

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

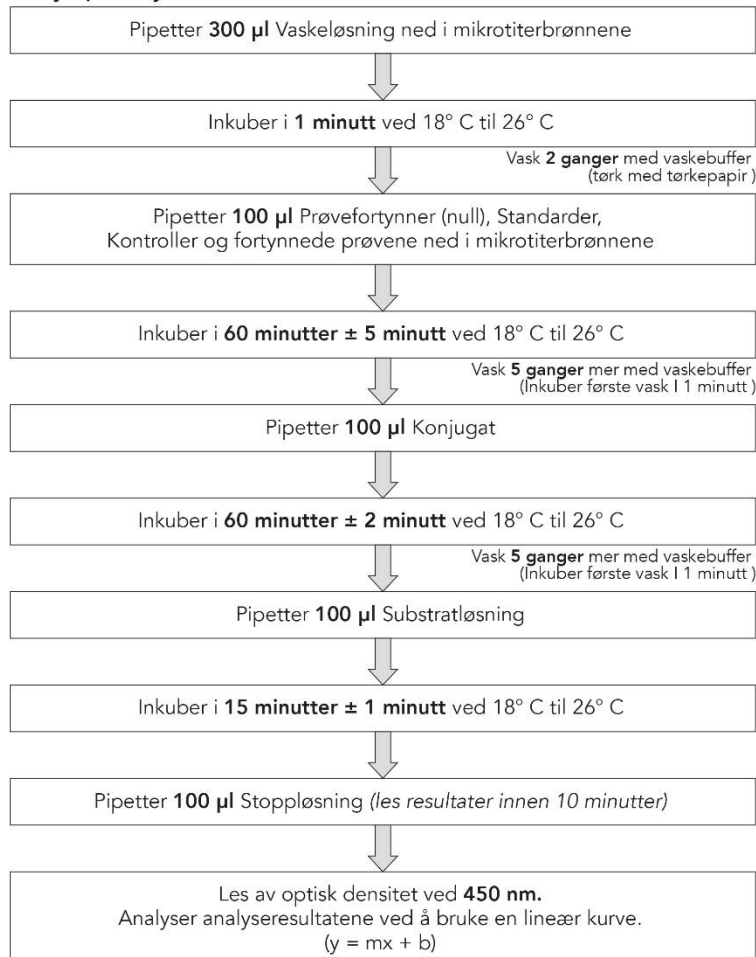
For *in vitro*-diagnostisk bruk. Kun for eksport. Ikke for salg eller bruk i USA eller Canada.

SAMMENDRAG

Forberedelse av Reagenser, Standarder, Kontroller og Prøver

- Fortynn Vaskebufferkonsentratet 1:20 med ikke-ionisert vann
- Fortynn urinprøvene 1:15 med Prøvefortynner
(for eksempel 25 µl prøvene + 350 µl Prøvefortynner)
- Fortynn plasmaprøvene 1:1000 med Prøvefortynner
(for eksempel 10 µl prøvene + 990 µl Prøvefortynner >
40 µl prøvene + 360 µl Prøvefortynner)
- Fortynn serumprøvene 1:2000 med Prøvefortynner
(for eksempel 10 µl prøvene + 990 µl Prøvefortynner
20 µl prøvene + 380 µl Prøvefortynner)

Analyseprosedyre





BRUKSOMRÅDE

MicroVue Ba Enzyme Immunoassay Kit måler mengden av komplementfragmentet Ba, som er et aktiveringsfragment til Faktor B i komplementets alternative bane i humant plasma eller serum. Måling av Ba i humant urin, plasma eller serum gir belegg for at komplementet har en alternativ bane. Måling av aktivering av en alternativ bane bidrar til å diagnostisere en rekke nyresykdommer, som f.eks. kronisk glomerulonefritt, lupus nefritt, samt flere hudsykdommer, som f.eks. herpesdermatitt og pemfigus vulgaris. Andre sykdommer der man har observert aktivering av komplementets alternative bane, omfatter AMD (aldersrelatert maculadegenerasjon), fosterdød i risikosvangerskap, revmatoid artritt, og sigdcelleanemi.^{1,4,14-22}

SAMMENDRAG OG FORKLARING

Den alternative komplementbanen gir naturlig beskyttelse mot mikrobielle agens, der spesifikke antistoffer ikke finnes.⁵⁻⁹ Aktivering av denne komplementbanen kan utløses av mange forskjellige substanser, som bl.a., mikrobielle polysakkarider eller lipider, gramnegative bakterielle lipopolysakkarider, og overflatedeterminanter som finnes på noen virus, parasitter, virusinfiserte pattedyrceller, og kreftceller. Ved autoimmune sykdommer kan den alternative komplementbanen bidra direkte til å ødelegge vev.

En svært viktig reaksjon som opptrer under aktivering av den alternative banen, er omdanningen av 93 Kd Faktor B zymogen til et aktivt proteolytisk enzym. Dette foregår i en totrinsreaksjon. I det første reaksjonstrinnet danner Faktor B et magnesium-avhengig kompleks med C3(H₂O) eller C3b.⁸ C3(H₂O),B-komplekset dannes bare i flytende fase, mens C3b,B-komplekset kan dannes, enten i flytende fase, eller på en egnet overflate.⁵⁻⁸ Faktor B, som finnes i C3(H₂O),B- eller C3b,B-komplekset, spaltes til Ba- (33 Kd) og Bb- (60 Kd) fragmenter i det andre reaksjonstrinnet av alternativ bane enzymet, Faktor D.^{5-8,13}

Selv om man har trodd at aktivering av en alternativ bane hovedsakelig skjer ved fravær av et spesifikt antistoff, dukker det opp situasjoner, der aktivering av alternativ bane kan finne sted som resultat av en tradisjonell aktivering. For eksempel, immunkomplekser hos pasienter med autoimmune sykdommer, kan sette i gang en aktivering av komplementbane på tradisjonelt vis, noe som fører til produksjon av C3b-fragmenter. Som beskrevet ovenfor, er disse C3b-molekylene i stand til å binde Faktor B og sette i gang spalting i Ba- og Bb-fragmenter. Derfor kan aktivering av alternativ bane forekomme ved antistoff-medierte autoimmune sykdomstilstander, og kan i betydelig grad bidra til øket aktivering av komplement og derav følgende ødeleggelse av vev.

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

PROSEDYREPRINSIPP

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

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

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

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

REAGENSER OG MATERIALE SOM LEVERES

96 Analyser for Ba-fragmentet av Faktor B

MicroVue Ba Enzymimmunanalyse settet inneholder følgende:

A Ba Plus standarder	Del 5159 – 5163	1 hver på 1,5 ml
B Ferdig til bruk. Inneholder humant serum med fastsatt Ba konsentrasjon (ng/ml), protein		
C stabilisatorer		
D		
E		
L Lav kontroll	Del 5164	1,5 ml
Ferdig til bruk. Inneholder humant serum med fastsatt Ba konsentrasjon (ng/ml), protein stabilisatorer		
H Høy kontroll	Del 5165	1,5 ml
Ferdig til bruk. Inneholder humant serum med fastsatt Ba a konsentrasjon (ng/ml), protein stabilisatorer		
1 Dekkede strimler	Del 5166	12 hver
Åttebrønners strimler dekket med et murint monoklonalt antistoff i en foliepose som kan forsegles		
2 Stoppløsning	Del A9947	12 ml
Inneholder 1N (4%) Hydrochloric Syre		
3 20X Konsentrert Vaskeløsning	Del A9957	2 x 50 ml
Hver enkelt inneholder fosfatbufret saltløsning (PBS), 1,0% Tween-20®, og 0,035% ProClin® 300		
4 Prøvefortynner	Del A3670	50 ml
Inneholder PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% proteinstabilisatorer, 0,035% ProClin 300		
5 TMB Substrat	Del 5059	12 ml
Ferdig til bruk. Inneholder 3,3', 5,5' tetrametylbenzidine (TMB)		
6 Konjugat	Del 5167	12 ml
Inneholder pepperrotperksidasekonjugert polyklonalt anti-humant Faktor B-antistoff oppslemmet i HRP stabiliseringsbuffer med konserveringsmiddel		

Tween-20® er et registrert varemerke fra ICI Americas Inc.

ProClin® er et registrert varemerke fra Rohm and Haas Company.

NØDVENDIG MATERIALE SOM IKKE LEVERES

- Signalur (for 60 minutter)
- Fortynningsplate med 96 brønner eller prøverør og stativer for prøvefortynning (valgfritt)
- Rene, ubrukte mikrotiterplater for replikaplatemetode (valgfritt)
- Måleglass for vaskebufferløsning
- Vaskeflaske eller validert annet utstyr for vasking mikrotiterplater
- Mikropipetter og sterile, engangs pipettespisser
- Justerbar multikanalpipette (8 eller 12 kanaler) eller mikropipetter for flergangsbruk (valgfritt)

- Rene pipetter, 1 ml, 5 ml, og 10 ml
- Reagensreservoarer for tilsetting av konjugat-, substrat- og stoppløsninger til platen (bruk rene, ubrukte reservoarer for hver reagens)
- Plateavleser med kapasitet for avlesning av A_{450} optisk densitet mellom 0,0 og 3,0
- Ikke-ionisert eller destillert vann

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

- Til *In vitro*-diagnostisk bruk.
- Håndter prøvemateriale som potensielt smittefarlig. Følg generelle forholdsregler når du håndterer innholdet i dette settet og alle pasientprøvene.
- Bruk de reagensene som er levert som en vesentlig del før utløpsdatoen som er angitt på pakningen.
- Oppbevar analysereagensene slik som anvist.
- Ikke bruk dekkede strimler hvis det er gått hull på posen.
- ProClin 300 brukes som konserveringsmiddel. Utsiktet kontakt med eller inntak av buffere eller reagenser som inneholder ProClin kan forårsake irritasjon i huden, øynene eller munnen. Bruk god laboratoriepraksis for å redusere faren for å bli utsatt. Kontakt lege hvis du får symptomer.
- Stoppløsningen betraktes som etsende og kan forårsake irritasjon. Må ikke tas inn. Unngå kontakt med øyne, hud og klær. Hvis det allikevel skjer, skyl umiddelbart det berørte området med vann. Kontakt lege hvis du har fått det i deg.
- Hver blodgiverenhet som er brukt til fremstilling av standarder og kontrollsera i dette produktet ble testet med en FDA-godkjent metode for påvisning av antistoff mot humant immunsviktvirus (HIV1 og HIV2) og mot hepatitt C-virus, samt for hepatitt B overflateantigen. Siden ingen testmetode helt kan garantere fullstendig fravær av smittefarlige stoffer, skal disse reagensene håndteres med grad 2 for biologisk sikkerhetshåndtering, slik som anbefalt for alt potensielt smittefarlig humant serum eller blodprøver i "Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual" "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories."²³
- For å sikre tidsnok fordeling av reagenser anbefales bruk av multikanal pipetter eller pipetter for flergangsbruk.
- For å oppnå nøyaktig måling av prøvene, må prøver og standarder tilsettes nøyaktig. Pipetter forsiktig med kalibrert utstyr.
- For å oppnå nøyaktige resultater er riktig innsamling og oppbevaring av prøvemateriale svært viktig (se *HÅNTERING OG FORBEREDELSE AV PRØVEMATERIALE*).
- Unngå mikrobiell eller krysskontaminering av prøvemateriale og reagenser.
- Test hver prøve i duplikat.
- Ikke bruk en mikrotiterbrønn for mer enn en test.
- Hvis man bruker andre inkubasjonstider og temperaturer enn de som er oppgitt i prosedyreavsnittet, kan det gi feilaktige resultater.
- TMB-substratet må beskyttes mot lys og kontakt med metall eller gummi under oppbevaring og inkubasjon. Unngå kontakt med øyne, hud og klær. Hvis du allikevel får det på deg, skyl umiddelbart med vann.
- Ikke la mikrotiterbrønnene tørke når analysen har begynt.
- Ikke skrap eller rør bunnen av mikrotiterbrønnene når du fjerner væske.
- Prøver som er inaktivert ved oppvarming, er hyperlipemiske eller er forurenset kan gi feilaktige resultater.
- For å unngå at det dannes aerosol under vaskingen bør man bruke utstyr til å suge vaskeløsningen opp i en flaske som inneholder husholdningsblekemiddel.
- Man bør bruke en vaskeflaske eller automatisk fyllingsutstyr for å vaske platene (*ANALYSEPROSEDYRE*, trinn 6). For å oppnå best resultater skal man ikke bruke en multikanals pipette for å vaske mikrotiterplatene.
- Testing skal utføres i et område med god ventilasjon.
- Kast beholdere og ubrukt innhold i henhold til føderale, statlige og lokale myndighetskrav.
- Bruk egnede verneklær, hansker og beskyttelse for øyne og ansikt når du håndterer innholdet i dette settet.

- Vask hendene grundig etter håndtering.
- Hvis du ønsker mer informasjon om faresymboler, sikkerhet, håndtering og kassering av komponentene i dette settet, se sikkerhetsdatabladet på quidel.com.

OPPBEVARING

Et uåpnet sett skal oppbevares ved 2 °C til 8 °C.

TEGN PÅ USTABILITET ELLER FORRINGELSE AV REAGENSER

Hvis den fortyndede vaskeløsningen er uklar eller misfarget, tyder det på forringelse av denne reagensen. Hvis dette inntreffer, skal vaskeløsningen kasseres.

PRØVEHÅNTERING OG KLARGJØRING

Håndter og kast alle prøver i overensstemmelse med generelle forholdsregler.

Alle prøven-håndtering bør utføres ved 2 °C til 8 °C.

Innsamling av Prøver

Serum/Plasma

På grunn av komplementær aktivering som skjer under koagulering, vil Ba-konsentrasjonen i normale, humane serum-prøver være høyere enn de man oppnår med EDTA plasmaprøver. Ba-nivåene i EDTA plasma kan derfor nøyaktigere vise *in vivo*-konsentrasjonene.

I uriktig innsamlede eller oppbevarte prøver er Ba-fragmentet i Faktor B mottakelig for proteolyse, og Ba kan utvikle seg i feilaktig håndtert prøvemateriale ved kunstig aktivert komplement; derfor er det riktig innsamling, lagring og håndtering av prøver viktige.²⁴ For optimale plasmareultater anbefales det å bruke K2 EDTA-prøverør.

Serum- og EDTA-plasmaprøver bør tas aseptisk ved hjelp av standardteknikker.²⁵ Prøvene bør testes umiddelbart eller oppbevares på is, men ikke lenger enn to timer før de skal analyseres.

Hvis prøvematerialet ikke kan analyseres innen to timer i overensstemmelse med de retningslinjer som er nevnt ovenfor, skal prøvematerialet fryses ved -70 °C eller lavere.

Urin

MicroVue Ba testen må analyseres med preserveringsfri første-morgen-urin eller andre morgen-urin. Fortrinnsvis, samle urinen før kl. 10.00 for å unngå eventuell påvirkning av diurese variasjon. Hold urinprøven kjølig (2 °C til 8 °C) for oppbevaring mindre enn en dag, eller frys prøven ved ≤ -70 °C ved lengre oppbevaring. Bruk ikke samme prøven til mere enn 5 frys/tin repetisjoner. **Unngå lengre eksponering for lys, spesielt sollys.** Ved rutineoperasjoner/ analysering blir ikke testen påvirket av vanlig laboratoriebelysning.

Tining av frosne prøver

For å minimere prøvehåndteringstid, sett opp en fortynningsplate (eller rør) og tilsett riktig volum av fortynner (som beskrevet i seksjonen *Prøvefortynning* nedenfor) før prøvene tines for evaluering.

Tin frosne hurtig ved 37 °C til de er akkurat tint. Legg de tinte prøvene på is med engang for å hindre komplementaktivering før fortykning. **Ikke oppbevar prøvene på is i mer enn to timer. Ikke la prøvene ligge ved 37 °C, da komplementaktivering kan forekomme.** Ikke tin prøver ved romtemperatur eller på is da dette kan føre til aktivering av Ba og påvirke resultatene. Prøver må testes så snart som mulig etter at de er tint. Prøvene kan fryses/tines bare én gang uten at det påvirker dem. Hvis prøvene skal fryses igjen for senere analyser, foreslår Quidel å dele opp prøvene i flere deler for å unngå gjentatt frysing og tining.

Prøvefortynning

ADVARSEL: Håndter alt prøvemateriale som potensielt smittefarlig. Følg generelle forholdsregler. Ikke bruk prøvemateriale som er inaktivert ved oppvarming, forurenset eller oppbevart feilaktig.

KRITISK MERKNAD: Det er svært viktig at prøveinnsamling og prøvefortynning utføres korrekt for å unngå komplementaktivering og dermed Ba-generering i prøver.

Prøver **må** fortynnes slik at de verdiene man ser er over LLOQ og under ULOQ. Prøver med avlesninger utenfor dette området skal analyseres om igjen med en ny fortynning.

Gjør klar en passende fortynning (se neste seksjon) av alle prøvene ved å bruke prøvefortynneren. Bland grundig, men unngå at det skummer og blir bobler. Fortynnede prøver skal ikke oppbevares og brukes om igjen. Når de er fortynnet, må prøvene tilsettes mikrotiterbrønnene innen 30 minutter.

Urin

Det anbefales at urinprøver fortynnes 1:15 i prøvefortynner for bruk i MicroVue Ba Enzymimmunanalysen.

Plasma

Fortynn plasmaprøvene 1:1000 i prøvefortynnings buffer i to omganger for bruk i MicroVue Ba Enzymimmunanalysen:

1. 10 µl prøve + 990 µl prøvefortynnings buffer, deretter
2. 40 µl fortynnet prøve + 360 µl prøvefortynnings -buffer

Serum

Fortynn serumprøvene 1:2000 i prøvefortynnings buffer i to omganger for bruk i MicroVue Ba Enzymimmunanalysen:

1. 10 µl prøve + 990 µl prøvefortynnings buffer, deretter
2. 20 µl fortynnet prøve + 380 µl prøvefortynnings -buffer

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

Tilsetting av fortynnede prøver i mikrotiterbrønnene

Tilsetting av fortynnede prøver må være ferdig innen 5 minutter etter tilsetting i den første prøven. En av to metoder kan brukes for å tilsette fortynnede prøver, standarder, kontroller og buffer i brønnene (se trinn 4 i *ANALYSEPROSEDYRE*). For analyser der bare noen få prøver skal testes, kan de fortynnede prøvene og andre reagenser tilsettes direkte i de respektive brønnene med en mikropipette (100 µl/brønn). For små eller store analyser, men spesielt for store analyser, anbefaler vi at man bruker "kopiplate"-prosedyren er beskrevet nedenfor for tilsetting av prøver i mikrotiterbrønnene så raskt som mulig.

Ved å bruke en multikanalpipette tilsett 120 µl til 130 µl av hver løsning i hver enkelt brønn på en tom plate (ikke levert) som stemmer overens med det endelige EIA-mønsteret som man ønsker. Etter at alle løsningene som skal testes er fordelt i mikrotiterbrønnene på den tomme platen, overfører man raskt 100 µl fra hver nullbrønn til de brønnene som er dekket med antistoff ved å bruke en multikanalpipette. For å unngå mulig kryssforurensning må pipettespissene byttes hver gang sammensetningen av prøvene som skal overføres, er en annen.

Det er også praktisk å bruke "kopiplate"-prosedyren for å fordele konjugat, substrat og stoppløsning.

FORBEREDELSE AV REAGENSER

La alle reagensene komme opp i 18 °C til 26 °C før bruk.

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

Velge mikrotiterstrimler

Bestem antall strimler som kreves for analysen. Det anbefales at tomme brønner, kontroller og standarder testes i duplikat. Fjern de strimlene som ikke brukes og legg dem i oppbevaringsposen, forsegl den igjen og legg den til oppbevaring ved 2 °C til 8 °C. Fest de strimlene som skal brukes under analysen i platerammen.

Vaskeløsning

Bland den 20X konsentrerte vaskeløsningen ved å snu flasken opp ned flere ganger. Hvis den 20X konsentrerte vaskeløsningen har vært oppbevart ved 2 °C til 8 °C, kan det ha dannet seg krystaller. For å løse opp krystallene legges flasken i et vannbad på 37 °C til 50 °C til alle krystallene er oppløst. Deretter blandes innholdet grundig. Klargjør vaskeløsningen ved å fortynne hele innholdet i en av flaskene med den 20X konsentrerte vaskeløsningen opp til en liter med destillert eller ikke-ionisert vann. Bland grundig. Vaskeløsningen er holdbar i 30 dager hvis den oppbevares i en ren beholder ved 2 °C til 8 °C. Hvis reagensen blir misfarget eller uklar, skal den kastes.

Ba standarder og Kontroller

Det er ikke nødvendig å fortynne eller klargjøre standarder og kontroller før bruk.

ANALYSEPROSEDYRE

Les pakningsvedlegget før du begynner med analysen.

Se ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER OG FORBEREDELSE AV REAGENSER.

1. Noter plasseringene på mikrotiterbrønnene som tilsvarer null-brønn(er), alle prøver som skal testes, standarder og kontroller, samt varepartinumrene som er angitt på pakningen. Merk av et hjørne på mikrotiterplaten til orientering.
2. Forbered mikrotiterstrimlene på følgende måte:
 - a. Ved å bruke en vaskeflaske eller automatisk platevaskutstyr tilsettes ca. 300 µl vaskeløsning i hver brønn.
 - b. Inkuber brønnene i ett minutt ved 18 °C til 26 °C.
 - c. Sug opp innholdet i hver brønn.
 - d. Tilsett ca. 300 µl vaskeløsning i hver brønn.
 - e. Sug opp innholdet i hver brønn.
 - f. **Gjenta trinn d-e en gang til, slik at det blir totalt tre vaskeomganger.**
 - g. Snu platen opp ned og slå den fast mot tørkepapir for å fjerne eventuell gjenværende væske.
3. Velg ut en eller flere brønner som skal tjene som nullbrønn. Tilsett 100 µl av prøvefortynning i de(n) brønn(ene) som skal brukes som nullbrønn for plateavleseren.
4. Tilsett 100 µl prøvefortynner, Standarder, Kontroller, eller fortynnede prøver i de dublikat tilpassede brønnene. **Alle prøvene må tilsettes platen innen 5 minutter fra den første prøven er tilsatt til platen.**
5. Inkuber ved 18 °C til 26 °C i 60 ± 5 minutter.
6. Vask mikrotiterbrønnene i alt 5 ganger med følgende fremgangsmåte:
 - a. Sug opp innholdet i hver brønn.
 - b. Tilsett ca. 300 µl vaskeløsning i hver brønn ved å bruke en vaskeflaske eller automatisk vaskeutstyr.
 - c. Inkuber brønnene i 1 minutt ved 18 °C til 26 °C.
 - d. Sug opp innholdet i hver brønn. Snu platen opp ned og slå den fast mot tørkepapir for å fjerne eventuell gjenværende væske.
 - e. Tilsett ca. 300 µl vaskeløsning i hver brønn.
 - f. Sug opp innholdet i hver brønn. Snu platen opp ned og slå den fast mot tørkepapir for å fjerne eventuell gjenværende væske mellom hver vask.
 - g. **Gjenta trinn f-h tre ganger til for totalt fem vasker.**
 - h. Etter den femte vaskeomgangen snus platen opp ned, og slås fast mot tørkepapir for å fjerne eventuell gjenværende væske.

7. Ved å bruke en multikanalpipette eller en pipette for flergangsbruk, fordeles 100 µl av Ba-konjugatet i hver av de vaskede testbrønnene, også null-brønn(ene).
8. Inkuber mikrotiterstrimlene ved 18 °C til 26 °C i 60 ± 2 minutter.
9. Vask mikrotiterbrønnene etter 60-minutters inkubasjon (trinn 8), slik som beskrevet under *ANALYSEPROSEDYRE*, trinn 6.
10. Umiddelbart etter vaskeprosedyren fordeles 100 µl av TMB-substratløsningen i hver brønn, også null-brønn(ene).
11. Inkuber mikrotiterstrimlene ved 18 °C til 26 °C i 15 ± 1 minutter.
12. Tilsett 100 µl stoppløsning i hver brønn for å stoppe den enzymatiske reaksjonen. Stoppløsningen skal tilsettes brønnene i samme rekkefølge og med samme fordelingshastighet som med substratløsningen.
13. Slå forsiktig på platen slik at fargeutviklingen fordeler seg helt og jevnt. **MERK: Man kan oppnå optimale resultater hvis man bruker plateavleserens automatiske blandefunksjon (hvis den finnes) like før man leser av platen.**
14. Bestem absorbansen ved avlesning ved 450 nm for hver testbrønn innen 10 minutter etter tilsetning av stoppløsningen (trinn 12), og utfør en null-korreksjon i overensstemmelse med det spektrofotometriske systemet som brukes.
15. Bestem konsentrasjonen av prøver og kontroller ut fra standardkurven.
16. Kast det som er igjen av fortynnete prøver, kontroller og brukte mikrotiterstrimler (se *ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER*).

KVALITETSKONTROLL

Analysesertifikatet i dette settet er spesifikt for dette varenummeret, og skal brukes for å verifisere at de resultatene som er oppnådd i ditt laboratorium tilsvarer de som er oppnådd ved Quidel Corporation.

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

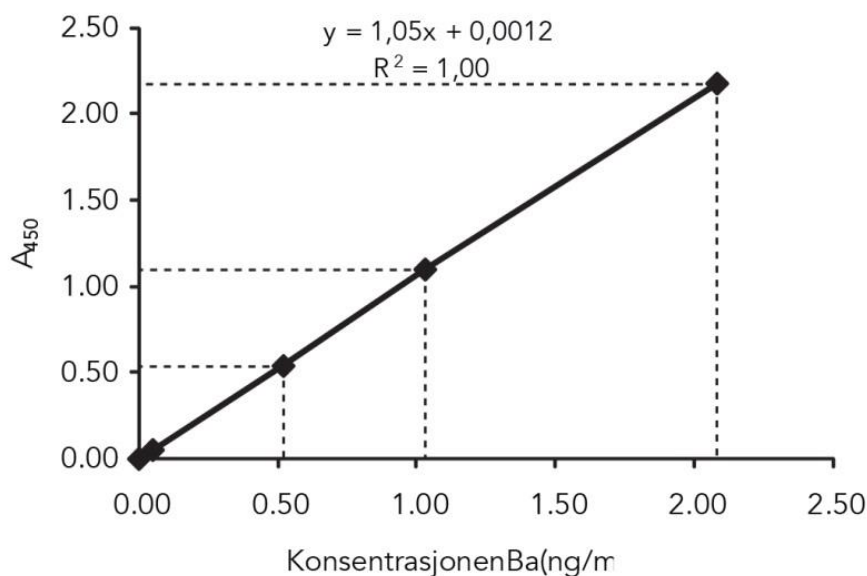
FORTOLKNING AV RESULTATER

Bruk av standardkurve

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

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

Figur 1
Representativ standardkurve



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 av virkelig Ba-konsentrasjon i prøvene som testes

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

Hvis A₄₅₀-verdiene for en bestemt prøve som testes, er høyere enn den høyeste Ba i settets standard (E), skal resultatene rapporteres som "høyere enn" Ba-konsentrasjonen i det høyeste av settets standard (E) multiplisert med prøvens fortynningsfaktor. Hvis man krever en mer nøyaktig Ba-konsentrasjon, må prøven analyseres om igjen ved å bruke en høyere fortynningsfaktor. Ba-standarder og -kontroller må også testes når en analyse utføres om igjen.

Validering

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

korrelasjonskoeffisient (r):	≥ 0,98
stigning (m):	mellom 0,52 og 1,63
y-krysningpunkt (b):	mellom (-)0,05 og 0,05

Se etikettene på hetteglassene eller produktet C av A for de godkjente, gjennomsnittlige grenseverdiene for Ba- konsentrasjon av høye og lave kontroller.

BEGRENSNINGER

MicroVue Ba Enzymimmunanalysen er blitt brukt til å teste prøver, som er tatt som unrin, som serum eller som plasma i K2 EDTA. Andre antikoagulantia er ikke blitt testet.

PRØVEVERDIER

EDTA-plasma fra trettifem (35) serum fra tjueeni (29) og urin fra seksten (16) normale blodgivere ble testet i MicroVue Ba Enzymimmunanalysen. Resultatene vises nedenfor.

Prøve	n	Gjennomsnitt (ng/ml)	Konsentrasjonsområde (ng/ml)
EDTA Plasma	35	658	226 til 2153
Serum	29	1642	436 til 3362
Urin	16	7.7	0.6 til 27.0

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

TESTENS YTEEVNE

Grenser

LOD: Grensen for påvisning (LOD) med Ba analysen er 0,011 ng/ml, fastsatt ved høyeste 3SD-grense i en null-standard studie.

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

ULOQ: Den øverste grense for kvantifisering (ULOQ) med Ba analysen er 3,239 ng/ml, den høyeste konsentrasjonen som oppfyller CLSI kriterier for nøyaktighet og presisjon.

Interfererende Substanser

Følgende substanser er testet i Ba analysen, og funnet å ikke påvirke analysen bruker plasma eller serum prøver:

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

Følgende substanser er testet i Ba analysen, og funnet å ikke påvirke analysen bruke urinprøver:

Substans	Konsentrasjon
Aceton	1000 mg/dl
Kreatinin	500 mg/dl
Glukose	2000 mg/dl
Bilirubin	0,25 mg/dl
Hemoglobin	200 mg/dl
Urea	6000 mg/dl

Følgende substanser *ble* funnet å forstyrre analysen ved hjelp av urinprøver:

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

Presisjon

Presisjon i samme analyse og Mellom analyser ble fastsatt ved vurdering av 20 dobbelttester av 1 plasmaprøve 1 serumprøve og 2 urinprøver i 10 forskjellige analyseomganger.

Prøve	Ba (ng/ml)	I samme analyse ¹ C.V. (%)	Mellom-analyser 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 dobbelttester ²n = 10 omganger

Linearitet

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

Prøve	Fortynningsfaktor	Observert (ng/ml) ³	Forventet (ng/ml) ³	Gjenoppsettelse (%)
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

³Fortynningsfaktor ikke inkludert

Anriket gjenoppretting

Anriket gjenoppretting ble utført ved å tilsette prøvene en kjent mengde rensset Ba og sammenligne observerte verdier med forventede verdier.

Prøve	Ba (ng/ml)	Anriket (ng/ml)	Result (ng/ml)	Gjenoppsett else (%)
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

ASSISTANSE

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

REFERANSER

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 Immunopathology* 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 Immunopathology* 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 Exp 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

PIA034000NO00 (02/17)

ORDLISTE

REF

Katalognummer



CE-merking for samsvar

EC REP

Autorisert representant
i EU

LOT

Partikode



Bruk innen



Produsent



Temperaturbegrensning



Bruksområde



Se e-merking instruksjonene før bruk



Biologisk risiko

IVD

Til *in vitro* diagnostisk bruk



Inneholder tilstrekkelig i henhold til
96 bestemmelser

CONT

Innhold/Inneholder

CONTROL

Kontroll
