

**En enzymatisk immunanalys (immunoassay) för kvantifiering av Ba-fragmentet i faktor B, som är en indikator på aktiveringen av den alternativa komplementvägen, i humant urin, plasma och serum**

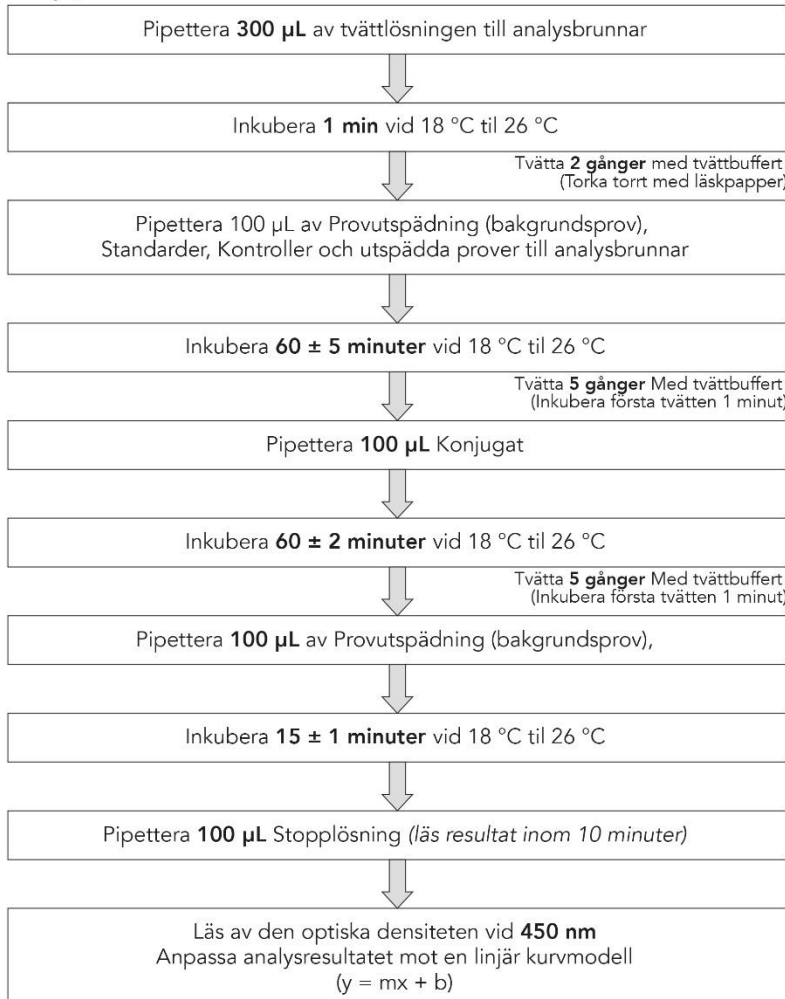
För *in vitro*-diagnostik. För export endast. Inte för försäljning eller användning i USA eller Kanada.

## SAMMANDRAG

### Reagens, standarder, kontroller och provförberedelse

- Späd tvättbuffertkoncentratet 1:20 med destillerat vatten.
- Späd ut urinprover 1:15 med Provutspädning  
(t ex 25  $\mu$ L prover + 350  $\mu$ L spädningsvätska)
- Späd ut plasmaprover 1:1000 med Provutspädning i två steg  
(t ex 10  $\mu$ L prover + 990  $\mu$ L spädningsvätska >  
40  $\mu$ L utspädda prover + 360  $\mu$ L spädningsvätska)
- Späd ut serumprover 1:2000 med Provutspädning i två steg  
(t ex 10  $\mu$ L prover + 990  $\mu$ L spädningsvätska >  
20  $\mu$ L utspädda prover + 380  $\mu$ L spädningsvätska)

### Analysprocedur





## AVSEDD ANVÄNDNING

MicroVue Ba enzymimmunanalys kit mäter mängden komplementfragment Ba, ett aktiveringsfragment till Faktor B i den alternativa komplementvägen, i humant urin, plasma eller serum. Mätning av Ba i humant urin, plasma eller serum tillhandahåller bevis för inblandning av den alternativa komplementvägen. Mätning av aktivering av den alternativa vägen, är en hjälp vid diagnos av ett flertal njursjukdomar, t ex kronisk glomerulonefrit och lupusnefrit, såväl som flera hudsjukdomar, t ex dermatitis herpetiformis och pemphigus vulgaris (blåsdermatos).

Andra sjukdomar hos vilka man observerat aktivering av den alternativa komplementvägen inkluderar åldersrelaterad makuladegeneration, fosterförlust vid graviditeter i riskzonen, reumatisk artrit, och sickle cell-anemi.<sup>1,4,14-22</sup>

## SAMMANDRAG OCH FÖRKLARING

Den alternativa komplementvägen ger ett medfött skydd mot mikrobiella agenser vid avsaknad av specifik antikropp.<sup>5-9</sup> Aktiveringen av denna komplementväg kan utlösas av en mängd olika substanser inklusive mikrobiella polysackarider eller lipider, gramnegativa bakteriella lipopolysackarider och ytmarkörer, som finns på några virus, parasiter, virusinfekterade däggdjursceller och cancerceller. Vid autoimmuna sjukdomar kan den alternativa komplementvägen direkt bidra till vävnadsskada.

En centralt viktig reaktion som uppstår under aktivering av den alternativa vägen är konverteringen av faktor B- zymogen med en molekylärvikt på 93 kD till ett aktivt proteolytiskt enzym. Detta genomförs i en tvåstegsreaktion. Under det första reaktionssteget bildar faktor B ett magnesium-beroende komplex med C3(H<sub>2</sub>O) eller C3b.<sup>8</sup> C3(H<sub>2</sub>O),B-komplexet bildas endast i vätskefas medan C3b, B-komplexet kan bildas antingen i vätskefas eller på en målyta.<sup>5-8</sup> Faktor B, som finns i C3(H<sub>2</sub>O),B eller C3b,B-komplexet, klyvs i det andra reaktionssteget av enzymet i den alternativa vägen, Factor D, i fragmenten Ba (33 Kd) och Bb (60 Kd).<sup>5-8,13</sup>

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

Genom att fastställa Faktor B-klyvningsprodukter i prover kan man uppskatta omfattningen av användandet av den alternativa vägen som uppstår vid tiden för provtagning i det sjukdomstillstånd som är under utredning. MicroVue Ba EIA tillhandahåller en enkel, snabb, icke-radioaktiv, högst noggrann och kvantitativ procedur för mätning av faktor B-aktivering. Den är idealisk för undersökningar som involverar den alternativa komplementvägens roll eller status i ett stort antal forsknings- och kliniska miljöer och för att följa bildandet av Ba *in vitro*.

## PROCEDURENS PRINCIP

MicroVue Ba enzymimmunanalys för kvantifiering av Ba i humant urin, serum eller plasma är en trestegsprocedur, där man använder (1) en mikrotiterplatta som är ytbehandlad med en mus-monoklonal antikropp som binder specifikt till human-Ba, (2) en HRP-konjugerad polyklonal antihuman faktor B antikropp och (3) ett kromogent substrat.

I det första steget tillsätts standarder, kontroller och prover till mikrotiterbrunnar som i förväg är ytbehandlade med en specifik anti-Ba-monoklonal antikropp. Ba, men inte faktor B eller andra

komplementaktiveringsprodukter, som finns i standarder, kontroller eller prover, kommer att binda till den immobiliserade anti-Ba-monoklonala antikroppen. Efter inkubering avlägsnar en tvättprocedur obundet material.

I det andra steget tillsätts pepparrotsperoxidase- (horseradish peroxidase) (HRP) konjugerad polyklonal antihuman faktor B antikropp till varje testbrunn. Det enzym-konjugerade anti-Ba:t binds till Ba som har bundits in till mikrotiterbrunnarna. Efter inkubering avlägsnar en tvättprocedur obundet överskott av konjugat.

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

## INGÅENDE REAGENSER OCH MATERIAL

### 96 analyser för Faktor B:s Ba-fragment

#### MicroVue Ba Enzymimmunanalys innehåller följande:

<b>A Ba Standarder</b>	<b>Art. 5159 – 5163</b>	<b>1 av vardera, 1,5 mL</b>
<b>B Färdigspädd.</b>		
<b>C Innehåller humanserum med proteinstabilisatorer med bestämd Ba-koncentration (ng/mL)</b>		
<b>D</b>		
<b>E</b>		
<b>L Låg Kontroll</b>	<b>Art. 5164</b>	<b>1,5 mL</b>
Färdigspädd. Innehåller humanserum med proteinstabilisatorer med bestämd Ba-koncentration (ng/mL)		
<b>H Hög Kontroll</b>	<b>Art. 5165</b>	<b>1,5 mL</b>
Färdigspädd. Innehåller humanserum med proteinstabilisatorer med bestämd Ba-koncentration (ng/mL)		
<b>1 Mikrotiterplatta</b>	<b>Art. 5166</b>	<b>12 x 8 brunnar</b>
Åttabrunnsstripar, som är ytbehandlade med en monoklonal antikropp från mus, i en återförslutningsbar foliepåse		
<b>2 Stopplösning</b>	<b>Art. 9947</b>	<b>12 mL</b>
Innehåller 1N (4%) saltsyra		
<b>3 20X Tvättlösning Koncentrat</b>	<b>Art A9957</b>	<b>2 x 50 mL</b>
Innehåller fosfatbuffrad saltlösning (PBS), 1,0% Tween-20®, och 0,035% ProClin® 300		
<b>4 Provspädningsvätska</b>	<b>Art A3670</b>	<b>50 mL</b>
Innehåller PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% proteinstabilisatorer, 0,035% ProClin 300		
<b>5 TMB Substrat</b>	<b>Art 5059</b>	<b>12 mL</b>
Färdigspädd. Innehåller 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB)		
<b>6 Konjugat</b>	<b>Art 5167</b>	<b>12 mL</b>
Innehåller pepparrotsperoxidase-konjugerat polyklonal antihuman faktor B antikropp upplöst i HRP-stabiliseringsbuffert med konserveringsmedel		

Tween-20® är ett varumärke som tillhör ICI Americas Inc.

ProClin® är ett varumärke som tillhör Rohm and Haas Company.

## ERFORDERLIGA MEN EJ MEDFÖLJANDE MATERIAL

- Timer (60-minuters)
- Ren 96-håls mikrotiterplatta eller provrör och rack för provspädning (valfritt)
- Rena, oanvända mikrotiterplattor för replikplatteteknik (valfritt)
- Mätbägare för spädning av tvättbuffert
- Flaska för tvättbuffert, eller annat validerat tvättsystem för immunanalys
- Mikropipetter och sterila engångspipettspetsar
- Reagensbehållare för att tillsätta konjugat, substrat- och stopplösningar till platta (använd rena, oanvända behållare för varje reagens)
- Justerbar multikanalspipett (8 eller 12 kanaler) eller repetermikropipetter
- Rena pipetter, 1 mL, 5 mL och 10 mL
- Plattavläsare som kan läsa av en  $A_{450}$ -optisk densitet på mellan 0,0 och 3,0
- Avjonat eller destillerat vatten

## VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- För *in vitro*-diagnostisk användning.
- Behandla proverna som potentiellt riskavfallsmaterial. Följ allmänna försiktighetsåtgärder vid hantering av innehållet i detta kit och eventuella patientprover.
- Använd de tillhandahållna reagenserna som en sammanhängande enhet före det utgångsdatum som finns angivet på förpackningsetiketten.
- Lagra analysreagenserna enligt föreskrift.
- Använd inte de ytbehandlade remsorna/stripen, om det har gått hål på påsen.
- ProClin 300 används som ett konserveringsmedel. Tillfällig kontakt med eller förtäring av buffertar eller reagenser som innehåller ProClin kan orsaka irritation på huden, i ögonen eller munnen. Använd god laboratoriepraxis för att reducera exponering. Sök medicinsk vård vid eventuella symptom.
- Stopplösningen anses vara frätande och kan orsaka irritation. Får ej förtäras. Undvik kontakt med ögon, hud och kläder. Vid ev kontakt, skölj omedelbart det drabbade området med vatten. Vid ev förtäring, tillkalla läkare.
- Varje donerad enhet som använts vid framställningen av standarder och kontrollserum i denna produkt har testats med en FDA-godkänd metod beträffande befintlighet av antikropp riktad mot humant immunbristvirus (HIV1 och HIV2) och mot hepatit C-virus, såväl som beträffande hepatit B-ytantigen. Eftersom ingen testmetod kan erbjuda en fullständig försäkran om att infektiösa ämnen inte finns, bör dessa reagenser hanteras på biosäkerhetsnivå 2, såsom rekommenderas för eventuellt potentiellt infektiöst humanserum eller –blodprov i manualen "Biosäkerhet på mikrobiologiska och biomedicinska laboratorier" ("Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories"), av "Centers for Disease Control/National Institutes of Health" (USA).<sup>23</sup>
- Användning av multikanalspipetter eller repeterpipetter rekommenderas för försäkran om tillsättning av reagens på utsatt tid.
- För exakt mätning av prover, tillsätt prover och standarder i exakt mängd. Pipettera noggrant och använd endast kalibrerad utrustning.
- Korrekt insamling och lagring av prover är väsentlig för noggranna resultat (se *HANTERING OCH FÖRBEREDANDE AV PROVER*).
- Undvik mikrobiell eller korskontaminering av prover eller reagenser.
- Testa varje prov i duplikat.
- Använd inte samma mikroanalysbrunn för mer än ett test.
- Användning av andra inkuberingsstider och -temperaturer än de som föreskrivits i Procedur-avsnittet kan ge felaktiga resultat.
- TMB-substratet måste skyddas mot ljus och kontakt med metall eller gummi under lagring och inkubation. Undvik kontakt med ögon, hud och kläder. Om kontakt sker, skölj omedelbart det drabbade området med vatten.
- Låt inte mikroanalysbrunnarna torka ut när analysen väl har börjat.
- Vid avlägsnande av vätska från mikroanalysbrunnarna, skrapa inte i eller vidrör botten på brunnarna.
- Värmeinaktiverade, hyperlipemiska eller kontaminerade prover kan ge felaktiga resultat.

- För undvikande av aerosolbildning vid tvättning kan man använda en apparat för att suga ut tvättvätskan i en flaska som innehåller hushållsblekningsmedel.
- En tvättflaska eller automatisk påfyllningsanordning ska användas för att tvätta plattan (*ANALYSPROCEDUR*, steg 6). För bästa resultat, använd inte en multikanalspipett för tvättningen av mikroanalysplattan.
- Testning ska utföras i utrymmen med tillräcklig ventilation.
- Kassera behållare och oanvänt innehåll i enligt gällande nationella och lokala reglerings föreskrifter.
- Använd lämpliga skyddskläder, -handskar och -glasögon/ansiktsskydd vid hantering av kitets innehåll.
- Tvätta händerna grundligt efter hantering.
- För ytterligare information om farosymboler, säkerhet, hantering och bortskaffande av delarna som ingår i denna sats, hänvisas till säkerhetsdatabladet (SDS) på [quidel.com](http://quidel.com).

## LAGRING

Lagra öppnat kit vid 2°C till 8°C.

## INDIKATIONER PÅ INSTABILITET ELLER FÖRSÄMRING PÅ REAGENSER

Grumlighet i eller missfärgning av den uppspädda Tvättilösningen indikerar försämring på denna reagens. Om detta inträffar, ska lösningen kasseras.

## HANTERING OCH FÖRBEREDANDE AV PROVER

**Hantera och kasta alla prover med användande av allmänna försiktighetsåtgärder.**

**Allt provhanteringsarbete ska utföras vid 2°C till 8°C.**

### Insamling av prover

#### *Serum/Plasma*

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

Ba-fragment av faktor B är känsligt för proteolys om proverna samlas in eller förvaras felaktigt, och Ba kan bildas i felaktigt hanterade prover genom *artefaktuell* komplementaktivering. *Korrekt insamling, behandling och lagring av prover är viktig.*<sup>24</sup> K2 EDTA-insamlingsrör rekommenderas för optimala plasmaresultat.

Serum- eller EDTA-plasmaprover ska samlas in aseptiskt genom användning av standardtekniker.<sup>25</sup> Proverna ska antingen testas omedelbart eller lagras på is i högst två timmar, innan de analyseras.

Om provet inte kan testas inom två timmar enligt de riktlinjer som är specificerade ovan, ska provet frysas vid -70°C eller lägre.

#### *Urin*

MicroVue Ba-analysen kan utföras med urinprov utan konserveringsmedel, från första eller andra morgonurinen. Provtagningen bör ske före kl 10.00 för att eliminera eventuell påverkan från dygnsvariation. Håll urinprovet kylt (2°C till 8°C) vid lagring i högst sju dagar, eller frys provet vid ≤ -70°C eller kallare för längre förvaring. Provet får inte frysas och tinas mer än fem gånger. **Undvik långvarig exponering för ljus, särskilt solljus.** Under rutinbehandling påverkas inte proverna av vanlig elektrisk laboratoriebelysning.

## Upptining av frysta prover

För att minimera provhanteringstiden ska du ta fram en mikrotiterplatta (eller rör) och tillsätta aktuell volym av spädningslösningen (vilket beskrivs i avsnittet Provspädning nedan) innan du tinar proven för utvärdering.

Tina frysta prover snabbt i 37°C tills de är precis upptinade. Lägg omedelbart över upptinade prover på is för att förhindra komplementaktivering före utspädningen. **Låt inte proven ligga på is längre än två timmar. Låt inte proverna ligga kvar i en temperatur på 37°C**, eftersom detta kan leda till komplementaktivering. Tina inte prover i rumstemperatur eller på is, eftersom detta kan leda till Ba-aktivering och påverka resultaten. Proverna ska testas så snart som möjligt efter upptining. Proverna klarar upp till fem nedfrysings-upptiningscykler utan att påverkas. Om prover måste frysas om för ytterligare analys, föreslår Quidel att man fryser in multipla aliquoter av proverna för att det rekommenderade antalet nedfrysings-upptiningscykler inte överskrids.

## Provutspädning

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

**OBS: Se *Upptining Av Frysta Prover* beträffande viktiga anmärkningar om de rätta metoderna för att tina frysta prover. Rätt hantering av prov är viktig för riktiga resultat.**

Proverna **måste** spädas så att de  $A_{450}$ -värden som observeras är över LLOQ och inte överstiger  $A_{450}$ -värdet för ULOQ. Proverna med  $A_{450}$ -avläsningar utanför detta intervall ska analyseras om vid en ny spädning.

Bered en lämplig spädning (se avsnittet nedan) av varje prov med provspädningsvätskan. Blanda noggrant men undvik skum- och bubbelbildning. Lagra eller återanvänd inte utspädda prover. När de väl späts ut måste proverna tillsättas till mikroanalysbrunnarna inom 30 minuter.

## Urinprover

Det rekommenderas att urinprover späds ut 1:15 i provspädningsmedlet för användning i MicroVue Ba enzymimmunanalys.

## Plasmaprover

Det rekommenderas att plasmaprover späds ut 1:1000 i provspädningsmedlet i två steg för användning i MicroVue Ba enzymimmunanalys:

1. 10  $\mu\text{L}$  prov + 990  $\mu\text{L}$  spädningsvätska
2. 40  $\mu\text{L}$  uppspätt prov + 360  $\mu\text{L}$  spädningsvätska

## Serumprover

Det rekommenderas att serumprover späds ut 1:2000 i provspädningsmedlet i två steg:

1. 10  $\mu\text{L}$  prov + 990  $\mu\text{L}$  spädningsvätska
2. 20  $\mu\text{L}$  uppspätt prov + 380  $\mu\text{L}$  spädningsvätska

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

## Tillsättning av uppspädda prover till mikrotiterbrunnarna

**Tillsättningen av utspädda prover till mikrotiterbrunnarna måste fullgöras inom 5 minuter från appliceringen av det första provet.** Vilken som av två metoder kan användas för att tillsätta utspädda prover, standarder, kontroller och buffertar till brunnarna (se steg 4 i *ANALYSPROCEDUR*). Vid små analysomgångar, där endast några få prover testas, kan de utspädda proverna och andra reagenser tillsättas direkt till sina inmärkta brunnar med en mikropipett (100  $\mu\text{L}$ /brunn). Vid små eller stora

omgångar, men i synnerhet vid större omgångar, rekommenderar vi användande av en "replica plating" proceduren för tillsättning i standarder, kontroller och utspädda prover i mikroanalysbrunnarna så snabbt som möjligt, enligt följande.

Använd en multikanalsmikropipett för att tillsätta 120 µL till 130 µL av varje lösning till individuella brunnar på en spädningsplatta (ingår ej) som motsvarar det slutliga, efterfrågade EIA- mönstret. Efter att alla lösningar som ska testas har tillsatts till mikroanalysbrunnarna på spädningsplattan, ska 100 µL från varje brunn på spädningsplattan snabbt föras över till de antikroppsinklädda brunnarna med användande av en multikanalsmikropipett. För att undvika eventuell korskontaminering måste pipettspetsarna bytas för varje gång man ändrar sammansättning hos de prover som ska överföras.

**"Replica plating"-proceduren kan även användas för att smidigt tillsätta konjugatet, substratet och stopplösningen.**

## FÖRBEREDANDE AV REAGENS

**Värm alla reagenser och material till 18°C till 26°C före användning.**

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

### Mikroanalysremsor/strips

Bestäm antalet brunnar som behövs för analysen. Quidel rekommenderar att brunnarna för bakgrundsbestämning, kontrollerna och standarderna testas i duplikat. Ta bort de remsor som inte behövs och lägg dem i lagringspåsen, återförslut påsen och lägg tillbaka den för lagring vid 2°C till 8°C. Fäst de remsor som ska användas i analysen i mikrotiterplattans ram.

### Tvättlösning

Blanda 20X-tvättlösningsskoncentratet genom att vända upp och ner på flaskan ett flertal gånger. Om 20X-tvättlösningsskoncentratet har lagrats vid 2°C till 8°C, kan kristaller ha bildats. För att lösa upp kristallerna, värm upp flaskan i ett 37°C till 50°C-vattenbad tills alla kristaller har lösts upp och blanda därefter noggrant. Bered tvättlösningen genom att späda hela innehållet från en av flaskorna med 20X-tvättlösningsskoncentrat med upp till en liter destillerat eller avjonat vatten. Blanda noggrant. Uppspädd tvättlösning håller sig i 30 dagar, om den lagras i en ren behållare vid 2°C till 8°C. Om missfärgning eller grumlighet uppstår, kassera reagensen.

### Standarder och kontroller

Standarder och kontroller kräver ingen spädning eller beredning före användning.

## ANALYSPROCEDUR

**Läs hela produktbladet innan analysen påbörjas.**

*Se VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER och REAGENSFÖRBEREDELSE.*

1. Registrera mikroanalysbrunnarnas positioner i förhållande till brunnen/-arna för bakgrundsbestämning, alla testprover, standarder och kontroller, såväl som de angivna serienummerna från etiketterna på flaskorna. Sätt en etikett på ett hörn av mikroanalysplattan för orienteringens skull.
2. Förbered mikroanalysremsorna på följande sätt:
  - a. Tillsätt med användning av en tvättflaska eller automatisk plattvättningsanordning ca 300 µL tvättlösning till varje brunn.
  - b. Inkubera brunnarna i en minut vid 18°C till 26°C.
  - c. Sug ut innehållet från varje brunn.
  - d. Tillsätt ca 300 µL tvättlösning till varje brunn.

- e. Sug ut innehållet från varje brunn.
- f. Upprepa steg d-e en gång till, totalt tre tvättningar.**
- g. Vänd upp och ner på plattan och knacka den hårt mot ett absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska.
3. Välj ut en eller två brunnar för bakgrundsbestämning (blank). Tillsätt 100 µL spädningvätska till brunnen/-arna som ska användas för bakgrundsbestämning i plattläsaren.
4. Tillsätt 100 µL av standarder, kontroller eller utspädda prover till duplikattilldelade mikroanalysbrunnar. **Slutför detta steg inom 5 minuter.**
5. Inkubera vid 18°C till 26°C i 60 ± 5 minuter.
6. Tvätta mikroanalysbrunnarna totalt 5 gånger med användning av följande procedur:
  - a. Sug ut innehållet från varje brunn.
  - b. Tillsätt med användning av en tvättflaska eller automatisk platttvättningsanordning ca 300 µL tvättlösning till varje brunn.
  - c. Inkubera brunnarna i 1 minut vid 18°C till 26°C.
  - d. Sug ut innehållet från varje brunn.
  - e. Vänd upp och ner på plattan och knacka den hårt mot ett absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska.
  - f. Tillsätt ca 300 µL tvättlösning till varje brunn.
  - g. Sug ut innehållet från varje brunn.
  - h. Vänd upp och ner på plattan och knacka den hårt mot ett absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska mellan varje tvätt.
  - i. Upprepa steg f-h ytterligare tre gånger för totalt fem tvättningar.**
  - j. Vänd efter den femte tvättomgången upp och ner på plattan och knacka den hårt mot absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska.
7. Fördela genom användning av en multikanals- eller repeterpipett 100 µL Ba-konjugat till varje tvättad testbrunn, inklusive brunnen/-arna för bakgrundsbestämning.
8. Inkubera mikroanalysremorna vid 18°C till 26°C i 60 ± 2 minuter.
9. Tvätta mikroanalysbrunnarna efter 60-minutersinkuberingen (steg 8) som det beskrivs under *ANALYSPROCEDUR*, steg 6.
10. Fördela omedelbart efter tvättproceduren 100 µL av TMB-substratlösningen till varje brunn, inklusive den/de för bakgrundsbestämning.
11. Inkubera mikroanalysremorna vid 18°C till 26°C i 15 ± 1 minuter.
12. Tillsätt 100 µL stopplösning till varje brunn för att stoppa den enzymatiska reaktionen. Stopplösningen ska tillsättas till brunnarna i samma ordning och i samma takt som substratlösningen har tillsatts.
13. Knacka försiktigt plattan mot bänkens översida för att sprida färgutvecklingen fullständigt och jämnt.  
**OBS: Optimala resultat kan uppnås genom användning av plattläsarens auto-mix-funktion (om tillgänglig) precis före avläsning av plattan .**
14. Bestäm absorberingsavläsningen vid 450 nm för varje testbrunn inom 10 minuter efter tillsättandet av stopplösningen (steg 12) genom att göra en bakgrundskorrigerig enligt det använda spektrofotometriska systemet.
15. Bestäm koncentrationen av prover och kontroller med hjälp av standardkurvan.
16. Kasta de återstående utspädda proverna och kontrollerna samt de använda mikroanalysremorna (se *VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER*).

## KVALITETSKONTROLL

Analyscertifikatet som finns med i detta kit är serienummerspecifikt och ska användas för att verifiera att resultaten som erhållits av ert laboratorium är liknande dem som erhållits på Quidel Corporation.

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



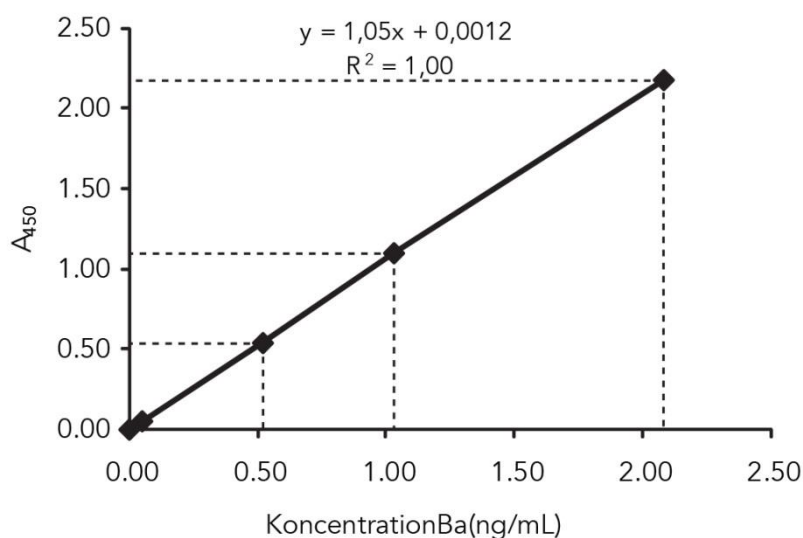
## TOLKNING AV RESULTAT

### Användning av standardkurvan

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

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

**Figur 1**  
**Representativ Standardkurva**



Prover	$A_{450}$	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
$r = 1,000$	$m = 1,05$	$b = 0,0012$

### Beräkning av faktisk Ba-koncentration i prover

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

Om  $A_{450}$ -värdena för ett givet testprov är högre än det för Ba-högsta-kit-standardern (E), ska resultaten rapporteras som "högre än" den högsta-kit-standardens (E) Ba-koncentration multiplicerad med provutspädningsfaktorn. Om ett mera noggrant Ba-koncentrationsvärde erfordras, kan testproverna omanalyseras med användning av en högre utspädningsfaktor. I alla omanalyser måste Ba-kit-standarder och -kontroller också köras.

### Validering

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

korrelationskoefficient (r): $\geq 0,98$
lutning (m): mellan 0,52 och 1,63
y-avskärning (b): mellan (-)0,05 och 0,05

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

## BEGRÄNSNINGAR

MicroVue Ba-Plus enzymsimmunanlys (MicroVue Ba Enzyme Immunoassay) har använts för att testa prover insamlade som urin, serum eller plasma i K2 EDTA. Andra anti-koagulerande medel har inte testats.

## PROVVÄRDEN

EDTA-plasma från trettiofem (35), serum från tjugonio (29) och urin från sexton (16) normala donatorer testades i MicroVue Ba-enzymimmunanlys- (MicroVue Ba Enzyme Immunoassay) kitet. Resultaten presenteras nedan.

	n	Medel (ng/ml)	Intervall (ng/ml)
EDTA Plasma	35	658	226 till 2153
Serum	29	1642	436 till 3362
Urin	16	7.7	0.6 till 27.0

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

## UTFÖRANDE AV TESTET

### Begränsningar

**LOD:** Detektionsgränsen (The limit of detection) (LOD) för Ba-analysen är 0,011 ng/mL, bestämd av den övre 3SD-gränsen i en nollstandardstudie.

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

**ULOQ:** Den övre gränsen för kvantifiering (The upper limit of quantitation) (ULOQ) för Ba-analysen är 3,239 ng/mL, den högsta koncentration som mötte CLSI kriterier för noggrannhet och precision.

### Interfererande Substanser

Följande substanser testades i Ba-analysen och befanns inte interferera med analysen när man använder plasma eller serum:

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

Följande substanser testades i Ba-analysen och befanns inte interferera med analysen när du använder urinprov:

Substans	Koncentration
Aceton	1000 mg/dL
Kreatinin	500 mg/dL
Glukos	2000 mg/dL
Bilirubin	0,25 mg/dL
Hemoglobin	200 mg/dL
Urea	6000 mg/dL

Följande substanser befanns interferera med analysen vid användning av urinprov:

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

## Precision

Intra- och interassayprecision bestämdes genom analys av 20 replikat av 1 plasmaprover, 1 serumprover och 2 urinprover i 10 olika körningar.

Prove	Ba (ng/mL)	Intraassay <sup>1</sup> C.V. (%)	Interassay <sup>2</sup> 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

<sup>1</sup>n = 20 replikat    <sup>2</sup>n = 10 körningar

## Linjäritet

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

Prove	Spädn,- Faktor	Uppmätt (ng/mL) <sup>3</sup>	Förväntat (ng/mL) <sup>3</sup>	Påvisad (%)
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	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

<sup>3</sup>Utspädningsfaktor ej inkluderad

## ”Spike Recovery” – Spik-Påvisning

Spik-Påvisning utfördes genom att spika prov med en känd kvantitet av renat Ba och jämföra erhållna värden med förväntade värden.

Prov	Ba (ng/mL)	Tillsatt (ng/mL)	Uppmätt (ng/mL)	Påvisad (%)
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

## SUPPORT

För tjänster utanför USA: kontakta en lokal distributör för Quidel-produkter. Ytterligare information om Quidel, våra produkter eller distributörer finns på vår hemsida [www.quidel.com](http://www.quidel.com).

## REFERENSER

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., Iseman 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.

MicroVue är ett varumärke som tillhör Quidel Corporation. Alla andra varumärken som förekommer i detta dokument tillhör sina respektive ägare och deras användning här innebär inte någon underförstådd sponsring eller godkännande av några produkter eller tjänster.

**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](http://quidel.com)

**PIA034001SV00 (09/21)**

## ORDLISTA

---

**REF**

Katalognummer



CE-märkning om överensstämmelse

---

**EC REP**

Auktoriserad representant inom europeiska gemenskapen

**LOT**

Satskod

---



Använd före



Tillverkare

---



Temperaturbegränsning



Avsedd användning

---



Konsultera e-märkning bruksanvisning



Biologisk risk

---

**IVD**

För *in vitro*-diagnostik



Innehållet räcker till 96 bestämningar

---

**CONT**

Innehåll/innehåller

**CONTROL**

Kontroll

---