



MicroVue™ Complement
Bb Plus Fragment EIA

EN, DE, IT, FR, ES

2) This document contains bookmarks. To view correctly use Adobe Reader or Adobe Acrobat software.

15) Dieses Dokument enthält Lesezeichen. Um die korrekte Verwendung von Adobe Reader oder Adobe Acrobat-Software anzuzeigen.

29) Questo documento contiene i segnalibri. Per visualizzare correttamente utilizzare Adobe Reader o Adobe Acrobat software.

42) Ce document contient des signets. Pour afficher correctement l'utilisation du logiciel Adobe Reader ou Adobe Acrobat.

66) Este documento contiene marcadores. Para ver correctamente, utilice el software Adobe Reader o Adobe Acrobat.



MicroVue™ Complement

Bb Plus Fragment EIA

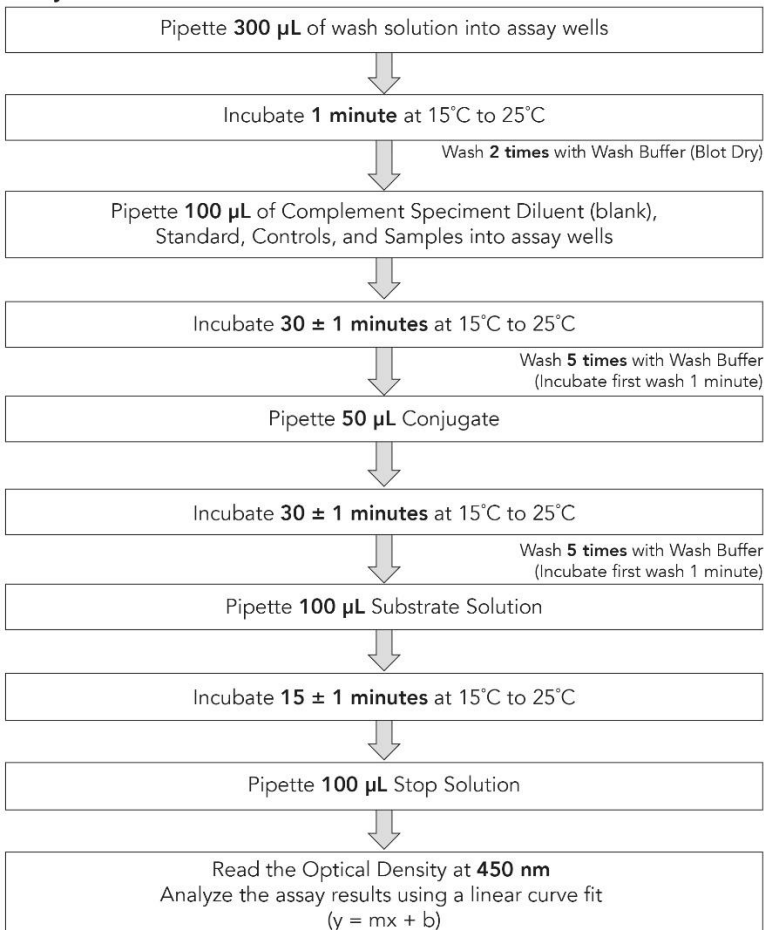
An enzyme immunoassay for quantitation of the complement fragment Bb, an activation fragment of Factor B of the alternative pathway of complement, in human plasma or serum

SUMMARY

Reagent, Standards, Controls, and Sample Preparation

- ☐ Dilute Wash Buffer Concentrate 1:20 with DI Water
- ☐ Reconstitue each Standard and Control with 1.0 mL of Hydrating Reagent (let sit for 15 minutes, and mix gently before use)
- ☐ Dilute Plasma Samples 1:10 with Complement Specimen Diluent (e.g. 50 μ L + 450 μ L) (pipette into assay wells within 30 minutes)
- ☐ Dilute Serum Samples 1:20 with Complement Specimen Diluent (e.g. 25 μ L + 475 μ L) (pipette into assay wells within 30 minutes)

Assay Procedure





The MicroVue Bb Plus EIA kit measures the amount of the complement fragment Bb, an activation fragment of Factor B of the alternative pathway of complement, in human plasma or serum. Measurement of Bb in human plasma or serum provides evidence of the involvement of the alternative pathway of complement. Measurement of alternative pathway activation aids in the diagnosis of several kidney diseases, e.g., chronic glomerulonephritis, lupus nephritis, as well as several skin diseases, e.g., dermatitis herpetiformis and pemphigus vulgaris. Other diseases in which activation of the alternative pathway of complement has been observed include rheumatoid arthritis, sickle cell anemia, and gram-negative bacterial infections.

SUMMARY AND EXPLANATION

The alternative complement pathway provides innate protection against microbial agents in the absence of specific antibody.¹⁻⁵ The activation of this complement pathway can be triggered by a variety of substances including microbial polysaccharides or lipids, gram-negative bacterial lipopolysaccharides, and surface determinants present on some viruses, parasites, virally infected mammalian cells, and cancer cells. In autoimmune diseases, the alternative complement pathway may contribute directly to tissue damage.

A centrally important reaction that occurs during alternative pathway activation is the conversion of the 93 Kd molecular weight Factor B zymogen to an active proteolytic enzyme. This is accomplished in a two-step reaction. During the first reaction step the Factor B forms a magnesium-dependent complex with C3(H₂O) or C3b.⁴ The C3(H₂O),B complex is formed only in fluid-phase while the C3b,B complex can be formed either in fluid-phase or on a target surface.¹⁻⁴ Factor B, which is present in the C3(H₂O),B or the C3b,B complex, is cleaved into the Ba (33 Kd) and Bb (60 Kd) fragments in the second reaction step by the alternative pathway enzyme, Factor D.¹⁻⁴ The resulting C3b,Bb bimolecular complex is the C3 convertase enzyme of the alternative pathway. The Bb subunit is the catalytically active site of the complex that is capable of cleaving C3 to C3a and C3b fragments.^{1-4,6} The additional C3b fragments produced in this manner may form the C3b,Bb,C3b trimolecular complex that is the C5 convertase enzyme of the alternative pathway. This C5 convertase is capable of cleaving C5 to C5a and C5b fragments.^{1-4,6}

The C3 and C5 convertases of the alternative pathway can be stabilized by Factor P (also called Properdin), a component of the alternative pathway normally present in human plasma or serum,¹⁻⁴ or by C3 nephritic factor, an autoantibody produced in some patients experiencing extensive alternative pathway activation.⁵ The C3 and C5 convertases of the alternative pathway can be dissociated, and thereby inactivated, by spontaneous decay dissociation,⁷ or by the binding of Factor H or Complement Receptor 1 (CR1).^{4,8} The Bb fragment that is dissociated from either convertase retains some biological activities, e.g., retention of functional hemolytic activity,^{4,9} the ability to induce macrophage- spreading,¹⁰ and plasminogen activation.¹¹

Although alternative pathway activation is thought to occur primarily in the absence of specific antibody, many situations arise in which alternative pathway activation can occur as the result of classical pathway activation. For example, immune complexes that are present in autoimmune disease patients can trigger classical complement pathway activation with resultant production of C3b fragments. As described above, these C3b molecules are capable of binding Factor B and initiating its cleavage into the Ba and Bb fragments. Thus, alternative pathway activation can occur in antibody-mediated autoimmune disease states and may contribute significantly to enhanced complement activation and concomitant tissue destruction.

By assessing Factor B cleavage products in test specimens, one can estimate the extent of alternative pathway utilization occurring at the time of sample collection in the disease state under investigation. The MicroVue Bb Plus EIA provides a simple, rapid, non-radioactive, highly specific, and quantitative procedure for measuring Factor B activation. It is ideal for investigations involving the role or status of the alternative complement pathway in numerous research and clinical settings, and for monitoring the generation of Bb *in vitro*.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The MicroVue Bb Plus EIA (Enzyme Immunoassay) for the quantitation of Bb in human plasma or serum is a three-step procedure utilizing (1) a microassay plate coated with a mouse monoclonal antibody that binds specifically to human Bb, (2) an HRP-conjugated murine anti-human Bb, and (3) a chromogenic substrate.

In the first step, Standards, Controls, and test specimens are added to microassay wells precoated with a specific anti-Bb monoclonal antibody. Bb, but not Factor B or other complement activation products, present in the Standards, Controls, or specimens will bind to the immobilized anti-Bb monoclonal antibody. After incubation, a wash cycle removes unbound material.

In the second step, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated murine anti-Bb antibody is added to each test well. The enzyme conjugated anti-Bb binds to Bb captured in the microassay wells. After incubation, a wash cycle removes unbound, excess conjugate.

In the third step, a chromogenic enzyme substrate is added to each microassay well. The bound HRP-conjugate reacts with the substrate, forming a blue color. After incubation the enzyme reaction is stopped chemically, the color changes to yellow, and the color intensity is measured spectrophotometrically at 450 nm. The color intensity of the reaction mixture is proportional to the concentration of Bb present in the test specimens, Standards, and Controls.

REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED

96 Assays for the Bb fragment of Factor B

MicroVue Bb Plus EIA kit contains the following:

A Bb Plus Standards:	Parts A9948-A9952	1 mL each
B (lyophilized) Each contains a known concentration of Bb in human serum diluted in PBS, protein stabilizers,		
C 0.035% ProClin® 300		
D		
E		
L Bb Plus Low Controls	Part A9953	1 mL
(lyophilized) Contains a known concentration of Bb in human serum diluted in PBS, protein stabilizers, 0.035% ProClin 300		
H Bb Plus High Controls	Part A9955	1 mL
(lyophilized) Contains a known concentration of Bb in human serum diluted in PBS, protein stabilizers, 0.035% ProClin 300		
1 Microassay Plate	Part A9559	12 x 8 wells
12 eight-well strips coated with a purified mouse monoclonal antibody specific for human Bb in a resealable foil pouch		
2 Stop Solution	Part A9947	12 mL
Contains 1N Hydrochloric acid		
3 20X Wash Solution Concentrate	Part A9957	50 mL
Each contains phosphate buffered saline (PBS), 1.0% Tween-20®, and 0.035% ProClin 300		
4 Complement Specimen Diluent	Part A3670	50 mL
Contains PBS, 0.05% Tween-20, 2.5% protein stabilizers, 0.035% ProClin 300		
5 TMB Substrate	Part 5059	12 mL
Contains 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)		

- | | | | |
|----------|---|-------------------|--------------|
| 6 | Bb Plus Conjugate | Part A9956 | 7 mL |
| | Contains horseradish peroxidase-conjugated murine anti-human Bb suspended in HRP stabilizing buffer with preservative | | |
| 8 | Hydrating Reagent | Part A3675 | 25 mL |
| | Contains 0.035% ProClin 300 | | |
| | Tween® 20 is a registered trademark of ICI Americas Inc. | | |
| | ProClin® is a registered trademark of Rohm and Haas Company. | | |

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Timer (60 minute range)
- Calculator or other computational method to validate the assay
- Clean, unused microassay plates and/or test tubes and racks
- Container for wash buffer dilution
- Wash bottle or other immunoassay washing system
- Adjustable multichannel pipette (8 or 12 channels) or repeating micropipettes (optional)
- Clean pipettes, 1 mL, 5 mL, and 10 mL
- Micropipettes and pipette tips
- Plate reader capable of optical density readings between 0.0 and 2.0
- Deionized or distilled water

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use.
- Use of Heparin Plasma in this assay may give erroneous results.
- Treat specimen samples as potentially biohazardous material. Follow Universal Precautions when handling contents of this kit and any patient samples.
- Use the supplied reagents as an integral unit prior to the expiration date indicated on the package label.
- Store assay reagents as indicated.
- Do not use Coated Strips if pouch is punctured.
- When adding or aspirating liquids from the microassay wells, do not scrape or touch the bottom of the wells.
- Using incubation times and temperatures other than those indicated in the Procedure section may give erroneous results.
- Do not allow microassay wells to dry once the assay has begun.
- Do not use a microassay well for more than one test.
- Use of multichannel pipettes or repeat pipettors is recommended to ensure timely delivery of reagents.
- For accurate measurement of samples, add samples and standards precisely. Pipet carefully using only calibrated equipment.
- Proper collection and storage of test specimens are essential for accurate results (see *SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION*, page 6).
- Avoid microbial or cross-contamination of specimens, reagents, or materials. Incorrect results may be obtained if contaminated.
- Each donor unit used in the preparation of the Standards and Control sera was tested by an FDA-approved method for the presence of antibody to human immunodeficiency virus, (HIV 1 and 2) and hepatitis C virus, as well as for hepatitis B surface antigen and found to be negative (were not repeatedly reactive). However, because no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these reagents should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Micro-biological and Biomedical Laboratories" 1999.

- ProClin 300 is used as a preservative. Incidental contact with or ingestion of buffers or reagents containing ProClin can cause irritation to the skin, eyes, or mouth. Use good laboratory practices to reduce exposure. Seek medical attention if symptoms are experienced.
- **The Substrate is light sensitive. Avoid prolonged exposure to bright or direct light. Store reagents in the dark when not in use.**
- To avoid aerosol formation during washing, use an apparatus to aspirate the wash fluid into a bottle containing household bleach.
- **A wash bottle should be used to wash the plate. For best results, do not use a multichannel pipette to wash the microassay plate.**
- Heat-inactivated, hyperlipemic or contaminated specimens may give erroneous results.
- Testing should be performed in an area with adequate ventilation.
- Dispose of containers and unused contents in accordance with Federal, State and Local regulatory requirements.
- Wear suitable protective clothing, gloves, and eye/face protection when handling the contents of this kit.
- Wash hands thoroughly after handling.
- For additional information on hazard symbols, safety, handling and disposal of the components within this kit, please refer to the Safety Data Sheet (SDS) located at quidel.com.

REAGENT PREPARATION

Bring all reagents and materials to 15°C to 25°C before use.

After removing the needed reagents and materials, return the unused items to their appropriate storage temperatures (see *STORAGE*).

Coated Strips

Determine the number of strips needed for the assay. Remove the desired number of strips. Secure the selected strips that are to be used in the plate frame. Place the unneeded strips back into the storage bag, seal the bag, and store at 2°C to 8°C.

Wash Solution

Prepare the Wash Solution for washing the micro-assay wells by diluting 50 mL of the 20X Wash Solution Concentrate up to a final volume of one liter with distilled or deionized water. Mix thoroughly before use. The Wash Solution is stable for 30 days when stored in a clean container at 2°C to 8°C. If cloudiness occurs, discard the reagent.

Bb Plus Standard and Control Reconstitution

Add 1.0 mL of Hydrating Reagent to each Standard vial (A - E), and to the Low Control and the High Control. Allow the reconstituted vials to rehydrate for at least 15 minutes at room temperature. Mix thoroughly. Avoid formation of foam or bubbles during mixing. Reconstituted standards and controls are stable for 30 days when stored at 2°C to 8°C.

Specimen Dilution

Caution: Treat all specimens as if potentially infectious. Do not use heat-inactivated or contaminated specimens.

It is recommended that plasma samples be diluted 1:10 in Specimen Diluent for use in the MicroVue Bb Plus EIA. It is recommended that serum samples be diluted 1:20 in Specimen Diluent. Once diluted, the specimens must be added to the microassay wells within 30 minutes. Do not store or re-use diluted specimens. Any remaining specimens should be discarded.

Specimens with high levels of complement activation may require larger sample dilutions than those indicated.

Adding Diluted Specimens to the Microtiter Wells

Either of two methods can be used to add diluted specimens, Standards, Controls, and Buffer, to the wells (see Step 3 of *ASSAY PROCEDURE*). For small assay runs where only a few specimens are being tested, the diluted specimens and other reagents can be added directly to their assigned wells with a micropipette (100 µL/well). For small or large runs, but especially larger runs, Quidel recommends the use of a multichannel pipettor for adding specimens as follows. **(A multi-channel pipettor may be used to conveniently add the Conjugate, Substrate and Stop Solution, as well).**

In order to load the Standards, Controls and diluted specimens into the microassay wells as rapidly as possible, a “replica plating” procedure can be employed. Instead of adding 100 µL of each Standard, Control, or diluted specimen to the antibody-coated wells individually, 120-130 µL of each solution can be added to individual wells in a blank plate (not provided) corresponding to the final EIA pattern desired. After all the solutions to be tested have been added to the microassay wells in the blank plate, rapidly transfer 100 µL from each blank well to the antibody-coated wells using a multichannel micropipettor. To avoid the possibility of cross-contamination, pipette tips must be changed each time there is a change in the composition of the samples to be transferred.

STORAGE

Store the unopened kit at 2°C to 8°C. After the kit is opened, the 20X Wash Solution Concentrate and Hydrating Reagent may be stored at 2°C to 25°C.

All reagents must be brought to room temperature (15°C to 25°C) before use. Place all unused microassay strips into the storage bag, reseal the bag, and store at 2°C to 8°C.

INDICATIONS OF INSTABILITY OR DETERIORATION OF REAGENTS

Cloudiness of the Wash Solution indicates a deterioration of this reagent. If this occurs, the solution should be discarded.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Handle and dispose of all specimens using Universal Precautions.

The proper collection and storage of specimens is essential, since the Bb fragment of Factor B is susceptible to proteolysis in improperly collected or stored specimens.

Due to complement activation that occurs during clotting, the Bb concentration in normal human serum samples will be higher than those obtained with EDTA plasma samples. The Bb levels in EDTA plasma may therefore more accurately represent the in vivo concentrations.

Serum or EDTA plasma specimens should be collected aseptically using standard techniques. The specimens should be tested immediately or stored at 4°C or on ice until assayed. However, this short-term storage on ice should not exceed four hours.

For longer-term storage, serum or plasma should be frozen at –70°C or below within two hours after collection.

Thaw frozen ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) specimens rapidly in a 37°C water bath until just thawed. Transfer thawed specimens immediately to ice (for no longer than four hours) to prevent complement activation prior to dilution. **Do not**

leave specimens at 37°C. Do not thaw specimens at room temperature or 4°C, as this can lead to complement activation. Frozen specimens should be tested as soon as possible after thawing. Repeated freezing and thawing is not recommended. If samples are to be re-frozen for further analysis, we suggest freezing multiple aliquots of the specimen to prevent repeated freeze/thaw cycles.

ASSAY PROCEDURE

Read entire product insert before beginning the assay.

See *WARNINGS AND PRECAUTIONS* and *REAGENT PREPARATION*.

1. Record the microassay well positions corresponding to the blank well(s), all test samples, Standards, and Controls, as well as the indicated lot numbers from the vial labels. Label one corner of the Microassay Plate for orientation.
2. Prepare the microassay strips as follows:
 - a. Using a wash bottle, add approximately 300 µL Wash Solution to each well. **NOTE: For best results, do not use a multichannel pipette to wash the microassay plate.**
 - b. Incubate the wells for one minute at 15°C to 25°C.
 - c. Aspirate the contents from each well.
 - d. Add approximately 300 µL Wash Solution to each well.
 - e. Aspirate the contents from each well.
 - f. **Repeat steps d-e one more time, for a total of three washes.**
 - g. Invert the plate and tap firmly on absorbent paper to remove any remaining liquid.
3. Add 100 µL of Specimen Diluent, reconstituted Standards, Controls, or diluted specimens to the assigned wells.
4. Incubate at 15°C to 25°C for 30 ± 1 minutes.
5. Wash the microassay wells a total of 5 times using the following procedure:
 - a. Aspirate the contents from each well.
 - b. Using a wash bottle, add approximately 300 µL Wash Solution to each well. **NOTE: For best results, do not use a multichannel pipette to wash the microassay plate.**
 - c. Incubate the wells for 1 minute at 15°C to 25°C.
 - d. Aspirate the contents from each well.
 - e. Add approximately 300 µL Wash Solution to each well.
 - f. Aspirate the contents from each well.
 - g. **Repeat steps e-f three additional times.**
 - h. After the fifth wash cycle, invert the plate and tap firmly on absorbent paper to remove any remaining liquid.
6. Using a multichannel or repeating pipette, dispense 50 µL of Bb Plus Conjugate into each washed test well, including the blank well(s).
7. Incubate the microassay strips at 15°C to 25°C for 30 ± 1 minutes.
8. Wash the microassay wells after the 30-minute incubation (step 7), as described under *ASSAY PROCEDURE*, step 5. **NOTE: For best results, do not use a multichannel pipette to wash the microassay plate.**
9. Immediately following the wash procedure, dispense 100 µL of the TMB Substrate Solution into each well, including the blank(s). **NOTE: The TMB Substrate must be protected from light during storage and incubation. The TMB Substrate should not be dispensed into a reagent reservoir or other apparatus where light exposure could occur until immediately before dispensing into the microassay wells.**
10. Incubate the microassay strips at 15°C to 25°C for 15 ± 1 minutes in the dark.
11. Add 100 µL of Stop Solution to each well to stop the enzymatic reaction. The Stop Solution should be added to the wells in the same order and at the same rate as the Substrate Solution had been added.
12. Gently tap the plate on the bench top to disperse the color development completely and evenly.
13. Determine the absorbance reading at 450 nm for each test well within one hour after the addition of the Stop Solution (step 11), making a blank correction in accordance with the spectrophotometric system in use.

14. Dispose of the remaining diluted specimens, Controls, substrate, and the used microassay strips (see *WARNINGS AND PRECAUTIONS*).

QUALITY CONTROL

The Certificate of Analysis included in this kit is lot specific and is to be used to verify that the results obtained by your laboratory are similar to those obtained at Quidel Corporation. The optical density values provided are intended as a guideline only. The results obtained by your laboratory may differ.

Quality control ranges are provided. The control values are intended to verify the validity of the curve and sample results. Each laboratory should establish its own parameters for acceptable assay limits. If the control values are NOT within your laboratory's acceptance limits, the assay results should be considered questionable, and the samples should be repeated.

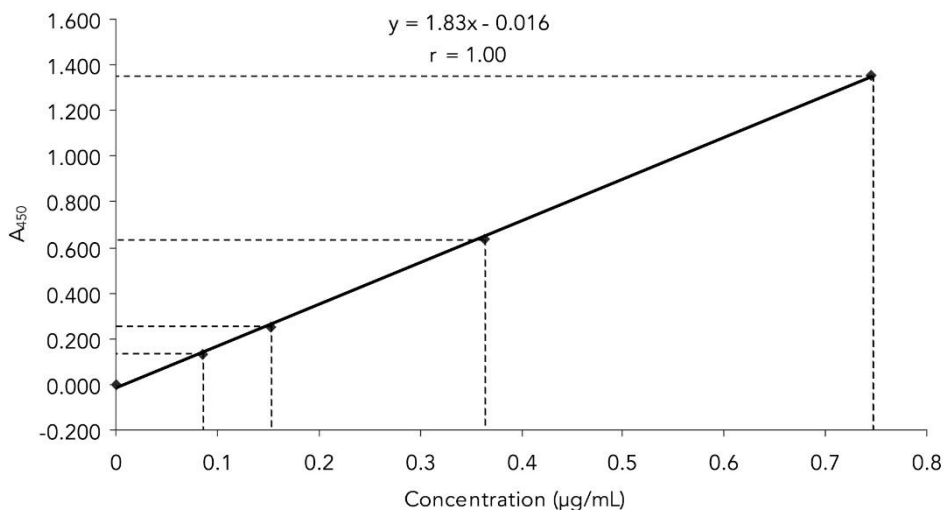
INTERPRETATION OF RESULTS

Use of the Standard Curve

The standard curve for the Bb EIA is generated using the blank subtracted A_{450} values for each Standard (on the y axis) and the assigned concentration for each Bb Plus Standard (on the x axis). After linear regression, the generated standard curve must meet the validation requirements (see below). Most computers and calculators are capable of performing these calculations.

Alternatively, the data may be graphed manually and the values ($\mu\text{g/mL}$) of the test samples read directly from the best-fit line of the standard curve. An example of a typical standard curve is shown in Figure 1.

Figure 1.
Representative Standard Curve



Calculation of Actual Bb Concentration in Test Specimens

The actual Bb concentration present in each undiluted test specimen is determined by multiplying the Bb/mL concentration, determined from the Kit Standard Curve, by the reciprocal of the specimen dilution factor used.

If the A_{450} values for a given test specimen are greater than that of the highest Standard (E), the results should be reported as “greater than” the Bb concentration of the highest Standard (E) multiplied by the specimen dilution factor. If a more accurate Bb concentration value is required, the test specimen should be re-assayed using a larger dilution factor. In all repeat assays, the Bb Plus Standards and Controls must also be run.

VALIDATION

Determine the slope, intercept, and correlation coefficient of the derived best-fit line. The values must be within the specified ranges to qualify the assay:

correlation coefficient (r): > 0.96

slope (m): between 1.094 and 2.558

y-intercept (b): between (-) 0.145 to 0.113

Refer to the vial labels or product C of A for the mean acceptable Bb concentration ranges for the High and Low Controls.

LIMITATIONS

The MicroVue Bb Plus EIA has been used to test specimens collected as serum or as plasma in EDTA. Heparin plasma is NOT suitable for this assay. Other anticoagulants have not been tested.

PERFORMANCE OF THE TEST

Limits

LOD: The limit of detection (LOD) for the Bb Plus EIA is 0.018 µg/mL, determined by the upper 3SD limit in a zero standard study.

LLOQ: The lower limit of quantitation (LLOQ) for the Bb Plus EIA is 0.033 µg/mL, the lowest concentration on the standard curve that met NCCLS criteria for accuracy and precision.

ULOQ: The upper limit of quantitation (ULOQ) for the Bb Plus EIA is 0.836 µg/mL, the highest concentration that met NCCLS criteria for accuracy and precision.

Interfering Substances

Na⁺ Heparin at 14 U/mL (the concentration consistent with Heparin plasma collection tubes) interferes with the Bb Plus EIA and is therefore not recommended for use as a plasma anticoagulant for sample collection. The following substances were tested in the Bb Plus EIA and found to not interfere with the assay:

Substance	Concentration
Bilirubin	40 mg/dL
Hemoglobin	500 mg/dL
Triglycerides	3000 mg/dL
Albumin	6000 mg/dL
Glucose	1200 mg/dL
Cholesterol	500 mg/dL

Precision

Within-run and between-run precision was determined by assaying 20 replicates of 2 plasma samples and 2 serum samples in 10 different runs.

Sample	Bb (µg/mL)	Within-run ¹ C.V. (%)	Between-run ² C.V. (%)
EDTA Plasma	1.550	2.4	7.7
	0.517	2.5	6.7
Serum	2.129	3.1	6.2
	2.375	4.0	9.1

¹n = 20 replicates

²n = 10 runs

Linearity

Linearity was performed by serially diluting samples and comparing observed values with expected values. Typical results are provided below.

Sample	Dilution Factor	Observed Bb (µg/mL)	Expected Bb (ng/mL) ³	Recovery (%)
EDTA Plasma	1:10	0.160	*	*
	1:16	0.107	0.100	106.9
	1:20	0.079	0.080	98.7
	1:32	0.052	0.050	103.9
Serum 1	1:20	0.161	*	*
	1:32	0.103	0.101	102.0
	1:40	0.069	0.081	85.4
	1:64	0.044	0.050	87.2
Serum 2	1:20	0.597	*	*
	1:25	0.467	0.478	97.7
	1:30	0.420	0.398	105.4
	1:40	0.310	0.299	103.8
	1:50	0.230	0.239	96.2
	1:60	0.196	0.199	98.4
	1:80	0.133	0.149	89.0

SAMPLE VALUES

EDTA plasma and serum from thirty-six (36) and forty-nine (49) normal donors, respectively, were tested in the MicroVue Bb Plus EIA kit. The results are presented below.

	n	mean	RANGE	
			±2 SD	±3 SD
EDTA Plasma	36	0.96 µg/mL	0.49-1.42 µg/mL	0.26-1.65 µg/mL
Serum	49	3.53 µg/mL	0.80-6.26 µg/mL	0.0-7.62 µg/mL

Note: The mean and Standard Deviation (SD) behavior of Bb fragment concentrations determined for plasma or serum samples may vary between laboratories. Therefore, it is recommended that each laboratory determine the mean Bb fragment concentration and standard deviation values for samples

ASSISTANCE

To place an order or for technical support, please contact a Quidel representative at 800.874.1517 (in the U.S.) or 858.552.1100 (outside the U.S.), Monday through Friday, from 8:00 a.m. to 5:00 p.m., Eastern time. Orders may also be placed by fax at 740.592.9820. For e-mail support contact customerservice@quidel.com or technicalsupport@quidel.com.

For services outside the U.S.A., please contact your local distributor. Additional information about Quidel, our products, and our distributors can be found on our website quidel.com.

REFERENCES

1. Schreiber, R.D. and Müller-Eberhard, H.J. 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. 1980: p.411.
2. Gotze, O. and Müller-Eberhard, H.J. The alternative pathway of complement activation. *Adv. Immunol.* 1976;24:1.
3. Fearon, D.T. and Austen, K.F. Current concepts in immunology: the alternative pathway of complement – a system for host resistance to microbial infection. *New Engl. J. Med.* 1980;303: 259
4. Pangburn, M.K. and Müller-Eberhard, H.J. The alternative pathway of complement. *Springer Semin. Immunopathol.* 1984;7:163.
5. Ratnoff, W.E., Fearon, D.T., and Austen, K.F. The role of antibody in the activation of the alternative complement pathway. *Springer Semin. Immunopathol.* 1983;6:361.
6. Hugli, T.E. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *Complement* 1986;3:111
7. Fearon, D.T. and Austen, K.F. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 1977;74:1 1683.
8. Fearon, D.T. Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 1979;76: 5867.
9. Fishelson, Z. and Müller-Eberhard, H.J. Residual hemolytic and proteolytic activity expressed by Bb after decay-dissociation of C3b, Bb. *J. Immunol.* 1984;132:1425.
10. Gotze, O., Bianco, C. and Cohn, Z.A. The induction of macrophage spreading by Factor B of the properdin system. *J. Exe. Med.* 1979;149:372.
11. Sundsmo, J.S. and Wood, L.M. Activated factor B(Bb) of the alternative pathway of complement activation cleaves and activates plasminogen. *J. Immunol.* 1981;127:877.
12. Kolb, W.P., Morrow, P.R. and Tamerius, J.D. Ba and Bb Fragments of Factor B activation: Fragment production, biological activities, neoepitope expression and quantitation in clinical samples. *Complement and Inflammation* 1989;6:175.
13. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
14. Sefton, M.V., et al. Using ELISA to evaluate complement activation by reference biomaterials. *J. Mat. Sci* 1994;5:622-627.
15. Mold, C. Tamerius, J.D., et al. Complement activation during painful crisis in sickle cell anemia. *Clin. Immunol. and Immunopathol.* 1995;70:3,314-320.
16. Manzi, S. Rairie, J. et al. Sensitivity and Specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity. *Arthritis and Rheumatism* 1996;39(7)1178-1188.
17. J.Jarvis, Taylor, H. Complement activation and immune complexes in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis: a longitudinal study. *J. Rheumatol.* 1994;21(6) 1124-1127.

18. Aggarwal, et al. Evidence for activation of the alternative complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatol.* 2000;39:189-192.
19. J. Buyon, Tamerius J. et al. Assessment of Disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 1992;35(9) 1028-1036.
20. D. Shaw, Rustagi, P. et al. Effects of Synthetic Oligonucleotides on human complement and coagulation. *Biochemical Pharmacol.* 1997;53(8)1123-1132.
21. Mollnes. T.E., et al. Complement activation in patients with systemic lupus erythematosus without nephritis. *Rheumatol.* 1999;38:933-940.
22. Sturfelt, G, Truedsson, L. Complement and its breakdown products in SLE. *Rheumatol.* 2005;44:1227-1232.
23. Alexander, J.J. et al. Complement-dependent apoptosis and inflammatory gene changes in murine lupus cerebritis. *J. Immunol.* 2005;175:8312-8319.
24. Thurman, J., Holers, V.M. The central role of the alternative pathway in human disease. *J. Immunol.* 2006;176:1305-1310.
25. Pawluczko, A.W et al. Hematin promotes complement alternative pathway-mediated deposition of C3 activation fragments on human erythrocytes: potential implications for the pathogenesis of anemia in malaria. *J. Immunol.* 2007;179:5543-5552.
26. Atkinson, C. et al. Low-dose targeted complement inhibition protects against renal disease and other manifestations of autoimmune disease in MRL/lpr mice. *J. Immunol.* 2008;180:1231-1238.

REF

A027 – MicroVue Bb Plus 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

PIA027002EN00 (09/16)

GLOSSARY

REF

Catalogue number



CE mark of conformity

EC REP

Authorized Representative
in the European Community

LOT

Batch code



Use by



Manufacturer



Temperature limitation



Intended use



Consult e-labeling
instructions for use



Biological risks

IVD

For *In Vitro* diagnostic use



Contains sufficient for 96 determinations

CONT

Contents/Contains

CONTROL

Control

Ein immunassay für die Quantifikation des Komplementfragments Bb von Faktor B, eine Anzeige der Aktivierung der alternativen wegs, in Plasmaproben oder Humanserum

ZUSAMMENFASSUNG

Vorbereitung von Reagenzien und Proben

- ☐ Verdünnt konzentrierte Waschlösung 1:20 mit vollentsalztem Wasser
- ☐ Jede Standardlösungen und Kontrolle wiederherstellen mit 1.0 ml Hydrierungsreagenz (15 Minuten lang ruhen lassen und vor Gebrauch vorsichtig mischen)
- ☐ Plasmaproben verdünnen 1:10 mit Komplement-Probenverdünnungsmittel (z.B. 50 µl + 450 µl) (innerhalb von 30 Minuten in die Testvertiefungen pipettieren)
- ☐ Serumproben verdünnen 1:20 mit Komplement-Probenverdünnungsmittel (z.B. 25 µl + 475 µl) (innerhalb von 30 Minuten in die Testvertiefungen pipettieren)

Testverfahren





VERWENDUNGSZWECK

Der MicroVue Bb Plus Enzymimmunoassay misst die Menge des Komplementfragments Bb in Humanserum oder Plasmaproben. Die Bestimmung des Bb in 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 rheumatoide Arthritis, Sichelzellanämie und gram-negative bakterielle Infektionen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Der alternative Weg des Komplementsystems stellt einen angeborenen Schutz gegen mikrobielle Erreger in Abwesenheit eines spezifischen Antikörpers bereit.¹⁻⁵ 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 direct 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.⁴ 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.¹⁻⁴ 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. Der dadurch entstehende C3b, Bb-bimolekulare Komplex ist das C3-Konvertaseenzym des alternativen Komplementwegs. Die Bb-Untereinheit bildet die katalytisch aktive Stelle des Komplexes, die zur Spaltung von C3 in C3a- und C3b-Fragmente fähig ist.^{1-4,6} Die auf diese Weise produzierten zusätzlichen C3b-Fragmente bilden den C3b,Bb,C3b-trimolekularen Komplex, das C5-Konvertaseenzym des alternativen Wegs. Diese C5-Konvertase ist in der Lage, C5 in C5a- und C5b-Fragmente zu spalten.^{1-4,6}

Die C3- und C5-Konvertasen des alternativen Wegs können durch Faktor P (auch als Properdin bekannt), eine Komponente des alternativen Wegs, die normalerweise in Humanplasma oder Serum¹⁻⁴ vorliegt, oder durch C3-Nephritic-Factor, einen Autoantikörper, der bei manchen Patienten mit extensiver Aktivierung des alternativen Komplementwegs⁵ gebildet wird, stabilisiert werden. Die C3- und C5-Konvertasen des alternativen Wegs können durch spontanen Zerfall⁷ oder durch die Bindung an Faktor H oder Komplementrezeptor 1 (CR1)^{4,8} dissoziiert und dadurch inaktiviert werden. Das von einer der Konvertasen dissoziierte Bb-Fragment behält einige biologische Aktivitäten bei, wie z.B. die Retention der funktionellen hämolytischen Aktivität^{4,9}, die Fähigkeit, das Ausschwärmen von Makrophagen zu induzieren¹⁰ und die Plasminogenaktivierung.¹¹

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 Komplementweges 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 Bb Plus 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 Bb *in vitro*.

FUNKTIONSPRINZIP

Dem MicroVue Bb Plus Enzymimmunoassay zur Quantifizierung von Bb in Humanserum, Plasma oder anderen Proben liegt ein Dreischrittverfahren zugrunde. Zur Durchführung des Assays werden (1) eine Mikroassayplatte, die mit einem spezifisch humanes Bb bindenden monoklonalen Maus-Antikörper beschichtet ist, (2) ein HRP-konjugierter muriner anti-humaner Bb-Antikörper und (3) ein chromogenes Substrat eingesetzt.

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

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

In einem 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 Bb, das in den Testproben, Standardlösungen und Kontrollen vorliegt.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

96 Assays zur Bestimmung des Bb-Fragments des Faktor B

Der MicroVue Bb Plus Enzymimmunassay enthält folgende Komponenten:

A	Bb Plus Standardlösungen	Art.-Nr. A9948-A9952	je 1 ml
B	(lyophilisiert) Enthält eine bekannte Menge an Bb in Humanserum, verdünnt in PBS,		
C	Proteinstabilisatoren, 0,035% ProClin® 300		
D			
E			
L	Niedrige Bb Plus Kontrolle	Art.-Nr. A9953	1 ml
	(lyophilisiert) Enthält eine bekannte Menge an Bb in Humanserum, verdünnt in PBS,		
	Proteinstabilisatoren, 0,035% ProClin 300		
H	Hohe Bb Plus Kontrolle	Art.-Nr. A9955	1 ml
	(lyophilisiert) Enthält eine bekannte Menge an Bb in Humanserum, verdünnt in PBS,		
	Proteinstabilisatoren, 0,035% ProClin 300		

1	Mikroassay-Platte 12 Teststreifen mit jeweils 8 Vertiefungen, beschichtet mit einem gereinigten monoklonalen Maus-Antikörper, der spezifisch für humanes Bb ist, in einem wiederverschließbaren Folienbeutel	Art.-Nr. A9559	je 12
2	Stopplösung Enthält 1N Salzsäure	Art.-Nr. A9947	12 ml
3	20fach konzentrierte Waschlösung Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 1,0% Tween-20® und 0,035% ProClin 300	Art.-Nr. A9957	50 ml
4	Komplement-Proben-verdünnungsmittel Enthält PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% Proteinstabilisatoren, 0,035% ProClin 300	Art.-Nr. A3670	50 ml
5	TMB Substrat Enthält 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) und Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Art.-Nr. 5059	12 ml
6	Bb Plus Konjugat Enthält murines mit Meerrettichperoxidase konjugiertes anti-humanes Bb, suspendiert in HRP-stabilisierendem Puffer mit Konservierungsmittel	Art.-Nr. A9956	7 ml
8	Hydrierungsreagenz Enthält 0,035% ProClin 300	Art.-Nr. A3675	25 ml

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 (über einen Bereich von 60 Minuten)
- Taschenrechner oder anderes Rechenverfahren zum Validieren der Testergebnisse
- Saubere, unbenutzte Mikroassay-Platten und/oder Proberöhrchen und Ständer
- Behälter für die Verdünnung des Waschpuffers
- Waschflasche oder anderes für Immunassays geeignetes Waschsysteem
- Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanäle) oder Mehrfachmikropipetten (optional)
- Saubere Pipetten, 1 ml, 5 ml und 10 ml
- Mikropipetten und Pipettenspitzen
- Plattenlesegerät für Extinktionsmessungen über den Bereich von 0,0 bis 2,0
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSENNAHMEN

- Zur *In-vitro*-Diagnostik.
- Die Verwendung von heparinisiertem Plasma kann in diesem Assay zu falschen Ergebnissen führen.
- 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 Reagenzien des Assays wie angegeben lagern.
- Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
- Beim Hinzufügen oder Ansaugen von Flüssigkeiten zu bzw. von den Mikroassay-Vertiefungen nicht den Boden der Vertiefungen ankratzen oder berühren.
- Durch die Verwendung von Inkubationszeiten oder –temperaturen, die von den unter *Testverfahren* angegebenen Werten abweichen, können falsche Ergebnisse erhalten werden.
- Die Mikroassay-Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
- Die Mikroassay-Vertiefungen jeweils nur für einen Test verwenden.
- Für ein zügiges und effizientes Dosieren der Reagenzien wird der Gebrauch von Mehrkanal- oder Mehrfachpipetten empfohlen.
- Zum Gewährleisten genauer Messungen bei der Zugabe der Proben und Standardlösungen genau arbeiten. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen und nur kalibrierte Geräte verwenden.

- Für den Erhalt genauer Ergebnisse müssen die Proben fachgerecht entnommen und aufbewahrt werden (siehe *PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG*, Seite 4).
- Eine mikrobielle Kontamination bzw. Kreuzkontamination von Proben, Reagenzien oder Materialien vermeiden. Eine Kontamination kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Jede Blutspende, die für die Zubereitung der Standardlösungen und Kontrollseren verwendet wurde, wurde mit einer von der FDA zugelassenen Methode auf Antikörper gegen HIV 1 und 2, Hepatitis C sowie Hepatitis-B-Oberflächenantigen getestet und als negativ befunden (waren nicht wiederholt reaktiv). Da jedoch keine Testmethode die absolute Gewähr bieten kann, dass die Reagenzien pathogenfrei sind, sollten sie nach den gleichen Sicherheitsrichtlinien, wie sie für potenziell infektiöse Humanserum- oder Blutproben gelten, behandelt werden. Das Centers for Disease Control/National Institutes of Health Handbuch "Biosafety in Micro-biological and Biomedical Laboratories" 2007 beschreibt, wie diese Materialien zu handhaben sind.
- ProClin 300 wird als Konservierungsstoff 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 möglichst gering zu halten. Beim Auftreten der ersten Symptome einen Arzt aufsuchen.
- **Das konzentrierte Substrat ist lichtempfindlich. Es darf daher nicht über längere Zeit hellem Licht oder direkter Lichteinstrahlung ausgesetzt werden. Die Reagenzien bei Nichtgebrauch im Dunklen lagern.**
- 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 verwenden. Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassayplatte verwenden.**
- Hitzeinaktivierte, hyperlipämische oder kontaminierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
- 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.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien und Materialien vor dem Test auf 15°C bis 25°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 Waschlösung zum Waschen der Testvertiefungen vorbereiten, indem 50 ml der 20fach konzentrierten Waschlösung mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf 1 Liter verdünnt werden. Vor Gebrauch gründlich mischen. Die Waschlösung ist bei Lagerung in einem sauberen Behälter bei 2°C bis 8°C für 30 Tage stabil. Das Reagenz beim Auftreten von Trübungen entsorgen.

Rekonstituieren der Bb Plus Standardlösungen und Kontrollen

1,0 ml des Hydrierungsreagenz in jedes Standardfläschchen (A-E) und in die Kontrollen für den niedrigen und den hohen Bereich geben. Die rekonstituierten Fläschchen mindestens 15 Minuten bei

Raumtemperatur rehydrieren lassen. Sorgfältig mischen, dabei jedoch die Bildung von Schaum oder Blasen vermeiden. Rekonstituierte Standardlösungen und Kontrollen sind für 30 Tage stabil, wenn sie bei 2°C bis 8°C gelagert werden.

Probenverdünnung

Vorsicht: Alle Proben als potenziell infektiös behandeln. Keine hitzeinaktivierten oder kontaminierten Proben verwenden.

Es wird empfohlen, für den MicroVue Bb Plus Enzymimmunoassay Plasmaproben in einem Verhältnis von 1:10 mit Probenverdünnungsmittel zu verdünnen. Serumproben sollten in einem Verhältnis von 1:20 mit Probenverdünnungsmittel verdünnt werden. Nach der Verdünnung müssen die Proben innerhalb von 30 Minuten in die Testvertiefungen gegeben werden. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden. Restproben sollten entsorgt werden.

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

Zugabe der verdünnten Proben in die Mikrotiter-Vertiefungen

Eine der beiden nachfolgenden Methoden kann für die Zugabe der verdünnten Proben, Standardlösungen, Kontrollen und Puffer in die Testvertiefungen verwendet werden. (siehe Schritt 3 des *TESTVERFAHRENS*). In kleinen 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, empfehlen wir den Gebrauch einer Mehrkanalpipette, um die Proben wie folgt zuzugeben. **(Eine Mehrkanalpipette kann auch für die bequeme Zugabe des Konjugats, Substrats und der Stopplösung verwendet werden.)**

Um die Standardlösungen, Kontrollen und verdünnten Proben so schnell wie möglich in die Testvertiefungen zu geben, kann die „Replica-Plating“-Methode angewendet werden. Statt 100 µL jeder Standardlösung, Kontrolle oder verdünnter Probe einzeln in die antikörperbeschichteten Testvertiefungen zu geben, können 120-130 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.

LAGERUNG

Den ungeöffneten Kit bei 2°C bis 8°C lagern. Nachdem der Kit geöffnet wurde, sollten die 20fach konzentrierte Waschlösung und das Hydrierungsreagenz bei 2°C bis 25°C gelagert werden.

Alle Reagenzien müssen vor Verwendung auf Raumtemperatur (15°C bis 25°C) gebracht werden. Alle nicht benötigten Mikroassaystreifen in den Beutel legen, den Beutel wieder verschließen und bei 2°C bis 8°C lagern.

ANZEICHEN FÜR INSTABILITÄTEN ODER ZERSETZUNGSVORGÄNGE DER REAGENZIEN

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

PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG

Beim Handhaben und Entsorgen aller Proben die allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Die korrekte Entnahme und Aufbewahrung der Proben ist unbedingt erforderlich, da der Faktor Bb bei nicht ordnungsgemäßer Entnahme oder Lagerung empfindlich gegen Proteolyse ist.

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

Serum-oder EDTA-Plasmaproben sollten unter keimfreien Bedingungen mit Standardverfahren entnommen werden. Die Proben sollten sofort getestet oder bei 4°C oder auf Eis bis zur Durchführung des Assays gelagert werden. Die kurzzeitige Aufbewahrung auf Eis sollte jedoch einen Zeitraum von vier Stunden nicht überschreiten.

Für eine Lagerung über einen längeren Zeitraum sollte das Serum oder das Plasma bei –70°C oder tiefer innerhalb von zwei Stunden nach der Entnahme eingefroren werden.

Eingefrorene Proben ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) in einem 37°C warmen Wasserbad schnell auftauen. Die aufgetauten Proben sofort auf Eis legen (nicht länger als vier Stunden), um eine Komplementaktivierung vor der Verdünnung zu verhindern. **Die Proben nicht bei 37°C liegen lassen.** Die Proben nicht bei Raumtemperatur oder 4°C auftauen, da dies zur Komplementaktivierung führen kann. Eingefrorene Proben sollten so schnell wie möglich nach dem Auftauen getestet werden. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen wird nicht empfohlen. Wenn Proben für weitere Analysen wieder eingefroren werden müssen, empfiehlt Quidel, die Proben in mehrere Aliquote eingeteilt einzufrieren, um ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen zu vermeiden.

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. **HINWEIS: Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassayplatte verwenden.**
 - b. Die Vertiefungen eine Minute lang bei 15°C bis 25°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. 100 μL des Probenverdünnungsmittels, der rekonstituierten Standardlösungen, Kontrollen oder verdünnten Proben in die zugeteilten Vertiefungen geben.
4. Bei 15°C bis 25°C für 30 ± 1 Minuten inkubieren.
5. 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. **HINWEIS: Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassayplatte verwenden.**

- c. Die Vertiefungen 1 Minute lang bei 15°C bis 25°C inkubieren.
- d. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
- e. Etwa 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung füllen.
- f. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
- g. Die Schritte e-f dreimal wiederholen.**
- h. Nach dem fünften Waschzyklus die Platte umdrehen und kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
6. Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette 50 µL des Bb-Konjugats in die gewaschenen Testvertiefungen und Blindvertiefung(en) geben.
7. Die Mikroassay-Teststreifen bei 15°C bis 25°C für 30 ± 1 Minuten inkubieren.
8. Die Mikroassay-Vertiefungen nach der 30 Minuten dauernden Inkubation (Schritt 7) wie unter *TESTVERFAHREN* Schritt 5 beschrieben waschen. **HINWEIS: Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassayplatte verwenden.**
9. Unmittelbar nach dem Waschschrift je 100 µL der TMB-Substratlösung in jede Vertiefung, inklusive der Blindvertiefung(en), geben. **HINWEIS: Das TMB-Substrat muss während der Lagerung und des Inkubierens vor Licht geschützt werden. Das TMB-Substrat darf vor dem Dispensieren in die Mikroassay-Vertiefungen nicht in ein Reagenzreservoir oder eine andere Vorrichtung gegeben werden, wo eine Lichtexposition vorkommen kann.**
10. Die Mikroassay-Teststreifen bei 15°C bis 25°C für 15 ± 1 Minuten im Dunkeln inkubieren.
11. 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.
12. Die Platte auf dem Labortisch vorsichtig antippen, damit sich die Farbentwicklung vollständig und gleichmäßig verteilt.
13. Innerhalb von einer Stunde nach der Zugabe der Stopplösung (Schritt 11) die Extinktion für jede Testvertiefung bei 450 nm bestimmen und je nach verwendetem Spektrophotometer eine Blindwertkorrektur vornehmen.
14. 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. Die mitgelieferten Werte für die optische Dichte sind nur als Richtlinie gedacht. Die in Ihrem Labor gemessenen Ergebnisse können abweichen.

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.

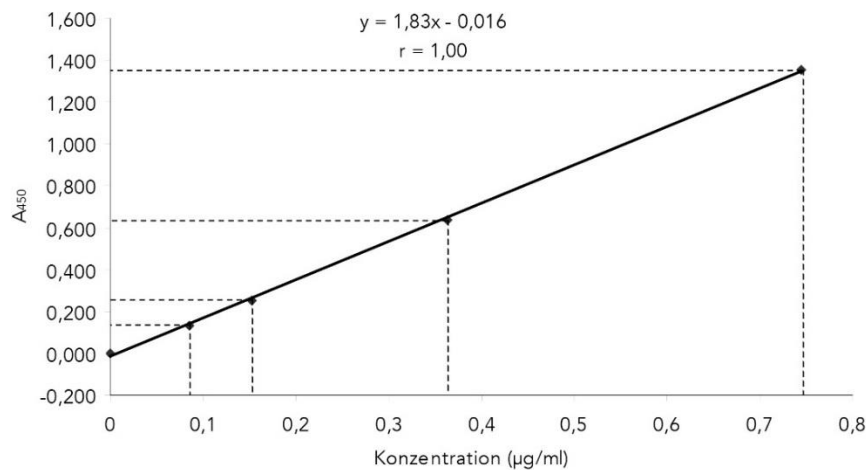
AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Erstellung der Standardkurve

Die Standardkurve für den Bb 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 (µg/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



Berechnung der tatsächlichen Bb-Konzentration in den Testproben

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

Wenn die A₄₅₀-Werte einer bestimmten Testprobe höher sind als die des höchsten Kit-Standards (E), sollten die Ergebnisse als „größer als“ die Bb-Konzentration des höchsten Kit-Standards (E) multipliziert mit dem Probenverdünnungsfaktor vermerkt werden. Wenn ein genauerer Wert der Bb-Menge erforderlich ist, sollte die Testprobe unter Verwendung eines höheren Verdünnungsfaktors nochmals getestet werden. Bei allen Wiederholungstests müssen auch die Bb-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): > 0,96

Steigung (m): zwischen 1,094 und 2,558

y-Schnittpunkt (b): zwischen (–)0,145 und 0,113

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

GRENZEN DER METHODE

Der MicroVue Bb Plus Enzymimmunassay wurde verwendet, um Serum- oder EDTA-Plasmaproben zu untersuchen. Heparinisiertes Plasma ist für diesen Test NICHT geeignet. Andere Antikoagulanzen wurden nicht getestet.

LEISTUNGSMERKMALE DES TESTS

Grenzwerte

LOD: Die Nachweisgrenze (LOD) für den Bb Plus Assay beträgt 0,018 µg/ml, sie wurde im Rahmen einer Nullstandard-Präzisionsstudie an der 3fachen Standardabweichung festgelegt.

LLOQ: Die untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) für den Bb Plus Assay liegt bei 0,033 µg/ml, die niedrigste Konzentration aus der Standardkurve, die den Kriterien für Fehlerfreiheit und Präzision des NCCLS (Nationales Komitee für klinische Laborstandards) entspricht.

ULOQ: Die obere Bestimmungsgrenze (ULOQ) für den Bb Plus Assay liegt bei 0,836 µg/ml, die höchste Konzentration, die den Kriterien für Fehlerfreiheit und Präzision des NCCLS (Nationales Komitee für klinische Laborstandards) entspricht.

Störsubstanzen

Eine Na+Heparin-Konzentration von 14 U/ml (entspricht der Konzentration von Heparin-Plasmaröhrchen) beeinträchtigt den Bb Plus Assay und wird deshalb zur Verwendung als Plasma-Antikoagulant für die Probennahme nicht empfohlen.

Die folgenden Substanzen wurden mit den angegebenen Konzentrationen in dem Bb Plus Assay getestet und sie stellten keine Störung für diesen Assay dar.

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

Präzision

Die Präzision „in der Serie“ und „von Serie zu Serie“ wurde für 20 Replikate von 2 Plasmaproben und 2 Serumproben in 10 verschiedenen Testserien ermittelt.

Probe	Bb (µg/ml)	In der Serie ¹ C.V. (%)	Von Serie zu Serie ² C.V. (%)
EDTA Plasma	1,550	2,4	7,7
	0,517	2,5	6,7
Serum	2,129	3,1	6,2
	2,375	4,0	9,1

¹n = 20 replicate ²n = 10 testserien

Linearität

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

Probe	Verdünnungsfaktor	Gefunden Bb (µg/ml)	Erwartet Bb (µg/ml)	Wiedergewinnung (%)
EDTA Plasma	1:10	0,160	*	*
	1:16	0,107	0,100	106,9%
	1:20	0,079	0,080	98,7%
	1:32	0,052	0,050	103,9%
Serum 1	1:20	0,161	*	*
	1:32	0,103	0,101	102,0%
	1:40	0,069	0,081	85,4%
	1:64	0,044	0,050	87,2%
Serum 2	1:20	0,597	*	*
	1:25	0,467	0,478	97,7%
	1:30	0,420	0,398	105,4%
	1:40	0,310	0,299	103,8%
	1:50	0,230	0,239	96,2%
	1:60	0,196	0,199	98,4%
	1:80	0,133	0,149	89,0%

Probenwerte

Das EDTA-Plasma von sechszunddreißig (36) und das Serum von neunundvierzig (49) normalen Spendern wurden mit dem MicroVue Bb Plus Fragment Enzymimmunoassay getestet. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

	n	Mittelwert (µg/ml)	BEREICH (µg/ml)	
			± 2 SD	± 3 SD
EDTA Plasma	36	0,96	0,49-1,42	0,26-1,65
Serum	49	3,53	0,80-6,26	0,0-7,62

Achtung: Der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) für die Bb-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 Bb-Fragmentkonzentration und eigene Werte für die Standardabweichung von Proben erstellt.

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 www.quidel.com.

LITERATURVERWEISE

- Schreiber, R.D. and Müller-Eberhard, H.J. 1980. New developments in the activation of the alternative pathway of complement. In: *Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980's*. Alan R. Liss, Inc., New York. p.411.
- Gotze, O. and Müller-Eberhard, H.J. 1976. The alternative pathway of complement activation. *Adv. Immunol.* 24:1.

3. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1980. Current concepts in immunology: the alternative pathway of complement – a system for host resistance to microbial infection. *New Engl. J. Med.* 303: 259
4. Pangburn, M.K. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol* 7:163.
5. Ratnoff, W.E., Fearon, D.T., and Austen, K.F. 1983. The role of antibody in the activation of the alternative complement pathway. *Springer Semin Immunopathol* 6:361.
6. Hugli, T.E. 1986. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *Complement* 3:111
7. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1977. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 74:1 1683.
8. Fearon, D.T. 1979. Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 76: 5867.
9. Fishelson, Z. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. Residual hemolytic and proteolytic activity expressed by Bb after decay-dissociation of C3b,Bb. *J. Immunol.* 132:1425.
10. Gotze, O., Bianco, C. and Cohn, Z.A. 1979. The induction of macrophage spreading by Factor B of the properdin system. *J. Exe. Med.* 149:372.
11. Sundsmo, J.S. and Wood, L.M. 1981. Activated factor B(Bb) of the alternative pathway of complement activation cleaves and activates plasminogen. *J. Immunol.* 127:877.
12. Kolb, W.P., Morrow, P.R. and Tamerius, J.D. 1989. Ba and Bb Fragments of Factor B activation: Fragment production, biological activities, neoepitope expression and quantitation in clinical samples. *Complement and Inflammation* 6:175.
13. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
14. Sefton, M.V., et al. 1994. "Using ELISA to evaluate complement activation by reference biomaterials" *J. Mat. Sci* 5:622-627,.
15. Mold, C. Tamerius, J.D., et al. 1995 "Complement activation during painful crisis in sickle cell anemia" *Clinical Immunology and Immunopathology* 70:3,314-320.
16. Manzi, S. Rairie, J. et al. 1996 "Sensitivity and Specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity" *Arthritis and Rheumatism* 39(7)1178-1188.
17. J.Jarvis, Taylor, H. 1994. "Complement activation and immune complexes in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis: a longitudinal study" *J Rheumatology* 21(6) 1124-1127.
18. Aggarwaal, et al. 2000." Evidence for activation of the alternative complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis" *Rheumatology* 39:189-192.
19. J. Buyon, Tamerius J. et al.1992. "Assessment of Disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus" *Arthritis and Rheumatism* 35(9) 1028-1036.
20. D. Shaw, Rustagi, P. et al. 1997. "Effects of Synthetic Oligonucleotides on human complement and coagulation" *Biochemical Pharmacol* 53(8)1123-1132.
21. Mollnes. T.E., et al. 1999. "Complement activation in patients with systemic lupus erythematosus without nephritis" *Rheumatology* 38:933-940.
22. Sturfelt, G, Truedsson, L. 2005. "Complement and its breakdown products in SLE" *Rheumatology* 44:1227-1232.
23. Alexander, J.J. et al. 2005. "Complement-dependent apoptosis and inflammatory gene changes in murine lupus cebritis" *J. Immunology* 175:8312-8319.
24. Thurman, J., Holers, V.M. 2006. "The central role of the alternative pathway in human disease" *J. Immunology* 176:1305-1310.
25. Pawluczkowycz, A.W et al. 2007. "Hematin promotes complement alternative pathway-mediated deposition of C3 activation fragments on human erythrocytes: potential implications for the pathogenesis of anemia in malaria" *J. Immunology* 179:5543-5552.
26. Atkinson, C. et al. 2008. "Low-dose targeted complement inhibition protects against renal disease and other manifestations of autoimmune disease in MRL/lpr mice" *J. Immunology* 180:1231-1238.



A027 – MicroVue Bb Plus Fragment EIA Kit



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA027002DE00 (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

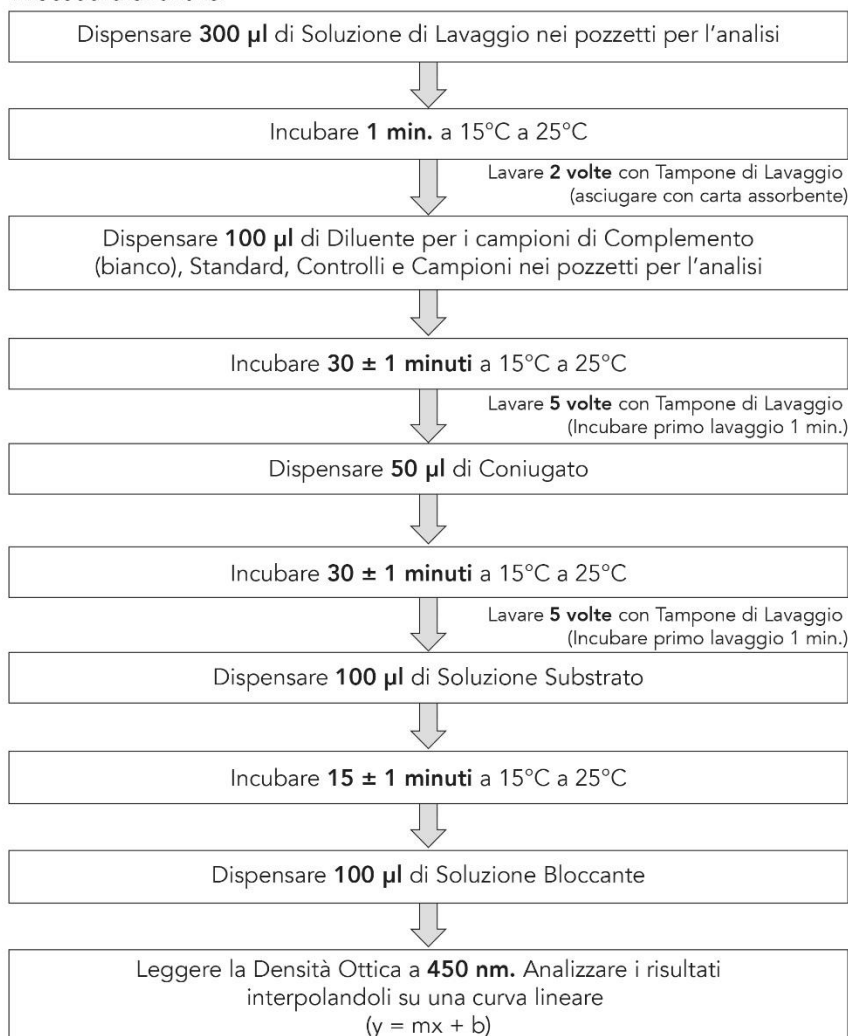
Dosaggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa del frammento Bb del Fattore B, un indicatore dell'attivazione della via alternativa del complemento nel plasma o siero umano

SOMMARIO

Preparazione di Reagenti, Standard, Controlli e campioni

- ☐ Diluire il Tampone di Lavaggio Concentrato 1:20 con acqua DI
- ☐ Ricostituire ogni Standard e Controllo con 1.0 ml di Agente Idratante *(lasciare agire 15 minuti e miscelare delicatamente prima di usare)*
- ☐ Diluire i campioni di plasma 1:10 con il Diluente per i campioni di Complemento (es. 50 µl + 450 µl) *(dispensare nei pozzetti entro 30 minuti)*
- ☐ Diluire i campioni di siero 1:20 con i campioni di complemento (es. 25 µl + 475 µl) *(dispensare nei pozzetti entro 30 minuti)*

Procedura di analisi





SCOPO DEL TEST

Il kit per il dosaggio immunoenzimatico MicroVue Bb Plus misura la quantità del frammento di complemento Bb, un fattore di attivazione del Fattore B della via alternativa del complemento, in campioni di siero e plasma umano. La misurazione del frammento di complemento Bb nel siero nel plasma umani fornisce prova del coinvolgimento della via alternativa del complemento. La determinazione dell'attivazione della via alternativa aiuta nella diagnosi di varie malattie renali, per esempio la glomerulonefrite cronica, la nefrite lupica e molte altre malattie del derma, come la dermatite erpetiforme ed il pemfigo volgare. Tra le altre malattie in cui è stata riscontrata l'attivazione della via alternativa del complemento si annoverano l'artrite reumatoide, l'anemia falciforme, e le infezioni da batteri gram-negativi.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

La via alternativa del complemento fornisce una protezione congenita contro gli agenti microbici in assenza di anticorpo specifico.¹⁻⁵ Vi sono varie sostanze che innescano l'attivazione della via del complemento, tra cui i polisaccaridi microbici o i lipidi, i lipopolisaccaridi batterici gram-negativi, ed i determinanti di superficie presenti su alcuni virus, parassiti, cellule di mammiferi con infezione virale e cellule cancerose. Nelle malattie autoimmuni, la via alternativa del complemento può contribuire direttamente al danneggiamento tissutale.

Una reazione di importanza fondamentale che si verifica durante l'attivazione della via alternativa è la conversione dello zimogeno Fattore B del peso molecolare 93 Kd in un enzima proteolitico attivo. Ciò viene conseguito tramite una reazione a due fasi. Durante la prima fase di reazione il Fattore B forma un complesso magnesio dipendente con il fattore C3(H₂O) o C3b.⁴ Il complesso C3(H₂O),B si forma solo nella fase fluida mentre il complesso C3b,B può formarsi nella fase liquida o su una superficie target.¹⁻⁴ Il Fattore B, che è presente nel complesso C3(H₂O),B o C3b,B viene scisso nei frammenti Ba (33 Kd) e Bb (60 Kd) nella seconda fase della reazione dall'enzima della via alternativa, il Fattore Factor D.¹⁻⁴ Il complesso biomolecolare risultante C3b, Bb è l'enzima C3 convertasi della via alternativa. La sottounità Bb è il sito cataliticamente attivo del complesso che è in grado di scindere il fattore C3 nei frammenti C3a e C3b.^{1-4,6} I frammenti C3b addizionali prodotti in tal modo possono formare il complesso trimolecolare C3b,Bb,C3b che è l'enzima C5 convertasi della via alternativa. L'enzima C5 convertasi è in grado di scindere il fattore C5 nei frammenti C5a e C5b.^{1-4,6}

Le C3 e C5 convertasi della via alternativa possono essere stabilizzate dal Fattore P (chiamato anche Properdina), un componente della via alternativa normalmente presente nel plasma o siero umani¹⁻⁴ o dal fattore nefritico C3, un autoanticorpo prodotto in alcuni pazienti soggetti ad attivazione massiccia della via alternativa.⁵ Le C3 e C5 convertasi della via alternativa possono essere dissociate, e quindi disattivate, tramite dissociazione con decadimento spontaneo,⁷ o tramite il legame del Fattore H o Recettore del Complemento 1 (CR1).^{4,8} Il frammento Bb che viene dissociato da una delle convertasi conserva alcune attività biologiche, per esempio la l'attività emolitica funzionale,^{4,9} la capacità di indurre la diffusione dei macrofagi¹⁰ e l'attivazione del plasminogeno.¹¹

Benché si ritenga che l'attivazione della via alternativa avvenga principalmente in assenza di anticorpo specifico, si verificano molte situazioni in cui l'attivazione della via alternativa avviene come conseguenza dell'attivazione della via classica. Per esempio, i complessi immuni che sono presenti nei pazienti affetti da malattie autoimmuni possono far scattare l'attivazione della via classica del complemento con la risultante produzione di frammenti C3b. Come descritto sopra, queste molecole C3b sono in grado di legare il Fattore B ed iniziare il suo clivaggio nei frammenti Ba e Bb. In questo modo l'attivazione della via alternativa può avvenire in stati di malattia autoimmune anticorpo mediata e può contribuire significativamente al potenziamento dell'attivazione del complemento e alla concomitante distruzione tissutale.

Determinando i prodotti del clivaggio del Fattore B nei campioni di test, è possibile stimare l'entità dell'utilizzo della via alternativa in corso al momento della raccolta del campione nello stato patologico in esame. L'immunosaggio enzimatico (EIA) MicroVue Bb Plus fornisce una procedura semplice, rapida, non-radioattiva, altamente specifica e quantitativa per misurare l'attivazione del Fattore B. E' ideale per ricerche concernenti il ruolo o status della via alternativa del complemento in numerosi setting di ricerca e clinici, e per monitorare la generazione del frammento di complemento Bb *in vitro*.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il saggio immunoenzimatico (EIA) MicroVue Bb Plus per la quantificazione del frammento di complemento Bb nel siero e plasma umani o altri campioni è una procedura in tre fasi che utilizza (1) una micro piastra rivestita di anticorpo monoclonale di topo che si lega specificatamente al frammento di complemento Bb umano, (2) un anticorpo di topo anti-frammento di complemento Bb umano HRP-coniugato, e (3) un substrato cromogeno.

Nella prima fase, gli Standard, i Controlli ed i campioni di test vengono aggiunti ai micropozzetti rivestiti con un anticorpo monoclonale specifico anti-Bb. Il frammento di complemento Bb, ma non il Fattore B o altri prodotti dell'attivazione del complemento, presente negli Standard, Controlli, o campioni si legherà all'anticorpo monoclonale immobilizzato anti-Bb. Dopo l'incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove il materiale che non si è legato.

Nella seconda fase, viene aggiunto un anticorpo di topo anti-frammento del complemento Bb HRP-coniugato (rafano perossidasi) ad ogni pozzetto di test. L'anti-Bb enzima coniugato con enzima si lega al frammento di complemento Bb catturato nei micropozzetti. Dopo l'incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove il coniugato in eccesso che non si è legato.

Nella terza fase viene aggiunto un substrato enzimatico cromogeno ad ogni micropozzetto. L'HRP immobilizzato reagisce con il substrato, sviluppando una colorazione azzurra. Dopo l'incubazione la reazione enzimatica viene fermata chimicamente, il colore vira al giallo, e l'intensità del colore viene misurata spettrofotometricamente a 450 nm. L'intensità del colore della miscela di reazione è proporzionale alla concentrazione di frammento del complemento Bb presente nei campioni, negli Standard e nei Controlli.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

96 test per la determinazione del il frammento Bb del Fattore B

Il kit per dosaggio immunoenzimatico MicroVue Bb Plus contiene:

- | | | |
|--|---------------------------|------------------------|
| A Bb Plus Standard | Codici A9948-A9952 | 1 ml ciascuno |
| B (liofilizzato) Ciascuno contiene una concentrazione nota di Bb in siero umano diluita in PBS, | | |
| C stabilizzatori proteici, 0,035% ProClin® 300 | | |
| D | | |
| E | | |
| L Bb Plus Controllo Basso | Codice A9953 | 1 ml |
| (liofilizzato). Contiene una concentrazione nota di Bb in siero umano diluita in PBS, stabilizzatori proteici, 0,035% ProClin 300 | | |
| H Bb Plus Controllo Alto | Codice A9955 | 1 ml |
| (liofilizzato) Contiene una concentrazione nota di Bb in siero umano diluita in PBS, stabilizzatori proteici, 0,035% ProClin 300 | | |
| 1 Micropiastra | Codice A9559 | 12 x 8 pozzetti |
| 12 strisce da 8 pozzetti rivestiti con un anticorpo monoclonale di topo purificato specifico per il frammento Bb umano in Busta di alluminio risigillabile | | |

2	Soluzione Bloccante Contiene 1N acido cloridrico	Codice A9947	12 ml
3	20X Soluzione di Lavaggio Concentrato Contiene soluzione salina tampone fosfato (PBS), 1,0% Tween-20®, e 0,035% ProClin 300	Codice A9957	50 ml
4	Diluente per Campioni di Complemento Contiene PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% stabilizzatori proteici, 0,035% ProClin 300	Codice A3670	50 ml
5	TMB Substrato Contiene 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) e Perossido di Idrogeno (H ₂ O ₂)	Codice 5059	12 ml
6	Bb Plus Coniugato Contiene anticorpo di topo anti- Bb umano coniugato con rafano perossidasi in tampone stabilizzante HRP con conservante	Codice A9956	7 ml
8	Reagente reidratante Contiene 0,035% ProClin 300	Codice A3675	25 ml

Tween-20® è un marchio registrato di ICI Americas Inc.
ProClin® è un marchio registrato di Rohm and Haas Company.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Timer (da 60 minuti)
- Calcolatore o altro metodo computazionale
- Micropiastre pulite e non usate e/o provette e portaprovette
- Contenitore per la diluizione del tampone di lavaggio
- Flacone di lavaggio o altro sistema di lavaggio per micropiastre
- Pipetta multicanale regolabile (8 o 12 canali) o micropipette a ripetizione (facoltativo)
- Pipette pulite da 1 ml, 5 ml, e 10 ml
- Micropipette e puntali
- Lettore di micro piastre in grado di effettuare letture di densità ottica tra 0,0 e 2,0
- Acqua deionizzata o distillata

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per r uso diagnostico *In vitro*.
- L'uso di plasma eparina in questo saggio può dare risultati errati.
- Trattare i campioni come materiale potenzialmente bio-pericoloso. Seguire le Precauzioni Universali durante la manipolazione del contenuto di questo kit e di qualsiasi campione di pazienti.
- Non mescolare reagenti di lotti diversi ed utilizzare i reagenti forniti prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.
- Conservare i reagenti come indicato.
- Non usare le strisce rivestite se la busta è forata.
- Durante l'aggiunta o aspirazione di liquidi dai micropozzetti, non raschiare o toccare il fondo dei pozzetti.
- Usare tempi e temperature di incubazione diversi da quanto indicato nel paragrafo Procedura può causare risultati errati.
- Non fare asciugare i micropozzetti durante l'analisi.
- Non usare un micropozzetto per più di un test.
- Si raccomanda l'uso di pipette multicanale o pipette a ripetizione per assicurare la dispensazione tempestiva dei reagenti.
- Per una misurazione accurata dei campioni, aggiungere campioni e standard in modo preciso. Dispensare con cautela usando solo strumentazione calibrata.
- La raccolta e conservazione adeguate dei campioni di test sono essenziali per risultati accurati (cfr. *RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI*, pag 4).

- Evitare la contaminazione microbica o crociata di campioni, reagenti o materiali poiché può causare risultati errati.
- Ogni campione da donatore utilizzato nella preparazione degli Standards e dei sieri di Controllo è stato testato tramite un metodo approvato dalla FDA per rilevare l'eventuale presenza di anticorpo al virus di immunodeficienza acquisita umana (HIV 1 and 2) e del virus dell'epatite C, oltre all'antigene superficiale dell'epatite B, con risultati negativi (assenza di reazione ripetuta). Tuttavia, poiché nessun metodo di test può garantire completamente l'assenza di agenti infettivi, questi reagenti dovrebbero venire manipolati al Livello di Biosicurezza 2 come raccomandato per qualsiasi campione umano di siero o sangue nel manuale dei Centers for Disease Control/National Institutes of Health intitolato "Biosafety in Micro-biological and Biomedical Laboratories" 2007.
- Il ProClin 300 viene usato come conservante. Il contatto accidentale o l'ingestione di tamponi o reagenti contenenti ProClin può causare irritazione cutanea, oculare o orale. Usare le buone pratiche di laboratorio per ridurre l'esposizione. Rivolgersi ad un medico in caso di sintomi.
- Il Substrato concentrato è sensibile alla luce. Evitare l'esposizione prolungata alla luce forte o diretta. Conservare i reagenti al buio quando non vengono utilizzati.
- Per evitare la formazione di gas durante il lavaggio, usare un apparato per aspirare il fluido di lavaggio in un flacone contenente candeggina domestica.
- Dei campioni inattivati a caldo, iperlipemici o contaminati possono fornire risultati errati.
- **Utilizzare una spruzzetta per lavare la piastra. Per ottenere i risultati migliori, non utilizzare una pipetta multicanale per lavare la micropiastra.**
- I test devono essere effettuati in un'area dotata di ventilazione adeguata.
- Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con la normativa nazionale e locale in vigore.
- Indossare indumenti protettivi, guanti, e protezione occhio/viso durante l'utilizzo del kit.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo la manipolazione.
- Per ulteriori informazioni su simboli di pericolo, sicurezza, manipolazione e smaltimento dei componenti di questo kit, consultare la scheda di sicurezza (SDS) reperibile su quidel.com.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti e materiali a 15°C a 25°C prima dell'uso.

Dopo aver prelevato i reagenti ed i materiali necessari, riporre quanto inutilizzato alla temperatura adeguata (cfr. *CONSERVAZIONE*).

Strisce Rivestite

Determinare il numero di strisce necessarie per l'analisi. Alloggiare le strisce da utilizzare nella micropiastra. Rimettere le strisce non necessarie nella busta richiudibile, sigillarla e conservare a 2°C a 8°C.

Soluzione di Lavaggio

Preparare la soluzione di lavaggio per il lavaggio dei micropozzetti diluendo 50 ml di soluzione di lavaggio concentrata 20X fino a raggiungere una volume finale di un litro con acqua distillata o deionizzata. Miscelare accuratamente prima dell'uso. La soluzione di lavaggio è stabile per 30 giorni se conservata in un contenitore pulito a 2°C a 8°C. Se si riscontra torbidezza gettare il reagente.

Ricostituzione Standard e Controllo Bb Plus

Aggiungere 1,0 ml di reagente reidratante ad ogni fiala di Standard (A-E), al Controllo basso e al Controllo alto. Far reidratare le fiale ricostituite per almeno 15 minuti a temperatura ambiente. Miscelare accuratamente. Evitare la formazione di schiuma o bolle durante la miscelazione. Gli standard ed i controlli ricostituiti sono stabili per 30 giorni se conservati a 2°C a 8°C.

Diluizione del Campione

Attenzione: Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Non usare campioni inattivati a caldo o contaminati.

Nell'esecuzione del dosaggio si raccomanda di diluire i campioni di plasma 1:10 nel diluente per campioni. Si raccomanda di diluire i campioni di siero 1:20 in diluente per campioni. Una volta diluiti, i campioni devono essere aggiunti nei micropozzetti entro 30 minuti. Non conservare o riutilizzare i campioni diluiti. Gettare eventuali campioni avanzati.

I campioni con livelli elevati di attivazione del complemento potrebbero necessitare di diluizioni del campione maggiore rispetto a quanto indicato.

Dispensazione dei campioni diluiti nei pozzetti di microtitolazione

Può essere usato uno dei due metodi per la dispensazione di campioni diluiti, Standards, Controlli e tampone nei pozzetti (cfr. Fase 3 della *PROCEDURA DI SAGGIO*). Per corse analitiche ridotte in cui vengono testati solo alcuni campioni, i campioni diluiti ed altri reagenti possono essere dispensati direttamente ai rispettivi pozzetti tramite micropipetta (100 µL/pozzetto). Differentemente, raccomandiamo l'uso di una pipetta multicanale per dispensare i campioni come segue. **(E' possibile usare una pipetta multicanale per dispensare comodamente anche il coniugato, il substrato e la soluzione bloccante).**

Al fine di dispensare gli standard, i campioni di controllo e i campioni diluiti nei micropozzetti nel modo più rapido possibile, è possibile adottare una procedura chiamata "replica plating". Invece di aggiungere individualmente 100 µL di ogni Standard, Controllo o campione diluito nei singoli pozzetti rivestiti con anticorpo, è possibile aggiungere 120–130 µL di ogni soluzione ai singoli pozzetti in una piastra vuota (non fornita) in base al tipo di saggio immunoenzimatico finale desiderato. Dopo avere aggiunto tutte le soluzioni da esaminare nei micropozzetti, trasferire rapidamente 100 µL da ogni pozzetto vuoto ai pozzetti rivestiti con anticorpo usando una pipetta multicanale. Per eliminare la possibilità di contaminazione crociata, è necessario sostituire i puntali delle pipette ogni volta che cambia la composizione dei campioni da trasferire.

CONSERVAZIONE

Conservare il kit non aperto a 2°C a 8°C. Dopo aver aperto il kit, la Soluzione di lavaggio concentrata 20X ed il reagente di reidratazione possono essere conservati a 2°C a 25°C.

Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (15°C a 25°C) prima dell'uso. Riporre tutte le strisce inutilizzate nella busta richiudibile, risigillarla e conservare a 2°C a 8°C.

INDICAZIONI DI INSTABILITA' O DETERIORAMENTO DEI REAGENTI

La torbidezza della soluzione di lavaggio indica un deterioramento di questo reagente. Se ciò si verificasse, gettare la soluzione.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Manipolare e smaltire tutti i campioni seguendo le precauzioni universali.

È essenziale eseguire correttamente le operazioni di prelievo e conservazione dei campioni in quanto il fattore Bb è suscettibile alla proteolisi nei campioni raccolti o conservati inadeguatamente.

A causa dell'attivazione del complemento durante la coagulazione, la concentrazione di Bb nei campioni di siero umano normale saranno superiori a quelli ottenuti con campioni di plasma EDTA. I livelli di Bb nel plasma possono quindi rappresentare in modo più accurato le concentrazioni *in vivo*.

I campioni di siero o plasma EDTA devono essere prelevati in modo asettico utilizzando tecniche standard. I campioni devono essere esaminati immediatamente oppure conservati a 4 °C o nel ghiaccio fino al momento dell'analisi, per un periodo comunque non superiore a quattro ore.

Per una conservazione più prolungata, il siero o il plasma devono essere congelati a -70°C o meno entro due ore dalla raccolta.

Scongelare rapidamente i campioni congelati ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) a bagnomaria a 37°C fino a che non risultano quasi scongelati. Trasferire immediatamente i campioni scongelati in ghiaccio (per non più di quattro ore) in modo da evitare l'attivazione del complemento prima della diluizione. **Non lasciare i campioni a 37°C .** Non scongelare i campioni a temperatura ambiente o a 4°C , in quanto ciò potrebbe causare l'attivazione del complemento. Dopo lo scongelamento, i campioni devono essere esaminati nel più breve tempo possibile. Non è consigliato eseguire ripetuti congelamenti e scongelamenti. Se è necessario ricongelare i campioni per ulteriori analisi, Quidel suggerisce di congelare diverse aliquote del campione, al fine di evitare più cicli di congelamento/scongelo.

PROCEDURA DI L'ANALISI

Prima di iniziare l'analisi, leggere completamente l'inserto fornito con il prodotto.

Fare riferimento alle sezioni PREPARAZIONE DEI REAGENTI e AVVERTENZE E PRECAUZIONI.

1. Registrare le posizioni dei micropozzetti corrispondenti al/i pozzetto/i vuoto/i, tutti i campioni da testare, gli standard ed i controlli nonché i numeri di lotto indicati sulle etichette delle fiale. Etichettare un angolo della micropiastra al fine di stabilirne l'orientamento.
2. Preparare le strisce come indicato di seguito:
 - a. Usando un flacone di lavaggio o un dispositivo di lavaggio automatico delle piastre dispensare circa $300\ \mu\text{L}$ di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto. **NOTA: per ottenere i risultati migliori, non utilizzare una pipetta multicanale per lavare la micropiastra.**
 - b. Incubare i pozzetti per un minuto a 15°C a 25°C .
 - c. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto.
 - d. Aggiungere circa $300\ \mu\text{L}$ di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto.
 - e. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto.
 - f. **Ripetere i passaggi d-e un'altra volta, per un totale di tre lavaggi.**
 - g. Capovolgere la piastra e picchiettare energicamente su carta assorbente per rimuovere eventuale liquido rimasto.
3. Aggiungere $100\ \mu\text{L}$ di diluente per campioni, standard ricostituiti, controlli o campioni diluiti nei relativi pozzetti.
4. Incubare a 15°C a 25°C per 30 ± 1 minuti.
5. Lavare i micropozzetti un totale di 5 volte seguendo questa procedura:
 - a. Aspirare il contenuto da ogni pozzetto.
 - b. Usando un flacone di lavaggio o un dispositivo di lavaggio per micropiastre dispensare circa $300\ \mu\text{L}$ di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto. **NOTA: per ottenere i risultati migliori, non utilizzare una pipetta multicanale per lavare la micropiastra.**
 - c. Incubare i pozzetti per 1 minuto a 15°C a 25°C .
 - d. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto.
 - e. Aggiungere circa $300\ \mu\text{L}$ di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto.
 - f. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto
 - g. **Ripetere i passaggi e-f altre tre volte.**
 - h. Dopo il quinto ciclo di lavaggio, capovolgere la piastra e picchiettare energicamente su carta assorbente per rimuovere l'eventuale liquido rimasto.
6. Usando una pipetta multicanale o a ripetizione, dispensare $50\ \mu\text{L}$ di coniugato Bb in ogni pozzetto di test lavato, incluso/i il/i pozzetto/i vuoto/i.
7. Incubare le strisce a 15°C a 25°C per 30 ± 1 minuti.
8. Lavare i micropozzetti dopo l'incubazione di 30 minuti (passaggio 7), come descritto nella *PROCEDURA DI ANALISI*, passaggio 5. **NOTA: per ottenere i risultati migliori, non utilizzare una pipetta multicanale per lavare la micropiastra.**
9. Immediatamente dopo la procedura di lavaggio dispensare $100\ \mu\text{L}$ della soluzione per substrato TMB in ogni pozzetto, incluso/i il/i pozzetto/i vuoto/i. **NOTA: il substrato TMB deve essere protetto dalla**

luce durante la conservazione e l'incubazione. Il substrato TMB non deve essere dispensato in un serbatoio per reagenti o altri apparati potenzialmente esposti alla luce fino al momento di dispensarlo nei micropozzetti.

10. Incubare le strisce a 15°C a 25°C per 15 ± 1 minuti al buio.
11. Aggiungere 100 µL di soluzione bloccante ad ogni pozzo per bloccare la reazione enzimatica. La soluzione bloccante dovrebbe essere aggiunta ai pozzetti nello stesso ordine rispetto alla soluzione substrato.
12. Picchiettare delicatamente la piastra sulla parte superiore del banco per permettere alla colorazione di svilupparsi uniformemente.
13. Leggere l'assorbanza a 450 nm entro un'ora dall'aggiunta di soluzione bloccante (passaggio 11), effettuando le dovute correzioni secondo il sistema spettrofotometrico in uso.
14. Gettare i campioni diluiti, i controlli, il substrato e le strisce rimanenti (cfr **AVVERTENZE E PRECAUZIONI**).

CONTROLLO QUALITÀ

Il Certificato di Analisi fornito con questo kit è specifico per ciascun lotto e deve essere usato per verificare che i risultati ottenuti dal proprio laboratorio siano simili a quelli ottenuti presso Quidel Corporation. I valori di densità ottica forniti sono solo linee guida. I risultati ottenuti dal vostro laboratorio possono differire.

Vengono forniti i valori dei controlli. I valori dei controlli devono essere utilizzati per verificare la validità della curva e i risultati del campione. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca i propri parametri di riferimento limiti di accettazione del saggio. Se i valori dei controlli NON sono all'interno dei parametri stabiliti dal proprio laboratorio, i risultati dell'analisi devono essere considerati discutibili e si dovranno replicare i campioni. Una buona pratica di laboratorio consiglia l'uso di controlli per garantire l'esecuzione adeguata dell'analisi.

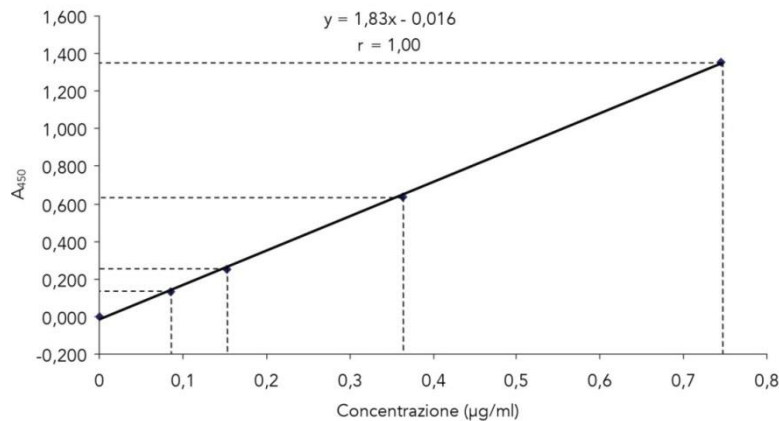
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Uso della curva standard

La curva standard per il saggio immunoenzimatico Bb viene generata interpolando i valori A_{450} da cui sono stati sottratti a quelli del bianco di ogni standard (lungo l'asse y) e la concentrazione di ciascuno standard (lungo l'asse x). Al termine della regressione lineare, la curva standard generata deve soddisfare i requisiti di convalida (vedere di seguito). La maggior parte dei computer e delle calcolatrici è in grado di eseguire tali calcoli.

In alternativa, i dati possono essere tracciati manualmente ed i valori (µg/ml) dei campioni possono essere letti direttamente dalla linea best-fit della curva standard. Un esempio di curva standard tipica è mostrato in Figura 1.

Figura 1.
Curva standard rappresentativa



Calcolo della concentrazione Bb effettiva in campioni di test

La concentrazione effettiva di Bb in ogni campione diluito viene determinata moltiplicando la concentrazione Bb/ml, determinata dalla curva standard del kit, per il reciproco del fattore della diluizione del campione utilizzato.

Se i valori A_{450} per un dato campione sono maggiori di quello dello standard più alto di Bb (E), i risultati devono essere riportati come “maggiori della” concentrazione Bb dello standard più alto (E) moltiplicato per il fattore di diluizione del campione. Se è necessario un valore di concentrazione di Bb più accurato, il campione deve essere ri-analizzato usando un fattore di diluizione maggiore. In tutte le replicazioni è necessario eseguire anche gli standard ed i controlli del kit Bb.

CONVALIDA

Determinare la pendenza, l'intersezione e il coefficiente di correlazione della linea best-fit ottenuta. I valori devono essere compresi negli intervalli specificati:

coefficiente di correlazione (r): > 0,96
pendenza (m): tra 1,094 e 2,558
intersezione y (b): tra (-)0,145 e 0,113

Fare riferimento alle etichette dei flaconi o al prodotto C di A per i valori medi accettabili di concentrazione Bb per i controlli alto e basso.

LIMITI

Il dosaggio immunoenzimatico per la determinazione del frammento Bb prodotto da Quidel è stato utilizzato per esaminare campioni di siero o plasma EDTA. Il plasma eparina NON è adatto per questo dosaggio. Altri anticoagulanti non sono stati testati.

PRESTAZIONI DEL TEST

Limiti

LOD: il limite di rilevamento (LOD) del saggio Bb Plus è 0,018 µg/ml, determinato dalle 3 deviazioni standard più alte in uno studio su standard zero.

LLOQ: Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) per il saggio Bb Plus è 0,033 µg/ml, la concentrazione minore sulla curva standard che ha soddisfatto i criteri NCCLS di accuratezza e precisione.

ULOQ: Il limite superiore di quantificazione (ULOQ) per il saggio è 0,836 µg/ml, la concentrazione maggiore sulla curva standard che ha soddisfatto i criteri NCCLS di accuratezza e precisione.

Sostanze interferenti

Na⁺ eparina a 14 U/ml (la concentrazione coerente con le provette di raccolta del plasma eparina) interferisce con il saggio Bb Plus e pertanto non è consigliato l'uso di campioni plasma con anticoagulante.

Le seguenti sostanze sono state testate alle concentrazioni specificate e non hanno mostrato interferenze con il dosaggio:

Sostanza	Concentrazione
Bilirubina	40 mg/dl
Emoglobina	500 mg/dl
Trigliceridi	3000 mg/dl
Albumina	6000 mg/dl
Glucosio	1200 mg/dl
Colesterolo	500 mg/dl

Precisione

La precisione all'interno di una corsa e tra diverse corse è stata determinata esaminando 20 replicati di 2 campioni di plasma e 2 campioni di siero in 10 diverse corse.

Campione	Bb (µg/ml)	In una stessa corsa ¹ C.V. (%)	Tra diverse corse ² C.V. (%)
EDTA Plasma	1,550	2,4	7,7
	0,517	2,5	6,7
Siero	2,129	3,1	6,2
	2,375	4,0	9,1

¹n = 20 replicati ²n = 10 corse

Linearità

La linearità è stata valutata con diluizioni seriali confrontando i valori riscontrati con i valori attesi. Nella seguente tabella vengono forniti i risultati tipici.

Campione	Fattore di diluizione	Riscontrato Bb (µg/ml)	Atteso Bb (µg/ml)	Recupero (%)
EDTA Plasma	1:10	0,160	*	*
	1:16	0,107	0,100	106,9%
	1:20	0,079	0,080	98,7%
	1:32	0,052	0,050	103,9%
Siero 1	1:20	0,161	*	*
	1:32	0,103	0,101	102,0%
	1:40	0,069	0,081	85,4%
	1:64	0,044	0,050	87,2%
Siero 2	1:20	0,597	*	*
	1:25	0,467	0,478	97,7%
	1:30	0,420	0,398	105,4%
	1:40	0,310	0,299	103,8%
	1:50	0,230	0,239	96,2%
	1:60	0,196	0,199	98,4%
	1:80	0,133	0,149	89,0%

VALORI DEI CAMPIONI

Trentasei (36) campioni di plasma EDTA e quarantanove (49) campioni di siero da donatori normali sono stati testati con il dosaggio immunoenzimatico per la determinazione del frammento Bb Plus.

	n	Media (µg/mL)	RANGE (µg/mL)	
			± 2 SD	± 3 SD
EDTA Plasma	36	0,96	0,49 e 1,42	0,26 e 1,65
Siero	49	3,53	0,80 e 6,26	0,0 e 7,62

NOTA: poiché il comportamento della deviazione media e Standard (DS) delle concentrazioni del frammento Bb determinate nei campioni di plasma o siero possono variare da laboratorio a laboratorio, è consigliabile che ogni laboratorio determini la concentrazione di frammento Bb media ed i valori di deviazione standard per i campioni.

ASSISTENZA

Per servizi al di fuori degli Stati Uniti, contattare il distributore locale. Le ulteriori informazioni circa Quidel, i nostri prodotti ed i nostri distributori possono essere trovate sul nostro Web site a quidel.com.

BIBLIOGRAFIA

1. Schreiber, R.D. and Müller-Eberhard, H.J. 1980. New developments in the activation of the alternative pathway of complement. In: *Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980's*. Alan R. Liss, Inc., New York. p.411.
2. Gotze, O. and Müller-Eberhard, H.J. 1976. The alternative pathway of complement activation. *Adv. Immunol.* 24:1.
3. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1980. Current concepts in immunology: the alternative pathway of complement – a system for host resistance to microbial infection. *New Engl. J. Med.* 303: 259
4. Pangburn, M.K. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol* 7:163.
5. Ratnoff, W.E., Fearon, D.T., and Austen, K.F. 1983. The role of antibody in the activation of the alternative complement pathway. *Springer Semin Immunopathol* 6:361.
6. Hugli, T.E. 1986. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *Complement* 3:111
7. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1977. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 74:1 1683.
8. Fearon, D.T. 1979. Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 76: 5867.
9. Fishelson, Z. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. Residual hemolytic and proteolytic activity expressed by Bb after decay-dissociation of C3b,Bb. *J. Immunol.* 132:1425.
10. Gotze, O., Bianco, C. and Cohn, Z.A. 1979. The induction of macrophage spreading by Factor B of the properdin system. *J. Exe. Med.* 149:372.
11. Sundsmo, J.S. and Wood, L.M. 1981. Activated factor B(Bb) of the alternative pathway of complement activation cleaves and activates plasminogen. *J. Immunol.* 127:877.
12. Kolb, W.P., Morrow, P.R. and Tamerius, J.D. 1989. Ba and Bb Fragments of Factor B activation: Fragment production, biological activities, neoepitope expression and quantitation in clinical samples. *Complement and Inflammation* 6:175.
13. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
14. Sefton, M.V., et al. 1994. "Using ELISA to evaluate complement activation by reference biomaterials" *J. Mat. Sci* 5:622-627,.
15. Mold, C. Tamerius, J.D., et al. 1995 "Complement activation during painful crisis in sickle cell anemia" *Clinical Immunology and Immunopathology* 70:3,314-320.

16. Manzi, S. Rairie, J. et al. 1996 "Sensitivity and Specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity" *Arthritis and Rheumatism* 39(7)1178-1188.
17. J.Jarvis, Taylor, H. 1994. "Complement activation and immune complexes in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis: a longitudinal study" *J Rheumatology* 21(6) 1124-1127.
18. Aggarwaal, et al. 2000." Evidence for activation of the alternative complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis" *Rheumatology* 39:189-192.
19. J. Buyon, Tamerius J. et al.1992. "Assessment of Disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus" *Arthritis and Rheumatism* 35(9) 1028-1036.
20. D. Shaw, Rustagi, P. et al. 1997. "Effects of Synthetic Oligonucleotides on human complement and coagulation" *Biochemical Pharmacol* 53(8)1123-1132.
21. Mollnes. T.E., et al. 1999. "Complement activation in patients with systemic lupus erythematosus without nephritis" *Rheumatology* 38:933-940.
22. Sturfelt, G, Truedsson, L. 2005. "Complement and its breakdown products in SLE" *Rheumatology* 44:1227-1232.
23. Alexander, J.J. et al. 2005. "Complement-dependent apoptosis and inflammatory gene changes in murine lupus cebritis" *J. Immunology* 175:8312-8319.
24. Thurman, J., Holers, V.M. 2006. "The central role of the alternative pathway in human disease" *J. Immunology* 176:1305-1310.
25. Pawluczkowycz, A.W et al. 2007. "Hematin promotes complement alternative pathway-mediated deposition of C3 activation fragments on human erythrocytes: potential implications for the pathogenesis of anemia in malaria" *J. Immunology* 179:5543-5552.
26. Atkinson, C. et al. 2008. "Low-dose targeted complement inhibition protects against renal disease and other manifestations of autoimmune disease in MRL/lpr mice" *J. Immunology* 180:1231-1238.

REF

A027 – MicroVue Bb Plus Fragment EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA027002IT00 (02/17)

GLOSSARIO

REF

Numero di catalogo



Marcio CE di conformità

EC REP

Rappresentante autorizzato
nella Comunità Europea

LOT

Codice lotto



Data di scadenza



Produttore



Limitazione di temperatura



Uso previsto



Leggere le istruzioni e di
etichettatura per l'uso



Rischio biologico

IVD

Per uso diagnostico *In Vitro*



Contenuto sufficiente per 96 determinazioni

CONT

Contenuto / Contiene

CONTROL

Controllo

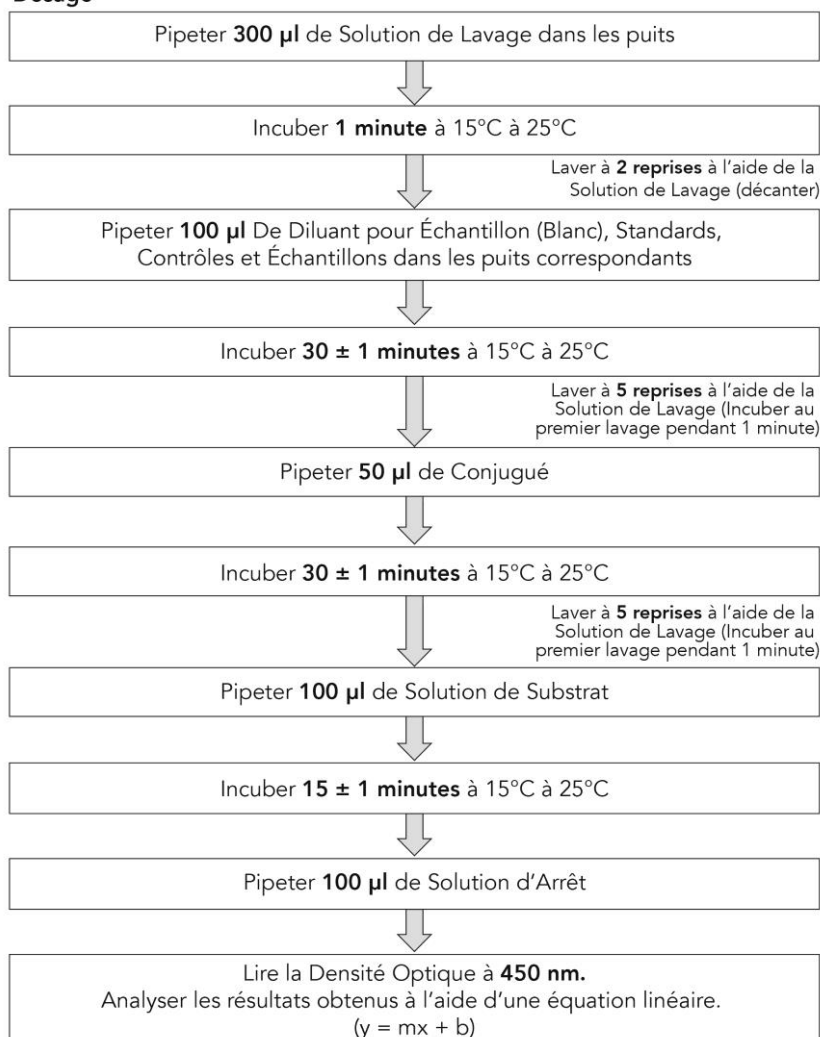
Pour la quantitation du fragment Bb du facteur B, d'un indicateur de l'activation de la voie alternative du complément, en plasma et sérum humains

RÉSUMÉ

Préparation des Réactifs, Standards, Contrôles et Échantillons

- ☐ Diluer la solution concentrée de lavage 1:20 à l'aide d'eau distillée
- ☐ Reconstituer chaque standard et contrôle à l'aide de 1.0 ml de réhydratant
(Attendre 15 minutes et bien mélanger avant utilisation)
- ☐ Diluer les Échantillons de plasma 1:10 à l'aide du diluant pour échantillon
(Par ex: 50 µl + 450 µl. Pipeter dans les puits dans les 30 minutes après dilution)
- ☐ Diluer les Échantillons de sérum 1:20 à l'aide du diluant pour échantillon
(Par ex: 25 µl + 475 µl. Pipeter dans les puits dans les 30 minutes après dilution)

Dosage





INTÉRÊT CLINIQUE

Le kit de dosage enzymatique Bb Plus de MicroVue mesure le taux de Fragment Bb du Complément, un fragment du Facteur B activateur dans la voie alternative du complément, dans le plasma ou le sérum humain. La détection de Bb dans le plasma ou le sérum met en évidence l'implication de la voie alternative du complément. La mesure de l'activation de cette voie alternative apporte une aide dans le diagnostic de plusieurs pathologies rénales (par ex: glomérulonéphrite chronique, néphrite lupique) ainsi que dans celui de plusieurs maladies de peau (par ex: dermatite herpétiforme et pemphigus vulgaire) ; on observe également l'activation de cette voie alternative dans d'autres maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'anémie falciforme et les infections bactériennes à Gram négatif.

RÉSUMÉ ET EXPLICATIONS

La voie alternative du complément procure une protection innée contre les agents microbiens, en l'absence d'anticorps spécifique.¹⁻⁵ L'activation de cette voie du complément peut être provoquée par diverses substances telles que des polysaccharides ou des lipides microbiens, des lipopolysaccharides bactériens gram-négatifs et des déterminants de surface présents sur certains virus, parasites, cellules de mammifères infectées et cellules cancéreuses. Dans les maladies auto-immunes, la voie alternative du complément peut contribuer directement à l'atteinte tissulaire.

Une importante réaction centrale survient au cours de la voie alternative du complément, c'est la conversion du Facteur B zymogène de PM 93Kd en une enzyme protéolytique active. Cette conversion s'accomplit en 2 étapes. Au cours de la 1^{ère} étape, le Facteur B forme un complexe dépendant du magnésium avec C3(H₂O) ou C3b.⁴ Le complexe C3(H₂O),B se forme seulement en phase liquide, tandis que le complexe C3b,B peut se former soit en phase liquide, soit sur une surface cible.¹⁻⁴ Le Facteur B (présent dans le complexe C3(H₂O),B ou C3b,B) est clivé en fragments Ba (33 Kd) et Bb (60 Kd) au cours de la 2^{ème} étape par une enzyme de la voie alternative, le Facteur D.¹⁻⁴ Le complexe bimoléculaire C3b,Bb qui en résulte est l'enzyme C3-convertase de la voie alternative. La sous-unité Bb est le site actif catalytique du complexe, capable de cliver C3 en fragments C3a et C3b.^{1-4,6} Les fragments C3b produits par ailleurs de cette manière peuvent former le complexe tri moléculaire C3b,Bb,C3b c'est-à-dire l'enzyme C5-convertase de la voie alternative. Cette C5-convertase est capable de cliver C5 en fragments C5a et C5b.^{1-4,6}

Les C3 et C5-convertases de la voie alternative peuvent être stabilisées par le Facteur P (appelé aussi Properdine), composé de la voie alternative normalement présent dans le sérum ou le plasma humain,¹⁻⁴ ou par le Facteur C3 néphritique, un auto-anticorps produit chez certains patients chez lesquels l'activation de la voie alternative est importante.⁵ Les C3 et C5-convertases de la voie alternative peuvent être dissociées et donc inactivées par une désintégration spontanée,⁷ ou par la fixation au Facteur H ou au Récepteur 1 du Complément (CR1).^{4,8} Le fragment Bb qui est dissocié de l'une de ces convertases conserve certaines activités biologiques, par exemple, rétention d'une activité fonctionnelle hémolytique,^{4,9} capacité à induire une prolifération des macrophages,¹⁰ et activation du plasminogène.¹¹

Bien que l'on estime que l'activation de la voie alternative advienne principalement en l'absence d'anticorps spécifique, il existe de nombreux cas d'activation de la voie alternative résultant de l'activation de la voie classique. Par exemple, les complexes immuns présents chez les patients atteints de maladies auto-immunes peuvent déclencher l'activation de la voie classique du complément, en formant des fragments C3b. Comme cela a été décrit ci-dessus, ces molécules C3b sont capables de fixer le Facteur B et d'entraîner son clivage en fragments Ba et Bb. Donc, l'activation de la voie alternative peut s'observer dans les maladies auto-immunes dues aux anticorps, et peut contribuer significativement à augmenter l'activation du complément et la destruction tissulaire concomitante.

En dosant dans les échantillons les produits issus du clivage du Facteur B, on peut estimer l'importance de l'utilisation de la voie alternative au moment du recueil de l'échantillon dans le cadre de la maladie que l'on étudie. Le dosage EIA Bb Plus de MicroVue permet une mesure simple, rapide, non radioactive, très

spécifique, et quantitative de l'activation du Facteur B. Il est idéal dans les études impliquant le rôle ou l'état de l'activation de la voie alternative du complément, dans de nombreux projets cliniques ou de recherche, et pour suivre la production de Bb *in vitro*.

PRINCIPE DU DOSAGE

Le dosage EIA Bb Plus de MicroVue pour la mesure de Bb dans le plasma humain ou le sérum est un dosage en 3 étapes qui utilise (1) une microplaque coatée par de l'anticorps monoclonal de souris spécifique du Bb humain, (2) un anticorps murin anti-Bb humain conjugué à l'HRP et, (3) un substrat chromogénique.

Dans la première étape, les Standards, Contrôles et les échantillons à doser sont ajoutés dans les micro puits pré-coatés par l'anticorps monoclonal de souris spécifique du Bb humain. Le fragment Bb présent dans les Standards, Contrôles ou échantillons se fixera sur l'anticorps monoclonal anti-Bb, mais pas le Fragment B, ni les autres produits de l'activation du complément. Après incubation, un cycle de lavage élimine le matériel non lié.

Lors de la deuxième étape, on ajoute dans tous les puits l'anticorps murin anti-Bb humain conjugué à l'HRP. L'enzyme conjuguée à l'anti-Bb se lie sur le Bb fixé précédemment sur la paroi des micro puits. Après l'incubation un cycle de lavage élimine le conjugué non lié, en excès.

Dans la troisième étape, un substrat enzymatique chromogénique est ajouté dans tous les puits. Le conjugué-HRP lié réagit avec le substrat, entraînant la formation d'une coloration bleue. Après incubation, la réaction enzymatique est stoppée chimiquement, la solution devient jaune et on peut mesurer l'intensité de la couleur par spectrophotométrie à 450 nm. L'intensité de la couleur du mélange réactionnel est proportionnelle à la concentration de Bb présent dans les échantillons, Standards et Contrôles.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL FOURNIS

96 puits pour le dosage du fragment Bb du Facteur B

Le kit de dosage enzymatique MicroVue Bb Plus contient les éléments suivants:

A Standards Bb Plus	Réf: A9948-A9952	1 ml chacun
B (lyophilisés). Chaque flacon contient une concentration connue de Bb en sérum humain dilué dans du		
C PBS, des stabilisants protéiques et 0,035% ProClin® 300.		
D		
E		
L Contrôle Faible Bb Plus	Réf: A9953	1 ml
(lyophilisé). Le flacon contient une concentration connue de Bb en sérum humain dilué dans du PBS,		
des stabilisants protéiques et 0,035% ProClin® 300		
H Contrôle Fort Bb Plus	Réf: A9955	1 ml
(lyophilisé) Le flacon contient une concentration connue de Bb en sérum humain dilué dans du PBS,		
des stabilisants protéiques et 0,035% ProClin 300		
① Barrettes de puits	Réf: A9559	12 chacun
12 x 8 puits coatés par un anticorps monoclonal de souris purifié, spécifique du Bb humain dans un		
sachet d'aluminium re-scellable		
② Solution d'Arrêt	Réf: A9947	12 ml
Contient Acide Chlorhydrique 1N		
③ Solution de lavage concentrée 20X	Réf: A9957	50 ml
Contient du tampon phosphate (PBS), 1.0% Tween-20®, et 0,035% ProClin 300		
④ Diluant pour Echantillon	Réf: A3670	50 ml
Contient du PBS, 0,05% Tween-20, 2.5% de stabilisants protéiques et 0,035% ProClin 300		

- | | | |
|----------|---|---------------------------------------|
| 5 | Substrat TMB
Contient 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) et peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) | Réf: 5059

12 ml |
| 6 | Conjugué Bb Plus
Contient un conjugué de peroxydase de raifort et d'anti-Bb humain murin en solution dans un tampon stabilisant pour la peroxydase de raifort avec conservateur | Réf: A9956

7 ml |
| 8 | Réhydratant
Contient du 0,035% ProClin 300 | Réf: A3675

25 ml |
- Tween® 20 est une marque déposée de ICI Americas Inc.
ProClin® est une marque déposée de Rohm and Haas Company.

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Minuteur (60 minutes)
- Calculateur ou logiciel pour permettre de valider le dosage
- Plaques à usage unique et/ou tubes à essais et portoirs
- Récipient pour la dilution de la Solution de Lavage
- Bouteille de lavage ou tout autre équipement de lavage
- Multipette ajustable (8 ou 12 canaux) ou pipetteur automatique (optionnel)
- Pipettes de 1 ml, 5 ml et 10 ml
- Micropipettes et embouts
- Lecteur de plaques pouvant lire des densités optiques comprises entre 0,0 et 2,0
- Eau désionisée ou distillée

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Pour utilisation *In vitro*.
- L'utilisation de Plasma hépariné dans ce dosage peut entraîner des résultats erronés.
- Traiter tous les échantillons comme des produits potentiellement dangereux. Suivre les précautions standard lors de la manipulation de cette trousse et des échantillons de patients.
- Utiliser ensemble tous les réactifs avant la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de la boîte.
- Suivre les recommandations pour la conservation des réactifs.
- Ne pas utiliser les barrettes de puits si leur emballage est abîmé.
- Lors de l'addition ou de l'aspiration des liquides dans les puits, ne pas gratter ou toucher le fond des puits.
- La modification du temps et de la température d'incubation peut entraîner des résultats erronés.
- Ne pas laisser les puits sécher pendant le dosage.
- Ne pas utiliser un puits pour plus d'un test.
- L'utilisation de multipettes ou de pipetteurs automatiques est recommandée pour limiter le temps de distribution des réactifs.
- Pour obtenir une mesure précise des échantillons, pipeter avec précautions les échantillons et les standards en utilisant du matériel calibré.
- Pour obtenir des résultats précis, il est indispensable de recueillir et de conserver correctement les échantillons. (Se reporter au paragraphe *RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS*, page 4).
- Éviter toute contamination microbienne ou croisée des échantillons, réactifs ou matériels, ce qui pourrait entraîner des résultats erronés.
- Chacun des prélèvements de donneurs utilisés pour préparer les sérums étalons et témoins (contrôles) de ce produit a été testé selon une méthode agréée par la FDA pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH1 et VIH2) et le virus de l'hépatite C, ainsi que de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B. Aucune méthode de test ne pouvant garantir totalement l'absence d'agents infectieux, ces réactifs doivent être manipulés selon le niveau 2 de sécurité biologique comme le recommande, pour tout prélèvement sérique ou sanguin humain potentiellement infectieux, le manuel des Centers for Disease Control/National Institutes of Health intitulé « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories », 2007.

- Le ProClin 300 est un conservateur. Tout contact ou ingestion accidentels de tampons ou de réactifs contenant du Proclin peut entraîner une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Appeler un médecin si on observe ces symptômes.
- **Le Substrat concentré est sensible à la lumière. Eviter toute exposition prolongée à une lumière intense ou directe. Après utilisation, conserver le réactif à l'abri de la lumière.**
- Pour éviter la formation d'aérosols pendant le lavage, aspirer le liquide de lavage dans une bouteille contenant de l'eau de javel.
- **Un flacon laveur doit être utilisé pour laver la plaque. Pour un résultat optimal, ne pas utiliser de pipette multicanaux pour laver les barrettes de puits.**
- Des échantillons inactivés par la chaleur, lipidiques ou contaminés peuvent donner des résultats erronés.
- Le test doit être effectué dans une zone suffisamment ventilée.
- Éliminer les contenants et les contenus non utilisés conformément aux exigences fédérales, nationales et réglementations réglementaires locales.
- Porter des gants et des lunettes de protection, et suivre les bonnes pratiques de laboratoire en manipulant cette trousse.
- Lavez-vous soigneusement les mains après manipulation.
- Pour en savoir plus sur les symboles de danger, la sécurité, la manipulation et l'élimination des composants de ce kit, veuillez vous référer à la Fiche de données de sécurité (FDS) que vous trouverez sur quidel.com.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Amener tous les réactifs à 15°C à 25°C avant usage.

Après utilisation, conserver les différents constituants et réactifs inutilisés à la température requise (voir le paragraphe *CONSERVATION*).

Barrettes de puits

Déterminer le nombre de barrettes nécessaires pour le dosage. Placer ces barrettes sur le support, refermer avec soin la pochette contenant le reste des barrettes et la conserver à 2°C à 8°C.

Solution de Lavage

Préparer la Solution de Lavage nécessaire pour le lavage des puits en diluant 50 ml de la Solution de Lavage Concentrée 20X à l'aide d'eau distillée ou désionisée, afin d'obtenir un volume final de 1 litre. Mélanger soigneusement avant utilisation. La Solution de Lavage est stable 1 mois à 2°C à 8°C. Éliminer le réactif en cas d'apparition de trouble.

Reconstitution des Standards et des Contrôles Bb Plus

Ajouter 1.0 ml de Réhydratant dans chacun des flacons de Standard (A-E) et de Contrôle (Faible et Fort). Attendre au moins 15 minutes à température ambiante. Mélanger soigneusement. Éviter la formation de mousse ou de bulles pendant le mélange. Les Standards et Contrôles reconstitués sont stables pendant 1 mois à 2°C à 8°C.

Dilution des échantillons

ATTENTION: traiter tous les échantillons comme potentiellement infectieux. Ne pas utiliser des échantillons inactivés par la chaleur ou contaminés.

Dans le dosage MicroVue Bb Plus, il est recommandé de diluer les échantillons de plasma au 1:10 et les échantillons de sérum au 1:20 avec le Diluant pour Échantillons. Après dilution, les échantillons doivent être pipetés dans les puits dans les 30 minutes qui suivent la dilution. Ne pas conserver ou réutiliser les échantillons dilués. Ces échantillons doivent être éliminés après utilisation.

Les échantillons dont les taux de Bb sont élevés peuvent nécessiter des dilutions plus importantes que celles qui sont indiquées.

Pipetage des échantillons dilués dans les puits

L'une des 2 procédures suivantes pourra être utilisée pour l'addition des Echantillons dilués, des Standards, Contrôles et Diluant dans les puits (Voir l'étape 3 du *DOSAGE*):

- Pour le dosage de quelques échantillons, les échantillons dilués et les autres réactifs peuvent être ajoutés directement dans les puits à l'aide d'une micropipette (100 µL/puits).
- Pour des séries, en particulier si le nombre d'échantillons est important, il est recommandé d'utiliser une multipette pour ajouter les échantillons de la façon suivante **(une multipette pourra également être utilisée pour ajouter le Conjugué, le Substrat et la Solution d'Arrêt)**.

Afin de pipeter les Standards, Contrôles et Echantillons dilués aussi vite que possible dans les puits, on peut utiliser une deuxième microplaque. Au lieu d'ajouter 100µL de chaque Standard, Contrôle, ou Echantillon dilué individuellement dans les puits recouverts d'anticorps, 120-130 µL de chaque solution peuvent être pipetés dans les puits d'une microplaque vierge (non fournie) en respectant le même ordre que celui de la microplaque du kit. Lorsque tous les échantillons à tester ont été pipetés dans cette microplaque vierge, on pourra rapidement à l'aide d'une multipette transférer 100 µL de chaque puits de cette plaque vierge vers les puits recouverts d'anticorps. Afin d'éviter toute contamination croisée, on changera les embouts de la multipette à chaque nouvelle série d'échantillons.

CONSERVATION

Conserver le kit à 2°C à 8°C avant ouverture. Après ouverture, la Solution de Lavage concentrée 20X et le Réhydratant peuvent être conservés à 2°C à 25°C.

Amener tous les réactifs à température ambiante (15°C à 25°C) avant le dosage. Refermer avec soin la pochette contenant le reste des barrettes et la conserver à 2°C à 8°C.

INDICATIONS D'INSTABILITÉ OU DE DÉTÉRIORATION DES RÉACTIFS

Éliminer la solution de lavage si l'on observe l'apparition de trouble.

RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Manipuler et éliminer les échantillons selon la réglementation en vigueur.

Le recueil et la conservation des échantillons sont importants, dans la mesure où le fragment Bb du Facteur B peut subir une protéolyse dans des échantillons mal recueillis ou mal conservés.

Pendant la coagulation, on observe une activation du complément, c'est pourquoi la concentration de Bb dans les échantillons de sérum humain est supérieure à celle que l'on observe dans les échantillons de plasma EDTA. Les taux de Bb présents dans le plasma EDTA sont donc plus représentatifs de la concentration *in vivo*.

On prélèvera les échantillons de sérum ou de plasma EDTA de façon aseptique, selon les techniques standard. Doser immédiatement les échantillons ou bien les conserver à 4°C ou sur de la glace (4 heures maximum) jusqu'au dosage.

Pour une conservation plus longue, congeler sérums et plasmas à -70°C dans les 2 heures qui suivent le recueil.

Décongeler très rapidement les spécimens congelés ($\leq -70^\circ\text{C}$) dans un bain Marie à 37°C. Transférer immédiatement les spécimens tout juste décongelés sur de la glace (maximum 4 heures) afin d'empêcher l'activation du complément avant la dilution. **Ne pas laisser les échantillons à 37°C.** Ne pas décongeler les échantillons à température ambiante ou à 4°C, ce qui pourrait entraîner une activation du complément.

Doser les échantillons aussitôt que possible après la décongélation. Eviter les congélations/décongélation répétées. En cas d'analyses multiples, Quidel recommande de préparer plusieurs aliquotes de l'échantillon.

PROCÉDÉ DE L'ESSAI

Lire la notice produit dans son intégralité avant de commencer l'essai.

Voir les paragraphes AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS et PRÉPARATION DES RÉACTIFS.

1. Noter les positions des puits correspondant aux Blancs, Echantillons, Standards et Contrôles, ainsi que les numéros de lot indiqués sur les étiquettes des flacons. Repérer un coin de la plaque.
2. Préparer les barrettes de la façon suivante.
 - a. A l'aide d'un système de lavage ou d'un laveur automatique, ajouter environ 300 µL de Solution de Lavage dans chaque puits. **REMARQUE : Pour un résultat optimal, ne pas utiliser de pipette multicanaux pour laver les barrettes de puits.**
 - b. Incuber les puits 1 minute à 15°C à 25°C.
 - c. Aspirer le contenu des puits.
 - d. Ajouter environ 300 µL de Solution de Lavage dans chaque puits.
 - e. Aspirer le contenu des puits.
 - f. **Répéter les étapes d-e encore une fois, on aura donc au total 3 lavages.**
 - g. Inverser la plaque en la tapotant fermement sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
3. Ajouter 100 µL de Diluant pour échantillon, de Standards et de Contrôles reconstitués, ou d'échantillons dilués dans les puits correspondants.
4. Incuber à 15°C à 25°C pendant 30 ± 1 minutes.
5. Laver les puits à 5 reprises:
 - a. Aspirer le contenu de chaque puits.
 - b. A l'aide d'un système de lavage ou d'un laveur automatique, ajouter environ 300 µL de Solution de Lavage dans chaque puits. **REMARQUE : Pour un résultat optimal, ne pas utiliser de pipette multicanaux pour laver les barrettes de puits.**
 - c. Incuber les puits 1 minute à 15°C à 25°C.
 - d. Aspirer le contenu des puits.
 - e. Ajouter environ 300 µL de Solution de Lavage dans chaque puits.
 - f. Aspirer le contenu des puits.
 - g. **Répéter les étapes e-f encore trois fois.**
 - h. Après le 5^{ème} lavage, inverser la plaque en la tapotant fermement sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
6. A l'aide d'une multipipette, ou d'une pipette automatique, pipeter 50 µL de Conjugué Bb Plus dans chaque puits, y compris ceux qui correspondent au Blanc.
7. Incuber les barrettes à 15°C à 25°C pendant 30 ± 1 minutes.
8. Laver les barrettes après l'incubation (étape 7) selon le procédé décrit à l'étape 5. **REMARQUE : Pour un résultat optimal, ne pas utiliser de pipette multicanaux pour laver les barrettes de puits.**
9. Aussitôt après le lavage, pipeter 100 µL de la Solution de Substrat TMB dans tous les puits, y compris ceux qui correspondent au Blanc. **REMARQUE : Le substrat TMB doit être protégé de la lumière pendant la conservation et l'incubation. Le substrat TMB ne doit pas être pipeté dans un réservoir à réactif ou un autre appareil susceptible de l'exposer à la lumière jusqu'à ce que l'on soit prêt le pipeter dans les barrettes de puits.**
10. Incuber les barrettes à 15°C à 25°C pendant 15 ± 1 minutes dans le noir.
11. Ajouter 100 µL de Solution d'Arrêt dans tous les puits pour arrêter la réaction enzymatique. Ajouter la Solution d'Arrêt dans le même ordre et avec la même vitesse que lors de l'addition de la Solution de Substrat.
12. Tapoter doucement la plaque sur la pailleasse pour permettre un développement uniforme de la coloration.
13. Lire l'absorption à 450 nm dans l'heure qui suit l'addition de la Solution d'Arrêt, en faisant une correction pour le blanc en fonction du spectromètre utilisé.

14. Eliminer le reste des Echantillons dilués, Contrôles, Substrat et Barrettes utilisés (voir le paragraphe **ATTENTION**).

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le certificat d'Analyse inclus dans le kit est spécifique du lot et doit être utilisé pour vérifier si les résultats obtenus dans votre laboratoire sont semblables à ceux obtenus par Quidel Corporation. Les densités optiques sont mentionnées à titre indicatif seulement. Les résultats obtenus dans votre laboratoire peuvent être différents.

Des fourchettes de valeurs sont fournies pour les contrôles. Les valeurs de ces derniers servent à vérifier la validité de la courbe standard et des résultats obtenus pour les échantillons. Chaque laboratoire devrait établir ses propres critères d'acceptation. Si les valeurs des contrôles NE sont PAS dans les limites acceptables, il est préférable de refaire le dosage des échantillons.

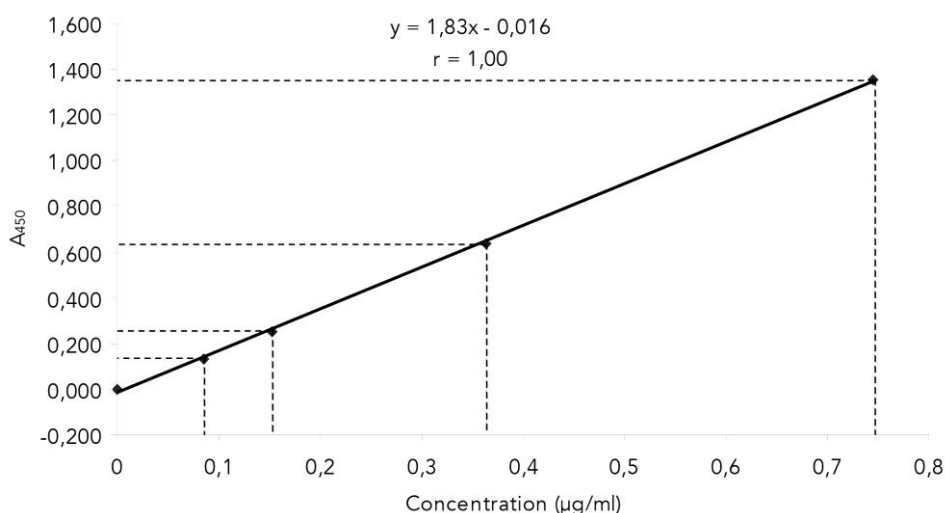
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Exemple de Courbe Standard

On trace la courbe standard du dosage EIA de Bb en plaçant sur l'axe des y les valeurs A_{450} de chaque Standard Bb Plus (dont on aura préalablement soustrait la valeur du blanc) et sur l'axe des x la concentration correspondante. Après avoir effectué une régression linéaire, la courbe standard doit répondre aux critères de validation (voir ci-dessous). La plupart des ordinateurs et des calculateurs peuvent effectuer ces calculs.

On peut également reporter manuellement ces données sur le graphe et déduire les concentrations correspondant aux échantillons ($\mu\text{g/ml}$) sur la courbe standard. On trouvera ci-dessous un exemple de courbe standard (Figure 1).

Figure 1.
Courbe Étalon Représentative



Calcul de la concentration de Bb des échantillons

La concentration de Bb dans chaque échantillon non dilué est calculée en multipliant la concentration en Bb/ml, déterminée à partir de la courbe standard, par le facteur de dilution utilisé pour l'échantillon.

Si la valeur obtenue à A_{450} d'un échantillon donné est supérieure à celle du Standard le plus élevé du kit (E), on rendra un résultat « supérieur à » la concentration du Standard le plus élevé du kit (E) multiplié par le facteur de dilution de l'échantillon. Si on souhaite obtenir une valeur plus précise, on redosera l'échantillon en le diluant davantage. On devra également redoser les Standards et les Contrôles du kit Bb Plus.

VALIDATION

Déterminer la pente, l'interception et le coefficient de corrélation de la droite obtenue. Pour valider le dosage, les valeurs obtenues doivent être dans les fourchettes suivantes:

coefficient de Corrélation (r):	> 0,96
pente (m):	entre 1,094 et 2,558
interception avec l'axe des y (b):	entre (-)0,145 et 0,113

Se reporter aux étiquettes des flacons ou à la fiche de contrôle pour connaître les fourchettes de concentrations correspondant aux Contrôles Fort et Faible.

LIMITATIONS

On a utilisé le kit de dosage enzymatique MicroVue du Bb Plus pour doser des échantillons de sérum ou de plasma EDTA. NE PAS utiliser de plasma hépariné dans ce dosage. Les autres anticoagulants n'ont pas été testés.

CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

Limites

LD: La limite de détection (LD) pour le dosage de Bb Plus est de 0,018 µg/ml, calculée comme la limite supérieure obtenue pour 3DS dans une étude de précision réalisée à l'aide du standard zéro.

PPQM: La plus petite quantité mesurable (PPQM) du dosage de Bb Plus est de 0,033 µg/ml. C'est la plus petite concentration lue à partir de la courbe standard, en suivant les recommandations du NCCLS pour l'exactitude et la précision.

LQS: La limite de quantification supérieure (LQS), mesurable par le dosage de Bb Plus est de 0,836 µg/ml. C'est la plus forte concentration lue à partir de la courbe standard, en suivant les recommandations du NCCLS pour l'exactitude et la précision.

Substances Interférantes

L'héparine Na⁺ à 14 U/ml (concentration des tubes de prélèvement de plasma sur héparine) interfère avec le dosage de Bb Plus, il est donc recommandé de ne pas l'utiliser comme anticoagulant pour le prélèvement des échantillons.

On n'a pas observé d'interférences pour les substances suivantes, testées selon les concentrations indiquées.

Substance	Concentration
Bilirubine	40 mg/dl
Hémoglobine	500 mg/dl
Triglycérides	3000 mg/dl
Albumine	6000 mg/dl
Glucose	1200 mg/dl
Cholestérol	500 mg/dl

Précision

On a dosé à 20 reprises 2 échantillons de plasma EDTA et 2 échantillons de sérum (Précision intra essai) et on a dosé ces mêmes échantillons dans 10 dosages différents (Précision inter-essais).

Echantillon	Bb (µg/ml)	CV Intra-essai ¹ (%)	CV Inter-essais ² (%)
EDTA Plasma	1,550	2,4	7,7
	0,517	2,5	6,7
Sérum	2,129	3,1	6,2
	2,375	4,0	9,1

¹n = 20 répliques ²n = 10 dosages

Linéarité

On a évalué la linéarité en diluant en cascade des échantillons et en comparant les valeurs obtenues aux valeurs attendues. Les résultats sont présentés ci-dessous.

Echantillon	Facteur de Dilution	Observé Bb (µg/ml)	Attendu Bb (µg/ml)	Récupération (%)
EDTA Plasma	1:10	0,160	*	*
	1:16	0,107	0,100	106,9%
	1:20	0,079	0,080	98,7%
	1:32	0,052	0,050	103,9%
Sérum 1	1:20	0,161	*	*
	1:32	0,103	0,101	102,0%
	1:40	0,069	0,081	85,4%
	1:64	0,044	0,050	87,2%
Sérum 2	1:20	0,597	*	*
	1:25	0,467	0,478	97,7%
	1:30	0,420	0,398	105,4%
	1:40	0,310	0,299	103,8%
	1:50	0,230	0,239	96,2%
	1:60	0,196	0,199	98,4%
	1:80	0,133	0,149	89,0%

VALEURS OBSERVÉES

On a dosé 36 échantillons de plasmas EDTA et 49 sérums provenant de donneurs sains à l'aide du kit de dosage enzymatique MicroVue du fragment Bb Plus. Les résultats sont présentés ci-dessous:

	n	Moyenne (ug/ml)	Valeurs extremes (ug/ml)	
			± 2 SD	± 3 SD
EDTA Plasma	36	0,96	0,49-1,42	0,26-1,65
Sérum	49	3,53	0,80-6,26	0,0-7,62

REMARQUE: La moyenne et la déviation standard (DS) obtenues pour les concentrations du fragment Bb présent dans les échantillons de plasma et de sérum peuvent varier selon les laboratoires. Il est donc recommandé que chaque laboratoire détermine ses propres moyennes et déviations standard.

ASSISTANCE

Pour une commande ou une question technique, veuillez contacter votre distributeur local. Vous trouverez les informations sur Quidel, ses produits et ses distributeurs sur le site quidel.com.

RÉFÉRENCES

1. Schreiber, R.D. and Müller-Eberhard, H.J. 1980. New developments in the activation of the alternative pathway of complement. In: *Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980's*. Alan R. Liss, Inc., New York. p.411.
2. Gotze, O. and Müller-Eberhard, H.J. 1976. The alternative pathway of complement activation. *Adv. Immunol.* 24:1.
3. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1980. Current concepts in immunology: the alternative pathway of complement – a system for host resistance to microbial infection. *New Engl. J. Med.* 303: 259
4. Pangburn, M.K. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol* 7:163.
5. Ratnoff, W.E., Fearon, D.T., and Austen, K.F. 1983. The role of antibody in the activation of the alternative complement pathway. *Springer Semin Immunopathol* 6:361.
6. Hugli, T.E. 1986. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *Complement* 3:111
7. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1977. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 74:1 1683.
8. Fearon, D.T. 1979. Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 76: 5867.
9. Fishelson, Z. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. Residual hemolytic and proteolytic activity expressed by Bb after decay-dissociation of C3b,Bb. *J. Immunol.* 132:1425.
10. Gotze, O., Bianco, C. and Cohn, Z.A. 1979. The induction of macrophage spreading by Factor B of the properdin system. *J. Exe. Med.* 149:372.
11. Sundsmo, J.S. and Wood, L.M. 1981. Activated factor B(Bb) of the alternative pathway of complement activation cleaves and activates plasminogen. *J. Immunol.* 127:877.
12. Kolb, W.P., Morrow, P.R. and Tamerius, J.D. 1989. Ba and Bb Fragments of Factor B activation: Fragment production, biological activities, neoepitope expression and quantitation in clinical samples. *Complement and Inflammation* 6:175.
13. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
14. Sefton, M.V., et al. 1994. "Using ELISA to evaluate complement activation by reference biomaterials" *J. Mat. Sci* 5:622-627,.
15. Mold, C. Tamerius, J.D., et al. 1995 "Complement activation during painful crisis in sickle cell anemia" *Clinical Immunology and Immunopathology* 70:3,314-320.
16. Manzi, S. Rairie, J. et al. 1996 "Sensitivity and Specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity" *Arthritis and Rheumatism* 39(7)1178-1188.
17. J.Jarvis, Taylor, H. 1994. "Complement activation and immune complexes in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis: a longitudinal study" *J Rheumatology* 21(6) 1124-1127.
18. Aggarwaal, et al. 2000." Evidence for activation of the alternative complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis" *Rheumatology* 39:189-192.
19. J. Buyon, Tamerius J. et al.1992. "Assessment of Disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus" *Arthritis and Rheumatism* 35(9) 1028-1036.
20. D. Shaw, Rustagi, P. et al. 1997. "Effects of Synthetic Oligonucleotides on human complement and coagulation" *Biochemical Pharmacol* 53(8)1123-1132.
21. Mollnes, T.E., et al. 1999. "Complement activation in patients with systemic lupus erythematosus without nephritis" *Rheumatology* 38:933-940.
22. Sturfelt, G, Truedsson, L. 2005. "Complement and its breakdown products in SLE" *Rheumatology* 44:1227-1232.
23. Alexander, J.J. et al. 2005. "Complement-dependent apoptosis and inflammatory gene changes in murine lupus cebritis" *J. Immunology* 175:8312-8319.

24. Thurman, J., Holers, V.M. 2006. "The central role of the alternative pathway in human disease" *J. Immunology* 176:1305-1310.
25. Pawluczkwycz, A.W et al. 2007. "Hematin promotes complement alternative pathway-mediated deposition of C3 activation fragments on human erythrocytes: potential implications for the pathogenesis of anemia in malaria" *J. Immunology* 179:5543-5552.
26. Atkinson, C. et al. 2008. "Low-dose targeted complement inhibition protects against renal disease and other manifestations of autoimmune disease in MRL/lpr mice" *J. Immunology* 180:1231-1238.

REF

A027 – MicroVue Bb Plus Fragment EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA027002FR00 (02/17)

GLOSSAIRE



Référence catalogue



Conformité Européenne



Représentant autorisé dans
la Communauté Européenne



Référence du lot



Date d'expiration



Fabricant



Conditions de stockage



Utilisation prévue



Consulter les instructions
électroniques



Risques biologiques



Pour utilisation *in vitro*



Contenu suffisant pour 96 déterminations



Contenu



Contrôle

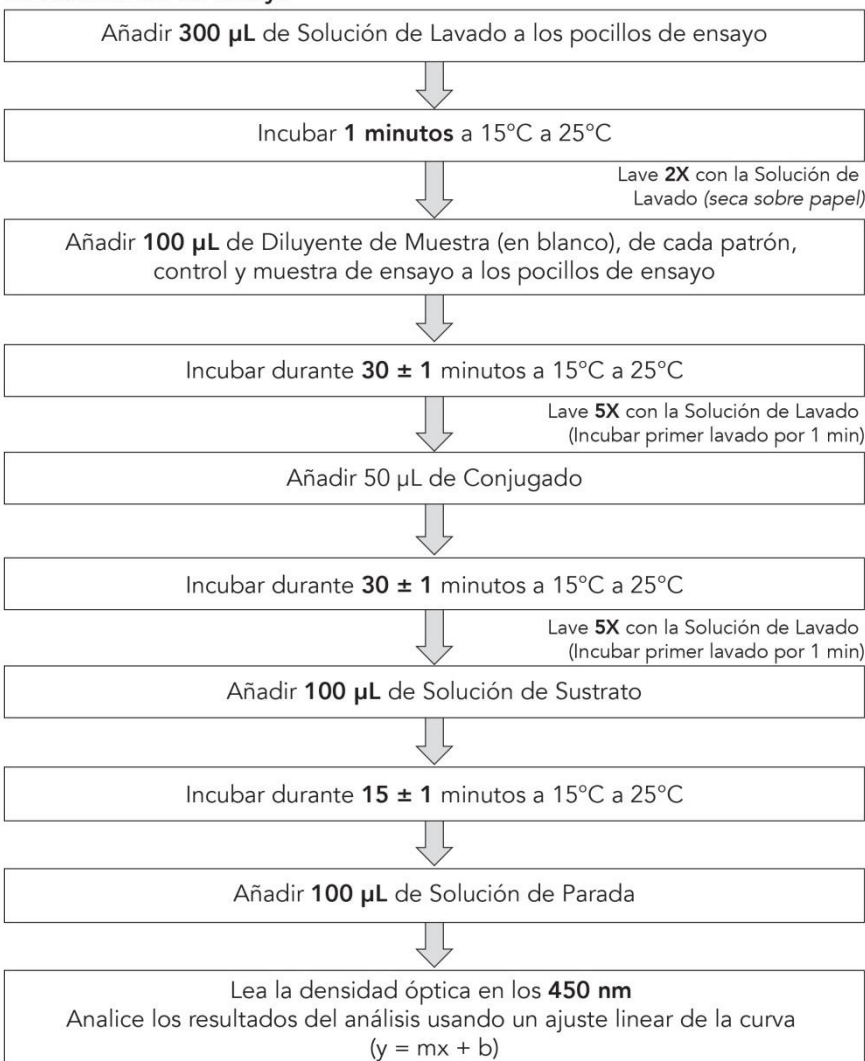
Un inmunoensayo para la cuantificación de Fragmento Bb, un indicador de la activación de la Vía Alternativa del Complemento, en muestras de suero humano o plasma

RESUMEN

Preparación de los Reactivos y de las Muestras

- ☐ Diluir la Solución de Lavado Concentrado 1:20 con agua desionizada
- ☐ Reconstituir cada Calibrador y Control con 1,0 mL del Reactivo Hidratante (*déjelo por 15 minutos, y mezcle suavemente antes de uso*)
- ☐ Diluir las muestras de plasma 1:10 en el Diluyente de Muestras (e.g. 50 μ L + 450 μ L) (*Añada a los pocillos de ensayo en el plazo de 30 minutos*)
- ☐ Diluir las muestras de suero 1:20 en el Diluyente de Muestras (e.g. 25 μ L + 475 μ L) (*Añada a los pocillos de ensayo en el plazo de 30 minutos*)

Procedimiento de ensayo





USO PREVISTO

El ensayo inmunoenzimático MicroVue Bb Plus mide la cantidad de fragmentos Bb del complemento en muestras de suero humano o plasma. La medida de Bb en suero humano, plasma u otros fluidos biológicos proporciona evidencias de la participación de la vía alternativa del complemento. La medida de la activación de la vía alternativa del complemento ayuda en el diagnóstico de enfermedades hepáticas, por ejemplo, glomerulonefritis crónica, nefritis lupus, así como de enfermedades de la piel, como dermatitis herpetiforme y pénfigo vulgar. Otras enfermedades en las que la activación de la vía alternativa del complemento ha sido observada incluyen la artritis reumatoide, anemia drepanocítica, y infecciones de bacterias gram negativas.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La vía alternativa del complemento proporciona protección innata contra los agentes microbiológicos en ausencia de anticuerpos específicos.¹⁻⁵ La activación de esta vía del complemento puede ser el desencadenante de una variedad de sustancias incluídas polisacáridos o lípidos microbiológicos, lipopolisacáridos bacterianos gram negativos, y determinantes de superficie presentes en algunos virus, parásitos y células cancerígenas. En enfermedades autoinmunes, la vía alternativa del complemento puede contribuir directamente al daño tisular.

Una reacción importante que se produce durante la activación de la vía alternativa es la conversión del Factor B zimógeno de 93 Kd de peso molecular en un enzima proteolítico activo. Esta es una reacción compleja que se produce en dos pasos. Durante el primer paso de la reacción el Factor B forma un complejo magnesio-dependiente con C3(H₂O) or C3b.⁴ El complejo C3(H₂O),B está formado solamente en fase líquida mientras el complejo C3b,B puede formarse tanto en fase líquida como en superficie.¹⁻⁴ El Factor B, que está presente en el complejo C3(H₂O),B o el complejo C3b,B, está unido a los fragmentos Ba (33 Kd) y Bb (60 Kd) en el segundo paso de la reacción por el enzima de la vía alternativa, Factor D.¹⁻⁴ El complejo biomolecular resultante C3b,Bb es el enzima C3 convertasa de la vía alternativa. La subunidad Bb es el lugar catalíticamente activo del complejo que es capaz de convertir C3 en los fragmentos C3a y C3b.^{1-4,6} Los fragmentos adicionales C3b producidos de esta manera pueden formar el complejo trimolecular C3b,Bb,C3b que es el enzima C5 convertasa de la vía alternativa. Esta C5 convertasa es capaz de convertir C5 en fragmentos C5a y C5b.^{1-4,6}

Las convertasas C3 y C5 de la vía alternativa pueden estar estabilizadas por el Factor P (también llamado Properdin), un componente de la vía alternativa normalmente presente en suero o plasma humano,¹⁻⁴ o por el factor nefrítico C3, un autoanticuerpo producido en algunos pacientes que sufren la activación de la vía alternativa.⁵ Las convertasas C3 y C5 de la vía alternativa pueden estar disociadas, e inactivadas, por disociación espontánea,⁷ or por la unión del Factor H o el Receptor 1 de Complemento (CR1).^{4,8} El fragmento Bb que está disociado de cualquier convertasa retiene algunas actividades biológicas, por ejemplo, retención de la actividad hemolítica funcional,^{4,9} la habilidad de inducir la proliferación de macrófagos,¹⁰ y la activación de plasminógeno.¹¹

A pesar de que la activación de la vía alternativa se piensa que ocurre primariamente en ausencia de anticuerpos específicos, en muchas situaciones la activación de la vía alternativa puede ocurrir como resultado de la activación de la vía clásica. Por ejemplo, los complejos inmunes que están presentes en pacientes con enfermedades autoinmunes pueden disparar la activación de la vía clásica del complemento con la producción resultante de fragmentos C3b. Como se ha descrito, estas moléculas C3b son capaces de unir Factor B e iniciar su escisión en fragmentos Ba y Bb. Así, la activación de la vía alternativa puede ocurrir en estados autoinmunes mediados por anticuerpos y puede contribuir significativamente a incrementar la activación del complemento y la consecuente destrucción tisular.

Al evaluar productos de escisión del Factor B en especímenes de prueba, puede uno estimar el grado de utilización de la vía alternativa que ocurre al mismo tiempo que se obtiene la muestra sobre investigación del estado autoinmune. El kit de MicroVue Bb Plus EIA proporciona un procedimiento simple, rápido, no-

radiactivo, altamente específico, y cuantitativo para la medida la activación del Factor B. Es ideal para las investigaciones relacionadas con el rol o estado de la vía alternativa del complemento en clínica e investigación, y para monitorizar la generación de Bb *in vitro*.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El inmunoensayo enzimático MicroVue Bb Plus para la cuantificación en suero humano, plasma, u otras muestras es un proceso de tres pasos utilizando (1) una microplaca cubierta con un anticuerpo monoclonal de ratón que une específicamente a Bb humano, (2) un anti-Bb humano murino conjugado con HRP, y (3) un substrato cromogénico.

En el primer paso, Calibradores, Controles, y Muestras son añadidas a los pocillos de la microplaca recubiertos con el anticuerpo monoclonal específico anti-Bb. Bb, pero no Factor B ni otros productos de la activación de complemento, presentes en Calibradores, Controles, o muestras se unirán al anticuerpo monoclonal anti-Bb inmovilizado. Después de la incubación, un ciclo de lavado eliminará el material no unido.

En el segundo paso, el anticuerpo murino anti-Bb conjugada con HRP se añade a cada pocillo. El anticuerpo anti-Bb conjugado se une a Bb capturado en los pocillos de la microplaca. Después de la incubación, un ciclo de lavado elimina el material no unido.

En el tercer paso, un substrato enzimático cromogénico se añade a cada pocillo de la microplaca. El conjugado-HRP unido reacciona con el substrato, formando un color azul. Después de la incubación, la reacción enzimática se detiene químicamente, el color azul cambia a amarillo, y la intensidad del color se mide espectrofotométricamente a 450 nm. La intensidad del color de la reacción es proporcional a la concentración de Bb presente en la muestra, Calibradores y Controles.

REACTIVOS Y MATERIALES PROPORCIONADOS

96 Ensayos para el fragmento Bb del Factor B

El kit de inmunoensayo enzimático MicroVue Bb Plus Enzyme contiene:

A	Calibradores Bb Plus	Cód. A9948-A9952	1 mL cada uno
B	(lío-filizado) Contiene una concentración conocida de Bb humano en suero humano diluído en PBS,		
C	proteínas estabilizadoras, 0,035% ProClin® 300		
D			
E			
L	Controles bajo Bb Plus	Cód. A9953	1 mL
	(lío-filizado) Contiene una concentración conocida de Bb humano en suero humano diluído en PBS,		
	proteínas estabilizadoras, 0,035% ProClin® 300		
H	Controles alto Bb Plus	Cód. A9955	1 mL
	(lío-filizado) Contiene una concentración conocida de Bb humano en suero humano diluído en PBS,		
	proteínas estabilizadoras, 0,035% ProClin® 300		
1	Microplaca	Cód. A9559	12 cada uno
	12 tiras de 8 pocillos cubiertas con un anticuerpo monoclonal purificado específico para Bb humano		
2	Solución de parada	Cód. A9947	12 mL
	Contiene Ác. Clorhídrico 1N		
3	Solución de lavado 20X concentrado	Cód. A9957	50 mL
	Contiene PBS, 1,0% Tween-20®, y 0,035% ProClin 300		
4	Diluyente de muestras	Cód. A3670	50 mL
	Contiene PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% proteínas estabilizadoras, 0,035% ProClin 300		

5	Substrato TMB Contiene 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) y Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	Cód. 5059	12 mL
6	Conjugado Bb Plus Contiene anticuerpo anti-Bb humano conjugado con HRP suspendido en tampón estabilizador de HRP stabilizing con preservantes	Cód. A9956	7 mL
8	Reactivo Hidratante Contiene 0,035% ProClin 300 Tween® 20 es una marca registrada de ICI Americas Inc. ProClin® es una marca registrada de Rohm and Haas Company.	Cód. A3675	25 mL

MATERIALES NECESARIOS PERO NO PROPORCIONADOS

- Cronometro de laboratorio (60 minutos)
- Calculadora u otros métodos para validar la técnica
- Racks y tubos de muestras limpios
- Contenedor para la solución de lavado diluido
- Sistema de lavado del inmunoensayo
- Pipeta multicanal ajustable (8 o 12 canales) o micropipetas de repetición
- Pipetas limpias, 1 mL, 5 mL, y 10 mL
- Puntas de pipeta
- Lector de placa sapto para valores de densidades ópticas entre 0,0 and 2,0
- Agua destilada o desionizada

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso *Diagnóstico in vitro*.
- La utilización de Heparina Plasma en esta técnica puede originar resultados erróneos.
- Tratar las muestras como material potencialmente peligroso. Seguir el manual de Precauciones Universal para el tratamiento del contenido del kit y las muestras.
- Utilizar los reactivos suministrados como una unidad integral antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja.
- Almacenar los reactivos según se indica.
- No utilizar las tiras recubiertas si la protección está agujereada.
- Cuando añadens o aspiran líquidos de los pocillos de la microplaca, no tocar el fondo del pocillo.
- La utilización de los tiempos de incubación y temperaturas diferentes a las indicadas en la sección Procedimiento puede originar resultados erróneos.
- No permitir que los pocillos de la microplaca se sequen una vez que la técnica se ha iniciado.
- No utilizar un pocillo más de una vez.
- Utilizar pipetas multicanal o pipetas de repetición para asegurar los tiempos de dispensación de reactivos.
- Para una adecuada medida de las muestras, añadir las muestras y los calibradores de forma precisa. Pipetear cuidadosamente utilizando únicamente equipo calibrado.
- La colección y el almacenamiento de las muestras de forma apropiada son esenciales para la obtención de resultados precisos (ver COLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS, página 6).
- Evitar contaminación microbiana y entre muestras, reactivos, o materiales. Pueden obtenerse resultados incorrectos si se produce contaminación.
- Utilizar ropa protectora, guantes y protección ocular mientras se manipula el contenido del kit.
- Cada unidad de donante utilizada en la preparación de los sueros Calibradores y Controles han sido probados por un método aprobado por la FDA para la detección de anticuerpos contra HIV 1 y 2 y HVC, así como para el antígeno de superficie de la Hepatitis B. Todos los resultados fueron negativos. Sin embargo, como ningún método puede ofrecer la completa seguridad de la ausencia de agentes infecciosos, estos reactivos deben ser manipulados bajo el Nivel 2 de Bioseguridad como se recomienda para cualquier muestra de suero o sangre potencialmente infecciosa en el manual "Biosafety in Micro-biological and Biomedical Laboratories" 2007.

- ProClin 300 es utilizado como preservante. Contacto accidental o ingestión de tampones o reactivos que contienen ProClin pueden causar irritación de la piel, ojos, o boca. Utilizar las buenas prácticas de laboratorio para reducir la exposición.
- **El Sustrato Concentrado es fotosensible. Evitar la exposición prolongada a la luz directa. Almacenar los reactivos en la oscuridad cuando no se están utilizando.**
- Para evitar la formación de aerosoles durante el lavado, utilizar un aparato para aspirar el líquido de lavado en un recipiente que contenga lejía de uso doméstico.
- **Se debe utilizar una botella de lavado para lavar la placa. Para obtener mejores resultados, no use una pipeta multicanal para lavar la placa de microensayo.**
- Muestras inactivadas por calor, hiperlipémicas o contaminadas pueden dar resultados erróneos.
- La prueba debe realizarse en una zona que disponga de la ventilación adecuada.
- Deseche los envases y contenido no utilizado conforme a los requerimientos locales, estatales y federales reglamentarios.
- Vista preferentemente ropa protectora, guantes y protección para ojos/cara cuando esté manipulando los componentes del kit.
- Lavarse bien las manos después de manipular el kit.
- Para obtener información adicional sobre símbolos de peligro, seguridad, manipulación y eliminación de los componentes de este kit, consulte la Ficha de datos de seguridad (*Safety Data Sheet, SDS*) que se encuentra en quidel.com.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Traer todos los reactivos y materiales a 15°C a 25°C antes de su utilización.

Después de remover todos los reactivos y materiales necesarios, devolver el material no necesario a las temperaturas apropiadas de almacenamiento (ver *ALMACENAMIENTO*).

Tiras recubiertas

Determinar el número de tiras necesarias para la realización del ensayo. Remover el número de tiras necesarias. El material no necesario devolverlo a la bolsa de almacenamiento, cerrarla, y almacenar a 2°C a 8°C.

Solución de Lavado

Preparar la Solución de Lavado diluyendo 50 mL de Solución de Lavado Concentrada 20X hasta un volumen final de un litro con agua destilada o desionizada. Mezclar vigorosamente antes de su utilización. La Solución de Lavado es estable durante 30 días cuando se almacena en un recipiente limpio a 2°C a 8°C. Si se observa turbidez, desechar el reactivo.

Reconstitución de Calibradores y Controles Bb Plus

Añadir 1.0 mL de Reactivo de Hidratante a cada frasco de Calibrador (A-E), y al de Control Bajo y Control Alto. Permitir la rehidratación de los frascos reconstituídos durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente. Mezclar completamente. Evitar la formación de espuma o burbujas durante el mezclado. Los calibradores y controles reconstituído son estables durante 30 días almacenados a 2°C a 8°C.

Dilución de Muestras

Precaución: Tratar todas las muestras como si fueran potencialmente infecciosas. No utilizar muestras inactivadas por calor o contaminadas.

Se recomienda que las muestras de plasma sean diluídas 1:10 en Diluyente de Muestras para ser utilizadas. Se recomienda que las muestras de suero sean diluídas 1:20 en Diluyente de Muestras. Una vez diluídas, las muestras deben añadirse a los pocillos en un máximo de 30 minutos. No almacenar o re-utilizar las muestras diluídas.

Muestras con niveles elevados de activación de complemento pueden requerir diluciones más altas a las mencionadas.

Añadir Muestras Diluídas a la Microplaca

Pueden utilizarse dos métodos para añadir las muestras diluídas, Calibradores, Controles, y Diluyente de muestras, a los pocillos (ver Paso 3 *PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA*). Para ensayos pequeños donde se procesan un número bajo de muestras, las muestras diluídas y otros reactivos pueden añadirse directamente a sus pocillos asignados con una micropipeta (100 µL/pocillo). Para ensayos pequeños o grandes, pero especialmente para los grandes, recomendamos utilizar una pipeta multicanal para añadir las muestras. **(Una pipeta multicanal puede utilizarse también para añadir el Conjugado, Substrato o Solución de Parada).**

Con motivo de pipetear los Calibradores, Controles y muestras diluídas en la microplaca lo más rápidamente posible, puede utilizarse una “microplaca réplica.” En vez de añadir 100 µL de cada Calibrador, Control o muestra diluída a los pocillos cubiertos con anticuerpos, 120-130 µL de cada solución puede añadirse a los pocillos de la “placa réplica” vacía. Después de que todas las diluciones a procesar han sido añadidas a la “microplaca réplica,” transferir rápidamente 100 µL de cada pocillo a la microplaca con los pocillos recubiertos con anticuerpos utilizando una pipeta multicanal. Para evitar la posibilidad de contaminación, las puntas de pipeta deben ser cambiadas cada vez que hay un cambio de muestras a ser transferidas.

ALMACENAMIENTO

Almacenar el kit sin abrir a 2°C a 8°C. Una vez el kit está abierto, la Solución de Lavado Concentrada 20X y el Reactivo de Hidratación pueden almacenarse a 2°C a 25°C.

Todos los reactivos deben llevarse a temperatura ambiente (15°C a 25°C) antes de su utilización. Las tiras que no sean necesarias guardarlas en su bolsa, cerrarla y almacenar a 2°C a 8°C.

INDICACIONES DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE REACTIVOS

La turbidez de la Solución de Lavado indica un deterioro de este reactivo. Si esto sucede, la solución debe ser desechada.

COLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Manipular todas las muestras utilizando Precauciones Universales.

Una colección y un almacenamiento apropiados de las muestras son esenciales, ya que el Factor Bb es susceptible a proteólisis.

Debido a que la activación del complemento se produce durante la formación de coágulos, la concentración de Bb en muestras de suero humano normal será mayor que en aquellas obtenidas con muestras EDTA plasma. Los niveles de Bb en EDTA plasma pueden por lo tanto ser más representativas de la concentraciones *en vivo*.

Muestras de suero o EDTA plasma deben ser regocolectadas asépticamente utilizando técnicas estándar. Las muestras deben ser analizadas inmediatamente o almacenadas a 4°C o en hielo hasta su utilización. Sin embargo, este almacenamiento en hielo no debe exceder cuatro horas.

Para almacenamientos de larga duración, suero o plasma debe ser congelado a –70°C o menos durante las dos horas siguientes a su colección.

Descongelar las muestras rápidamente en un baño de agua a 37°C. Transferir las muestras descongeladas inmediatamente a hielo (durante no más de cuatro horas) para prevenir la activación del complemento antes de la dilución. **No dejar las muestras a 37°C.** No descongelar las muestras a temperatura ambiente o

a 4°C ya que puede llevar a la activación del complemento. Las muestras congeladas deben ser analizadas lo antes posible después de su descongelación. No se recomiendan los ciclos repetidos de congelación y descongelación. En caso de que sea necesario volver a congelar las muestras para su posterior análisis, Quidel recomienda congelar varias alícuotas de las muestras para evitar múltiples ciclos de congelamiento y descongelamiento.

PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA

Leer las especificaciones de la técnica antes de empezar.

Ver **PELIGROS Y PRECAUCIONES** y **PREPARACIÓN DE REACTIVOS**.

1. Tome nota de las posiciones de los pocillos de microensayo correspondientes al blanco, todas las muestras, Calibradores y Controles, así como los lotes de las etiquetas de los viales. Marcar una esquina de la microplaca para una mejor orientación.
2. Preparar las tiras del microensayo de la siguiente manera:
 - a. Añadir 300 µL de Solución de Lavado a cada pocillo utilizando una botella para lavado u otro dispositivo automatico. **NOTA: Para obtener mejores resultados, no use una pipeta multicanal para lavar la placa de microensayo.**
 - b. Incubar los pocillos durante un minuto a 15°C a 25°C.
 - c. Aspirar el contenido de cada pocillo.
 - d. Añadir 300 µL de Solución de Lavado a cada pocillo.
 - e. Aspirar el contenido de cada pocillo.
 - f. **Repetir los pasos d-e una vez más, para un total de tres lavados.**
 - g. Invertir la placa y golpear sobre papel absorbente para eliminar cualquier líquido restante.
3. Añadir 100 µL de Diluyente de Muestras, Calibradores y Controles reconstituidos, o muestras diluídas a los pocillos asignados.
4. Incubar a 15°C a 25°C durante 30 ± 1 minutos.
5. Lavar los pocillo un total de 5 veces utilizando el siguiente procedimiento:
 - a. Aspirar el contenido de cada pocillo.
 - b. Añadir 300 µL de Solución de Lavado a cada pocillo. **NOTA: Para obtener mejores resultados, no use una pipeta multicanal para lavar la placa de microensayo.**
 - c. Incubar los pocillos durante 1 minuto a 15°C a 25°C.
 - d. Aspirar el contenido de cada pocillo.
 - e. Añadir 300 µL de Solución de Lavado a cada pocillo.
 - f. Aspirar el contenido de cada pocillo.
 - g. **Repetir los pasos e-f tres veces más.**
 - h. Después del quinto ciclo de lavado, invertir la placa y golpear sobre papel absorbente para eliminar cualquier líquido restante.
6. Dispensar 50 µL de Conjugado Bb en cada pocillo, incluyendo los pocillos en blanco (Diluyente de Muestras), usando una pipeta multicanal o pipeta de repetición.
7. Incubar a 15°C a 25°C durante 30 ± 1 minutos.
8. Lavar los pocillos de la microplaca después de 30 minutos de incubación (paso 7), como se describe en el paso 5. **NOTA: Para obtener mejores resultados, no use una pipeta multicanal para lavar la placa de microensayo.**
9. Inmediatamente después del proceso de lavado, dispensar 100 µL de Solución de Sustrato TMB en cada pocillo, incluyendo los pocillos en blanco. **NOTA: El Sustrato TMB se debe proteger de la luz durante su conservación e incubación. El Sustrato TMB no se debe dispensar en el recipiente de reactivo ni en otro aparato donde pueda haber exposición a la luz hasta inmediatamente antes de dispensarlo en los pocillos del microensayo.**
10. Incubar a 15°C a 25°C durante 15 ± 1 minutos en la oscuridad.
11. Añadir 100 µL de Solución de Parada a cada pocillo para detener la reacción enzimática. La Solución de Parada debe añadirse a los pocillos en el mismo orden que la Solución de Sustrato.
12. Dar un golpecito en la placa par que el color se distribuya homogéneamente.

13. Determinar la absorbencia a 450 nm de cada pocillo antes de una hora de la adición de la Solución de Parada (paso 11), realizando la corrección del pocillo en blanco de acuerdo con el sistema espectrofotométrico utilizado.
14. Tirar el resto de muestras diluidas, Controles, Sustrato y las tiras utilizadas (ver **PELIGROS Y PRECAUCIONES**).

CONTROL DE CALIDAD

El Certificado de Análisis incluido en este kit es lote-específico y debe ser utilizado para la verificación de que los resultados obtenidos por su laboratorio son similares a los obtenidos por Quidel Corporation. Los valores de densidad óptica suministrados son simplemente una guía. Los resultados obtenidos por su laboratorio pueden diferir.

Los rangos de Control de Calidad han sido proporcionados. Los valores de control verifican la validez de la curva y los resultados de las muestras. Cada laboratorio debe establecer sus propios parámetros para los límites aceptables de la técnica. Si el control no está dentro de los valores de aceptación de su laboratorio, los resultados deben ser considerados como cuestionables, y las muestras deben ser repetidas.

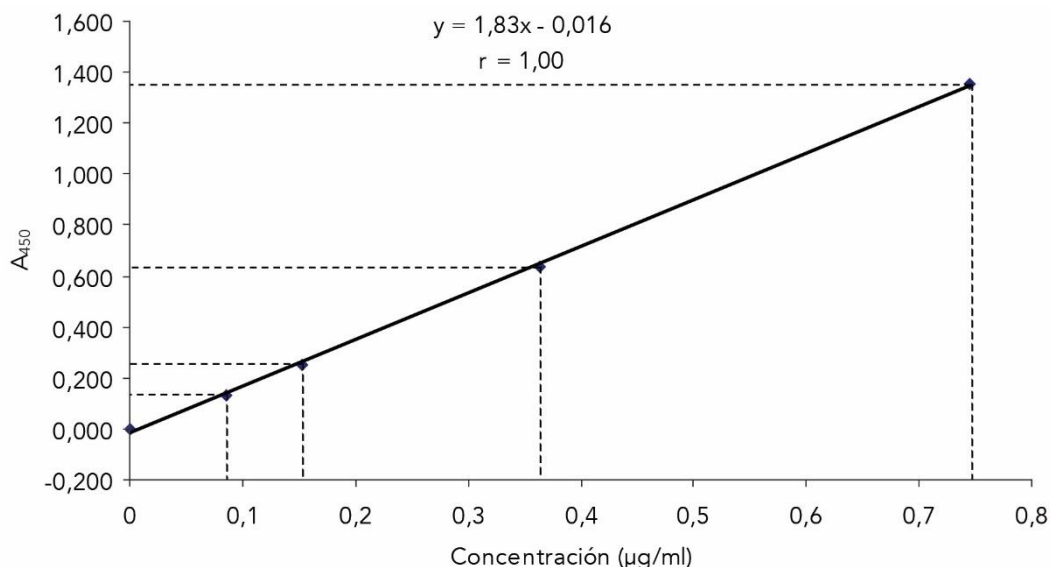
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Utilización de una Curva de Calibración

La curva de calibración para Bb EIA es generada restando los valores de absorbencia del blanco (A_{450}) a cada calibrador (en el eje y) y la concentración asignada para cada calibrador (en el eje x). Después de la regresión lineal, la curva generada debe cumplir los criterios de validación (ver abajo). Muchos ordenadores y calculadoras son capaces de realizar estos cálculos.

Un ejemplo de una curva típica de calibración se muestra en la Figura 1.

Figura 1.
Curva de Calibración Representativa



Cálculo de la Concentración de Bb de las Muestras

La concentración Bb presente en cada muestra sin diluir se determina multiplicando la concentración de Bb/mL, determinada de la Curva de Calibración del kit, por el inverso del factor de dilución aplicado. Si los valores de absorbencia obtenidos de una muestra son superiores a los del Calibrador más alto del kit (E), los resultados deben reportarse como “superior a” la concentración Bb del Calibrador (E) multiplicado

por el factor de dilución de la muestra. En todas las repeticiones de la técnica, los Calibradores y los Controles deben también ser procesados.

VALIDACIÓN

Determine la pendiente, intercepción, y el coeficiente de la línea de ajuste óptimo derivada. Los valores deben encontrarse dentro de los rangos especificados para aprobar el ensayo:

Coeficiente de correlación (r): > 0,96
pendiente (m): entre 1,094 y 2,558
Intercepción Y (b): entre (-) 0,145 y 0,113

Referirse a las etiquetas de los viales para los rangos de concentración Bb aceptables para los valores de los Controles Alto y Bajo.

LIMITACIONES

El inmunoensayo enzimático MicroVue Bb Plus ha sido utilizado para analizar muestras recogidas como suero o plasma en EDTA. Heparina plasma NO se recomienda para esta técnica. Otros anticoagulantes no han sido probados.

FUNCIONAMIENTO DEL ENSAYO

Límites

LOD: El límite de detección (LOD) para la técnica Bb Plus es 0,018 µg/mL, determinada por el límite de 3SD en el estudio del calibrador cero.

LLOQ: El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para la técnica Bb Plus es 0,033 µg/mL, la concentración más baja de la curva de calibración que cumple los criterios de NCCLS.

ULOQ: El límite superior de cuantificación (ULOQ) para la técnica Bb Plus es 0,836 µg/mL, la concentración más elevada que cumple los criterios de NCCLS.

Interferencias

Na⁺ Heparina a 14 U/mL (concentración de los tubos de plasma-Heparina) interfiere con la técnica Bb Plus y no está recomendada para su utilización como anticoagulante en la recolección de las muestras.

Las siguientes sustancias fueron analizadas con las concentraciones especificadas en el ensayo de Bb Plus y no se comprobaron interfiere con el ensayo:

Sustancia	Concentración
Bilirubina	40 mg/dL
Hemoglobina	500 mg/dL
Los Triglicéridos	3000 mg/dL
Albumina	6000 mg/dL
Glucosa	1200 mg/dL
Colesterol	500 mg/dL

Precisión

La precisión Intra-ensayo y Inter-ensayo fue determinada con 20 réplicas de 2 muestras de plasma y 2 muestras de suero en 10 ciclos diferentes.

Muestra	Bb (µg/mL)	Intra-ensayo ¹ C.V. (%)	Inter-ensayo ² C.V. (%)
EDTA Plasma	1,550	2,4	7,7
	0,517	2,5	6,7
Suero	2,129	3,1	6,2
	2,375	4,0	9,1

¹n = 20 réplicas ²n = 10 ciclos

Linealidad

La linealidad fue determinada por la dilución seriada de muestras y comparando los valores observados y esperados. Resultados típicos proveídos ensequida:

Muestra	Factor de Dilución	Observado Bb (µg/mL)	Esperado Bb (µg/mL)	Recuperación (%)
EDTA Plasma	1:10	0,160	*	*
	1:16	0,107	0,100	106,9%
	1:20	0,079	0,080	98,7%
	1:32	0,052	0,050	103,9%
Suero 1	1:20	0,161	*	*
	1:32	0,103	0,101	102,0%
	1:40	0,069	0,081	85,4%
	1:64	0,044	0,050	87,2%
Suero 2	1:20	0,597	*	*
	1:25	0,467	0,478	97,7%
	1:30	0,420	0,398	105,4%
	1:40	0,310	0,299	103,8%
	1:50	0,230	0,239	96,2%
	1:60	0,196	0,199	98,4%
	1:80	0,133	0,149	89,0%

VALORES DE MUESTRAS

EDTA plasma de treinta y seis (36) donantes y suero de cuarenta y nueve (49) donantes normales fueron probados con el kit de inmunoensayo enzimático MicroVue Bb Plus. Los resultados se presentan abajo.

	n	Media (µg/mL)	RANGO (µg/mL)	
			± 2 SD	± 3 SD
EDTA Plasma	36	0,96	0,49-1,42	0,26-1,65
Suero	49	3,53	0,80-6,26	0,0-7,62

Nota: El comportamiento de la media y la Desviación Estandar (SD) de las concentraciones del fragmento Bb determinada de muestras de plasma y suero pueden variar entre laboratorios. Se recomienda que cada laboratorio determine la media y la desviación estandar de las concentraciones de fragmento Bb

ASISTENCIA

Para hacer un pedido u obtener servicio técnico, comuníquese con un representante de Quidel al 800.874.1517 (en los Estados Unidos) o al 858.552.1100 (fuera de los Estados Unidos), de lunes a viernes,

de 8:00 a. M. A 5:00 p. M., hora de la costa este. También pueden realizarse pedidos por fax al 740.592.9820. Para solicitar asistencia por correo electrónico, envíe un correo electrónico a customerservice@quidel.com o a technicalsupport@quidel.com.

Para obtener asistencia fuera de los Estados Unidos, comuníquese con su distribuidor local. Puede obtener información adicional sobre Quidel, nuestros productos y nuestros distribuidores en el sitio web: quidel.com.

REFERENCIAS

1. Schreiber, R.D. and Müller-Eberhard, H.J. 1980. New developments in the activation of the alternative pathway of complement. In: *Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980's*. Alan R. Liss, Inc., New York. p.411.
2. Gotze, O. and Müller-Eberhard, H.J. 1976. The alternative pathway of complement activation. *Adv. Immunol.* 24:1.
3. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1980. Current concepts in immunology: the alternative pathway of complement – a system for host resistance to microbial infection. *New Engl. J. Med.* 303: 259
4. Pangburn, M.K. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol* 7:163.
5. Ratnoff, W.E., Fearon, D.T., and Austen, K.F. 1983. The role of antibody in the activation of the alternative complement pathway. *Springer Semin Immunopathol* 6:361.
6. Hugli, T.E. 1986. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *Complement* 3:111
7. Fearon, D.T. and Austen, K.F. 1977. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 74:1 1683.
8. Fearon, D.T. 1979. Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 76: 5867.
9. Fishelson, Z. and Müller-Eberhard, H.J. 1984. Residual hemolytic and proteolytic activity expressed by Bb after decay-dissociation of C3b,Bb. *J. Immunol.* 132:1425.
10. Gotze, O., Bianco, C. and Cohn, Z.A. 1979. The induction of macrophage spreading by Factor B of the properdin system. *J. Exe. Med.* 149:372.
11. Sundsmo, J.S. and Wood, L.M. 1981. Activated factor B(Bb) of the alternative pathway of complement activation cleaves and activates plasminogen. *J. Immunol.* 127:877.
12. Kolb, W.P., Morrow, P.R. and Tamerius, J.D. 1989. Ba and Bb Fragments of Factor B activation: Fragment production, biological activities, neoepitope expression and quantitation in clinical samples. *Complement and Inflammation* 6:175.
13. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
14. Sefton, M.V., et al. 1994. "Using ELISA to evaluate complement activation by reference biomaterials" *J. Mat. Sci* 5:622-627,.
15. Mold, C. Tamerius, J.D., et al. 1995 "Complement activation during painful crisis in sickle cell anemia" *Clinical Immunology and Immunopathology* 70:3,314-320.
16. Manzi, S. Rairie, J. et al. 1996 "Sensitivity and Specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity" *Arthritis and Rheumatism* 39(7)1178-1188.
17. J.Jarvis, Taylor, H. 1994. "Complement activation and immune complexes in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis: a longitudinal study" *J Rheumatology* 21(6) 1124-1127.
18. Aggarwaal, et al. 2000. "Evidence for activation of the alternative complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis" *Rheumatology* 39:189-192.
19. J. Buyon, Tamerius J. et al. 1992. "Assessment of Disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus" *Arthritis and Rheumatism* 35(9) 1028-1036.
20. D. Shaw, Rustagi, P. et al. 1997. "Effects of Synthetic Oligonucleotides on human complement and coagulation" *Biochemical Pharmacol* 53(8)1123-1132.
21. Mollnes, T.E., et al. 1999. "Complement activation in patients with systemic lupus erythematosus without nephritis" *Rheumatology* 38:933-940.

22. Sturfelt, G, Truedsson, L. 2005. "Complement and its breakdown products in SLE" *Rheumatology* 44:1227-1232.
23. Alexander, J.J. et al. 2005. "Complement-dependent apoptosis and inflammatory gene changes in murine lupus cebritis" *J. Immunology* 175:8312-8319.
24. Thurman, J., Holers, V.M. 2006. "The central role of the alternative pathway in human disease" *J. Immunology* 176:1305-1310.
25. Pawluczkwycz, A.W et al. 2007. "Hematin promotes complement alternative pathway-mediated deposition of C3 activation fragments on human erythrocytes: potential implications for the pathogenesis of anemia in malaria" *J. Immunology* 179:5543-5552.
26. Atkinson, C. et al. 2008. "Low-dose targeted complement inhibition protects against renal disease and other manifestations of autoimmune disease in MRL/lpr mice" *J. Immunology* 180:1231-1238.

REF A027 – MicroVue Bb Plus Fragment EIA Kit



MDSS GmbH
 Schiffgraben 41
 30175 Hannover,
 Germany



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

PIA027002ES00 (02/17)

GLOSARIO

REF

Número del catálogo



Marca CE de conformidad

EC REP

Representante autorizado
en la Comunidad Europea

LOT

Código de lote



Fecha de caducidad



Fabricante



Limites de temperatura



Indicaciones



Consulte los instrucciones
e-etiquetado de uso



Riesgo biológico

IVD

Para uso diagnóstico *in vitro*



Contiene una cantidad suficiente para
96 determinaciones

CONT

Contenido / Contiene

CONTROL

Control