugats, Substrats und der Stopplösung verwendet werden.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien und Materialien vor dem Test auf 18°C bis 26°C bringen.

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

Beschichtete Teststreifen

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

Waschlösung

Die 20fach konzentrierte Waschlösung durch mehrfaches Umdrehen der Flasche mischen. Wenn die 20fach konzentrierte Waschlösung bei 2°C bis 8°C gelagert wurde, haben sich u. U. Kristalle gebildet. Zum Auflösen dieser Kristalle die Flasche in ein 37°C bis 50°C warmes Wasserbad stellen, bis sich alle Kristalle aufgelöst haben, und den Inhalt der Flasche anschließend sorgfältig mischen. Die Waschlösung vorbereiten, indem der gesamte Inhalt einer 20fach konzentrierten Waschlösungsflasche mit entionisiertem oder destilliertem Wasser auf 1 Liter verdünnt wird. Gründlich mischen. Die Waschlösung ist bei Aufbewahrung in einem sauberen Behälter bei 2°C bis 8°C für 30 Tage haltbar. Das Reagenz beim Auftreten von Verfärbungen oder Trübungen entsorgen.

Ba Standardlösungen und Kontrollen

Standardlösungen und Kontrollen sind bereits verdünnt und können ohne weitere Vorbereitungen eingesetzt werden.

TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

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

1. Die Positionen der Blindvertiefung(en), aller Proben, Standardlösungen und Kontrollen auf der Mikroassay-Platte sowie die auf den Flaschenetiketten angegebenen Chargennummern auf einem Datenblatt schriftlich festhalten. Die Ausrichtung der Mikroassay-Platte durch die Markierung einer Plattenecke festhalten.
2. Die Mikroassay-Teststreifen wie folgt vorbereiten:
 - a. Unter Verwendung einer Waschflasche oder einer automatischen Plattenwaschvorrichtung etwa 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung hinzugeben.
 - b. Die Vertiefungen eine Minute lang bei 18°C bis 26°C inkubieren.
 - c. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
 - d. Etwa 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - e. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
 - f. Die Schritte d-e noch einmal wiederholen, insgesamt drei Waschschr**itte durchführen.
 - g. Die Platte umdrehen und kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
3. Eine oder mehrere Vertiefungen für die Leerwerte auswählen. 100 µl des Probenverdünnungspuffers in diejenige(n) Vertiefung(en) geben, die zur Bestimmung des Nullwertes des Plattenlesegeräts verwendet werden sollen (die sogenannten Leerwerte).
4. Je 100 µl der wiederhergestellten Ba-Standardlösungen, Kontrollen und der verdünnten Proben in die als Duplikate vorgesehenen Mikroassay-Vertiefungen geben. **Die Zugabe der verdünnten Proben in die Mikrotiterplattevertiefungen muss innerhalb von 5 Minuten abgeschlossen sein.**
5. Bei 18°C bis 26°C für 60 ± 5 Minuten inkubieren.
6. Die Mikroassay-Vertiefungen insgesamt fünfmal wie nachfolgend beschrieben waschen:
 - a. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
 - b. Mit einer Waschflasche oder einer automatischen Plattenwaschgerät etwa 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung füllen.
 - c. Die Vertiefungen 1 Minute lang bei 18°C bis 26°C inkubieren.
 - d. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
 - e. Die Platte umdrehen und kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
 - f. Etwa 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - g. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
 - h. Die Platte umdrehen und kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
 - i. Die Schritte f-h drei einmal wiederholen, insgesamt fünf Waschschr**itte durchführen.
 - j. Nach dem fünften Waschzyklus die Platte umdrehen und kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
7. Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette 100 µl des Ba-Konjugats in die gewaschenen Testvertiefungen und Blindvertiefung(en) geben.
8. Die Mikroassay-Teststreifen bei 18°C bis 26°C für 60 ± 2 Minuten inkubieren.
9. Die Mikroassay-Vertiefungen nach der 60 Minuten dauernden Inkubation (Schritt 8) wie unter *TESTVERFAHREN* Schritt 6 beschrieben waschen.
10. Unmittelbar nach dem Waschschr
itt je 100 µl der TMB-Substratlösung in jede Vertiefung, inklusive der Blindvertiefung(en), geben.

11. Die Mikroassay-Teststreifen bei 18°C bis 26°C für 15 ± 1 Minuten inkubieren.
12. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion 100 µl der Stopplösung in jede Vertiefung geben. Die Zugabe der Stopplösung in die Vertiefungen sollte in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Zugabe der Substratlösung erfolgen.
13. Die Platte auf dem Labortisch vorsichtig antippen, damit sich die Farbentwicklung vollständig und gleichmäßig verteilt. **HINWEIS: Optimale Ergebnisse werden durch die Anwendung der automatischen Mischfunktion (falls vorhanden) direkt vor dem Ablesen der Mikroassay-Platte erreicht.**
14. Innerhalb von 10 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung (Schritt 12) die Extinktion für jede Testvertiefung bei 450 nm bestimmen und je nach verwendetem Spektrophotometer eine Blindwertkorrektur vornehmen.
15. Die Konzentration der Proben und Kontrollen anhand der Standardkurve bestimmen.
16. Die verbleibenden verdünnten Proben, Kontrollen, Substrat und die benutzten Mikroassay-Teststreifen entsorgen (siehe *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*).

QUALITÄTSKONTROLLE

Das in diesem Kit enthaltene Analysenzertifikat ist chargenspezifisch und dient zur Überprüfung, ob die von Ihrem Labor erzielten Ergebnisse mit denen der Quidel Corporation übereinstimmen.

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

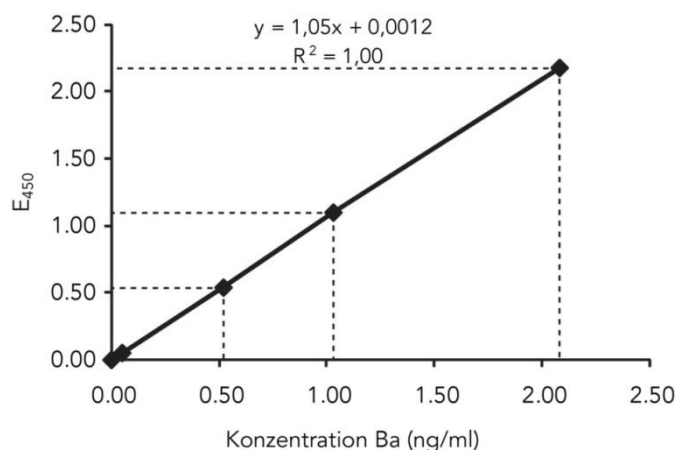
AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Erstellung der Standardkurve

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

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

Abbildung 1
Typische Standardkurve



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

Berechnung der tatsächlichen Ba-Konzentration in den Testproben

Die tatsächliche Ba-Konzentration in jeder Testprobe wird bestimmt, indem die aus der Kit-Standardkurve abgelesene Ba/ml-Konzentration mit dem verwendeten Probenverdünnungsfaktors multipliziert wird.

Wenn die E₄₅₀-Werte einer bestimmten Testprobe höher als die Werte der höchsten Kit-Standards (E), sollten die Ergebnisse als „größer als“ die Ba-Konzentration des höchsten Kit-Standards (E) multipliziert mit dem Probenverdünnungsfaktor vermerkt werden. Wenn ein genauere Wert der Ba-Menge erforderlich ist, sollte die Testprobe unter Verwendung eines höheren Verdünnungsfaktors nochmals getestet werden. Bei allen Wiederholungstests müssen auch die Ba-Kit-Standardlösungen und Kontrollen mitgeführt werden.

Validierung

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

Korrelationskoeffizient (r):	≥ 0,98
Steigung (m):	zwischen 0,52 und 1,63
y-Schnittpunkt (b):	zwischen (-) 0,05 und 0,05

Die Werte für den mittleren Akzeptanzbereich von Ba-Konzentrationen bei den hohen und niedrigen Kontrollen sind auf den Flaschenetiketten oder im Analysenzertifikat des Produktes aufgeführt.

GRENZEN DER METHODE

Der MicroVue Ba Enzymimmunoassay wurde verwendet, um Urin-, Serum- oder K2 EDTA-Plasmaproben zu untersuchen. Andere Antikoagulanzen wurden nicht getestet.

PROBENWERTE

Das EDTA-Plasma von fünfunddreißig (35), das Serum von neunundzwanzig (29), und der Urin von sechzehn (16) normalen Spendern wurden mit dem MicroVue Ba Fragment Enzymimmunoassay getestet. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

	n	Mittelwert (ng/ml)	Bereich (ng/ml)
EDTA Plasma	35	658	226 bis 2153
Serum	29	1642	436 bis 3362
Urin	16	7,7	0,6 bis 27,0

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

LEISTUNGSMERKMALE DES TESTS

Grenzwerte

LOD: Die Nachweisgrenze (LOD) für den Ba Assay beträgt 0,011 ng/ml, sie wurde im Rahmen einer Nullstandard-Präzisionsstudie an der 3fachen Standardabweichung festgelegt.

LLOQ: Die untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) für den Ba Assay liegt bei 0,033 ng/ml, die niedrigste Konzentration aus der Standardkurve, die den Kriterien für Fehlerfreiheit und Präzision des CLSI entspricht.

ULOQ: Die obere Bestimmungsgrenze (ULOQ) für den Ba Assay liegt bei 3,239 ng/ml, die höchste Konzentration, die den Kriterien für Fehlerfreiheit und Präzision des CLSI entspricht.

Störsubstanzen

Die folgenden Substanzen wurden mit den angegebenen Konzentrationen in dem Ba Assay getestet und sie stellten keine Störung für diesen Assay bei der Verwendung von Plasma oder Serum.

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

Die folgenden Substanzen wurden mit den angegebenen Konzentrationen in dem Ba Assay getestet und sie stellten keine Störung für diesen Assay bei der Verwendung von Urin.

Substanz	Konzentration
Ketokörper	1000 mg/dl
Kreatinin	500 mg/dl
Glukose	2000 mg/dl
Bilirubin	0,25 mg/dl
Hämoglobin	200 mg/dl
Harnstoff	6000 mg/dl

Die folgenden Substanzen hat mit den Ergebnissen dieses Tests bei der Verwendung von Urin stören:

Substanz	Konzentration
Albumin	340 mg/dl
Natriumchlorid	170 mg/dl

Präzision

Die Präzision „in der Serie“ und „von Serie zu Serie“ wurde für 20 Replikate von 1 Plasmaprobe, 1 Serumprobe, und 2 Urinproben in 10 verschiedenen Testserien ermittelt.

Probe	Ba (µg/ml)	In der Serie ¹ C.V. (%)	Von Serie zu Serie 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 replikate ²n = 10 testserien

Linearität

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

Probe	Verdünnungsfaktor	Gefunden (µg/ml) ³	Erwartet (µg/ml) ³	Wiedergewinnung (%)
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

³Verdünnungsfaktor nicht eingerechnet

Wiederfindung

Die maximale Wiedergewinnung (engl. „spike recovery“) wurde dadurch ermittelt, dass Proben mit einer bekannte Menge gereinigtem Ba versetzt und die gemessenen mit den erwarteten Werten verglichen wurden.

Probe	Ba (ng/ml)	Zugabe (ng/ml)	Resultat (ng/ml)	Wiederfindung (%)
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
Urin 1	1,115		4,026	92,5
Urin 2	1,711	3,237	4,891	98,8
Urin 3	21,37		23,97	97,4

KUNDENDIENST

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

LITERATURVERWEISE

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 Seminar 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 Seminar 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, neoepitope expression and quantitation in clinical samples. *Complement And Inflammation* 6:175.
16. Sefton, M.V., et al. 1994. "Using ELISA to evaluate complement activation by reference biomaterials." *J Mat Sci* 5:622-27.
17. Mold, C. Tamerius, J.D., et al. 1995 "Complement activation during painful crisis in sickle cell anemia" *Clinical Immunology And Immunopathology* 70(3):314-20.
18. Manzi, S. Rairie, J. et al. 1996 "Sensitivity and Specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity" *Arthritis And Rheumatism* 39(7):1178-88.

19. Buyon J, Tamerius J. et al. 1992. "Assessment of Disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus" *Arthritis And Rheumatism* 35(9):1028-36.
20. Oppermann M., Kurts C., Zierz R., Quentin E., Weber M., and Gotze O. 1991. "Elevated plasma levels of the immunosuppressive complement fragment Ba in renal failure." *Intl Soc Nephrology* 40:939-47.
21. Pryzdial E., Isenman D. 1987. "Alternative complement pathway activation fragment Ba binds to C3b." *JBC* 262(4):1519-25.
22. Buyon J., Tamerius J., Ordorcia S., Young B., Abramson S. 1992. "Activation of the alternative complement pathway accompanies disease flares in systemic lupus erythematosus during pregnancy." *Arth And Rheum* 35(1):56-61.
23. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 2007. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition*. Washington: U.S. Government Printing Office.
<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/bmbl5toc.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

PIA034000DE00 (02/17)

GLOSSAR

REF

Katalog-Nr.



CE-Konformitätskennzeichnung

EC REP

Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft

LOT

Chargencode



Verwenden bis



Hersteller



Temperaturbegrenzung



Verwendungszweck



Consult E-Beschriftung
Gebrauchsanweisung beachten



Biogefährdung

IVD

Zur *In-vitro*-Diagnostik



Inhalt ist ausreichend für 96 Bestimmungen

CONT

Inhalt/Enthält

CONTROL

Kontrolle
