

Enzym-Immunoassay für die quantitative Bestimmung von C4d-haltigen Fragmenten von aktiviertem C4 des klassischen Komplementwegs

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

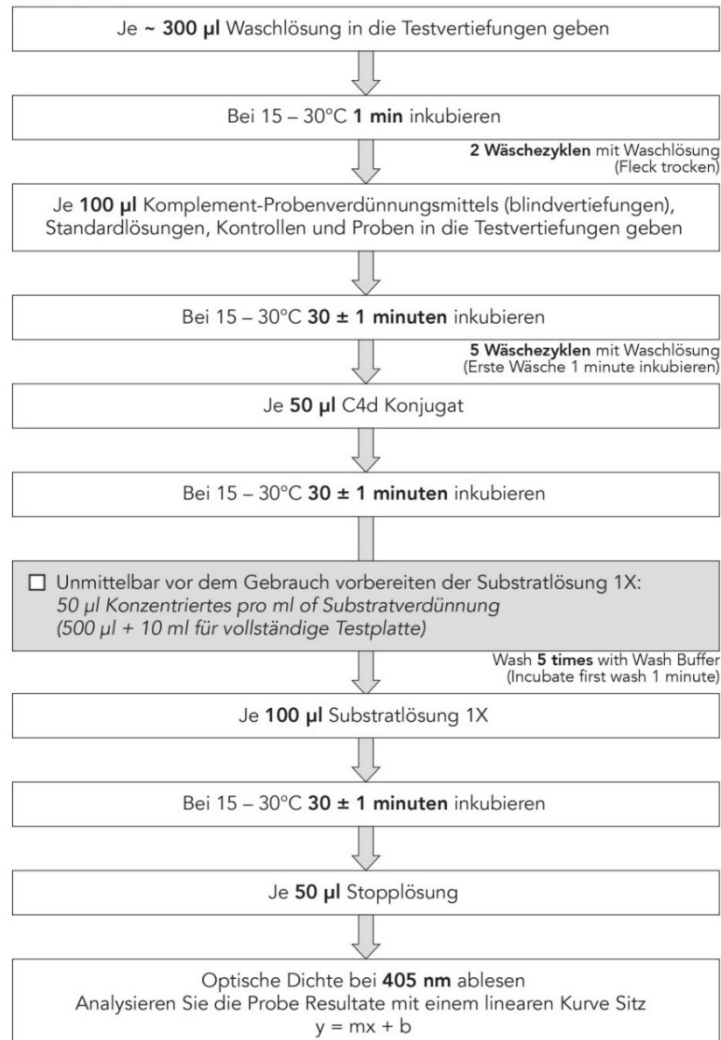
Eine Erklärung zu den Symbolen finden Sie unter quidel.com/glossary.

ZUSAMMENFASSUNG

Vorbereitung von Reagenzien, Kontrollen und Proben

- Konzentrierte Waschlösung verdünnen 1:20 mit vollentsalztem Wasser
- Jede Standardlösungen und Kontrollen wiederherstellen mit 2,0 ml Hydrierungsreagenz (*ließ sitzen für 15 Minuten, und leicht mischen bevor dem Verwenden*)
- Proben verdünnen 1:70 mit Komplement-Probenverdünnungsmittel (10 µl + 690 µl) (*Je in die Testvertiefungen geben innerhalb 30 Minuten*)

Testverfahren



ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Mit dem MicroVue C4d Fragment Enzym-Immunoassay kann die Konzentration C4d-haltiger Aktivierungsfragmente von C4(C4b, iC4b und C4d) in Humanserum, EDTA-Plasma und anderen biologischen oder experimentellen Proben bestimmt werden.

Der vierte Komplementfaktor ist eines der Plasmaproteine, das für den klassischen Weg der Komplementaktivierung charakteristisch ist.¹ Der klassische Weg der Aktivierung wird dadurch ausgelöst, dass die C1q-Untereinheiten von C1 an IgG- oder IgM-haltige Immunkomplexe gebunden werden. Darüber hinaus wird C1 durch eine Vielzahl anderer Substanzen gebunden und aktiviert, so auch durch Retroviren, bestimmte Bakterien, Parasiten, transformierte Zellen, subzelluläre Membranen, Polyanionen (DNA) und C-reaktive, mit Phosphorylcholin komplexierte Proteine.² Die dem klassischen Weg folgende Bindung von C1 an diese Aktivatoren führt zur Umwandlung der zymogenen Untereinheit C1s in ein aktives, proteolytisches Enzym (C1s). Die α -Kette des C4 wird durch das C1s an Peptidbindung 77 gespalten, wodurch die Fragmente C4a und C4b mit einem Molekulargewicht von jeweils 9.000 und 191.000 gebildet werden. Das C4a-Fragment gehört zu den Komplement-Anaphylatoxinen.³ Seine Aktivität ist in zahlreichen biologischen Prozessen von Bedeutung.^{1,4} Dazu gehören die Begünstigung der Phagozytose von komplementaktivierenden Zielen durch die Leukozyten (Opsonisierung) und die Beteiligung an der C3- und C5-Konvertase beim klassischen Weg der Aktivierung, was wiederum zur Aktivierung terminaler Komplementfaktoren mit anschließender, durch Komplement bewirkte Lyse von Zielmikroorganismen und anderen Zellen führt.

Die Expression der biologischen Aktivitäten von C4b unterliegt festen Regeln. Die Fähigkeit von C4b, im Rahmen des klassischen Wegs der Aktivierung und der Opsonisierung tätig zu werden, wird daher durch die durch Faktor I bedingte Spaltung der C4b- α -Kette, die an einer einzigen Bindungsstelle stattfindet, gehemmt.⁵ Für die Reaktion wird entweder das C4-Bindungsprotein (C4bp)⁶ oder der Komplementrezeptor CR1 als Cofaktor benötigt.^{7,8} C4bp ist ein Komplement-Kontrollprotein⁹ und CR1 ist der C3b-/C4b-Rezeptor, der auf Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu finden ist.⁸ Die durch Faktor I bewirkte Spaltung von C4b führt zu inaktiviertem C4b, das als iC4b bezeichnet wird.⁷⁻¹⁰ iC4b kann durch Faktor I mit der Unterstützung von C4bp oder CR1 zu C4c- und C4d-Fragmenten weiter abgebaut werden.⁶⁻¹⁰ Bei den C4c- und C4d-Fragmenten, die sowohl in der Flüssigkeitsphase als auch auf der Zieloberfläche gebildet werden können, scheint es sich dabei um die Endprodukte der physiologischen C4b-Zersetzung zu handeln.^{1,6-10}

C4d wurde in Humanserum und Plasmaproben quantitativ bestimmt. Die für endogenes C4 normalisierten C4d-Konzentrationen können in Plasmaproben von Patienten, die an rheumatoider Arthritis, hereditären Angioödem, systemischem Lupus erythematosus (SLE) oder chronischer Urtikaria mit Hypokomplementämie leiden, deutlich erhöht sein.^{11,12} Zudem kann die C4d Konzentration in Körperflüssigkeiten¹³ und Plasmaproben erhöht sein, die von anderen Patienten stammen, von denen bekannt ist, dass eine nach dem klassischen Weg ablaufende Aktivierung stattfindet, so z. B. bei Patienten mit einer Reihe humoraler Autoimmunkrankheiten¹⁴, Sepsis, thermischen Verletzungen, traumatischen Verletzungen mehrerer Organe, Myokardinfarkt, hereditären Angioödem, Glomerulonephritis und akutem Lungenversagen. Eine Korrelation zwischen der Konzentration von C4d-Aktivierungsfragmenten und dem klinischen Status bzw. der klinischen Prognose für Patienten, die an diesen und anderen Krankheiten leiden, konnte noch nicht nachgewiesen werden.

Der MicroVue C4d Fragment Enzym-Immunoassay bietet eine schnelle Methode für die Bestimmung der C4-Aktivierung, die quantitativ, hochspezifisch und nicht radioaktiv ist. Dieser Test ist daher sowohl für Forschungsanwendungen vorgesehen, in deren Rahmen die Bedeutung oder der Status des klassischen Wegs der Komplementaktivierung untersucht werden soll, als auch für die *In-Vitro*- oder *In-Vivo*-Überwachung der Bildung von C4d-haltigen Fragmenten.

FUNKTIONSPRINZIP

Der MicroVue C4d Fragment Enzym-Immunoassay ist ein in drei Phasen ablaufender Test zur quantitativen Bestimmung von C4d in Humanserum, Humanplasma oder experimentellen Proben. Er beruht auf (1.) einer mit einem monoklonalen Antikörper (Maus) beschichteten Mikroassay-Platte, durch die C4d-haltige Aktivierungsfragmente von humanem C4 spezifisch gebunden werden, (2.) HRP-konjugiertem, antihumanem C4d von Ziegen und (3.) einem chromogenen Substrat.

In der ersten Phase werden die Standardlösungen, Kontrollen und Proben in die mit monoklonalem Antikörper gegen C4d beschichteten Mikroassay-Vertiefungen gegeben. Das in den Standardlösungen, Kontrollen oder Proben vorliegende C4d wird an das immobilisierte Anti-C4d gebunden. Nach der Inkubation wird ungebundenes Konjugat im Waschschrift entfernt.

In der zweiten Phase wird an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierter Antikörper gegen C4d (Ziege) in die verschiedenen Testvertiefungen gegeben. Das enzymkonjugierte Anti-C4d wird an C4d gebunden, das durch das an die Oberfläche der Mikroassay-Vertiefungen gebundene monoklonale Anti-C4d erfasst wurde. Nach der Inkubation wird das ungebundene, überschüssige Konjugat im Waschschrift entfernt.

In der dritten Phase wird ein chromogenes Enzymsubstrat in die Mikroassay-Vertiefungen gegeben. Das gebundene HRP-Konjugat reagiert mit dem Substrat und bildet eine grüne Färbung. Die Enzymreaktion wird nach der Inkubation chemisch gestoppt und die Farbintensität bei 405 nm spektrophotometrisch gemessen. Die Farbintensität der Reaktionsmischung ist proportional zur C4d-Konzentration in den Proben, Standardlösungen und Kontrollen.

REAGENZEN UND MITGELIEFERTE MATERIALIEN

96 Bestimmungen für C4d-Fragmente

Das MicroVue C4d Fragment EIA-Kit enthält folgende Komponenten:

A	C4d-Standardlösungen	Artikelnr. A4638 – A4642	5 x 2 ml
	(lyophilisiert) Enthält Humanserum mit bekannten Mengen von C4d-haltigen Fragmenten in		
E	phosphatgepufferter Kochsalzlösung und Proteinstabilisatoren		
H	Hohe Kontrollen	Artikelnr. A9572	2 x 2 ml
	(lyophilisiert) Enthält Humanserum mit C4d-haltigen Fragmenten in phosphatgepufferter		
	Kochsalzlösung und Proteinstabilisatoren		
L	Niedrige Kontrollen	Artikelnr. A9573	2 x 2 ml
	(lyophilisiert) Enthält Humanserum mit C4d-haltigen Fragmenten in phosphatgepufferter		
	Kochsalzlösung und Proteinstabilisatoren		
1	Beschichtete Teststreifen	Artikelnr. A9567	je 12
	12 Teststreifen mit jeweils 8 Vertiefungen, beschichtet mit einem monoklonalem Antikörper (Maus),		
	der für humanes C4d spezifisch ist, in einem wiederverschließbaren Kunststoffbeutel		
2	Stopplösung	Artikelnr. A3673	6 ml
	Enthält 250 mmol/l Oxalsäure		
3	20fach konzentrierte Waschlösung	Artikelnr. A9957	2 x 50 ml
	Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 1,0% Tween-20® und 0,035% ProClin® 300		
4	Probenverdünnungsmittel	Artikelnr. A3670	50 ml
	Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 0,05% Tween-20, Proteinstabilisatoren und 0,035%		
	ProClin 300		
5	Substratverdünnung	Artikelnr. A3672	25 ml
	Enthält 0,1 mol/l Zitratpuffer und 0,05% H2O2		

- | | | | |
|----------|---|-------------------------|-----------------|
| 6 | Konzentriertes Substrat
Enthält 0,7% 2-2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazolinsulfonsäure)-diammoniumsals | Artikelnr. A3671 | 1,5 ml |
| 7 | C4d-Konjugat
Enthält peroxidase-konjugiertes, antihumanes C4d (Ziege) in einem stabilisierenden HRP-Puffer mit Konservierungsmittel | Artikelnr. A9945 | 2 x 3 ml |
| 8 | Hydrierungsreagenz
Enthält 0,035% ProClin 300 | Artikelnr. A3675 | 25 ml |

Tween-20® ist eine Marke von ICI Americas Inc.

ProClin® ist eine eingetragene Marke der Rohm and Haas Company.

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG)

- Stoppuhr (über einen Zeitraum von 60 Minuten)
- Taschenrechner oder anderes Rechenverfahren zum Validieren der Testergebnisse
- Saubere, unbenutzte Mikroassay-Platten und/oder Teströhrchen und Ständer
- Behälter für die Waschpufferverdünnung
- Waschflasche oder anderes für Immunassays geeignetes Waschsystem
- Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanäle) 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
- Vollentsalztes oder destilliertes Wasser

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur für Forschungszwecke in den USA. Nicht als diagnostisches Verfahren geeignet (nur in den USA).
- Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln. Beim Arbeiten mit diesem Kit und den Proben allgemein gültige Vorsichtsmassnahmen befolgen.
- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit und örtlich geltender Bestimmungen entsorgen.
- Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen beim Arbeiten mit diesem Kit.
- Die Reagenzien des Assays wie angegeben lagern.
- Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
- Jede Probe mit Duplikaten testen.
- ProClin 300 wird als Konservierungsmittel verwendet. Der unbeabsichtigte Kontakt mit Pufferlösungen oder Reagenzien, die ProClin enthalten, bzw. Deren Einnahme kann zu Reizungen der Haut, der Augen oder des Mundes führen. Die Anforderungen guter Laborpraxis beachten, um die Exposition möglichst gering zu halten. Beim Auftreten der ersten Symptome einen Arzt aufsuchen.
- Alle Spendereinheiten, die für die Standardlösungen und Kontrollseren dieses Produkts verwendet werden, wurden mit einer vom FDA zugelassenen Methode auf Antikörper gegen HIV (HIV1 und HIV2), Hepatitis-CViren und HBsAg untersucht. Da keine Testmethode mit 100%iger Sicherheit garantieren kann, dass keine infektiösen Substanzen vorliegen, sollten diese Reagenzien wie alle potenziell infektiösen Humanserum- oder Blutproben gemäß Biosafety Level 2 behandelt werden. Dementsprechende Empfehlungen sind im Handbuch „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“, 2007, Center for Disease Control/National Institutes of Health, beschrieben.
- Für ein zügiges und effizientes Dosieren von Flüssigkeiten 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 *ENTNAHME UND LAGERUNG DER PROBEN*).

- Eine mikrobielle Kontamination bzw. Kreuzkontamination der Proben und Reagenzien ist zu vermeiden.
- Die Mikroassay-Vertiefungen jeweils nur für eine Bestimmung verwenden.
- Alle Proben, Reagenzien und Materialien dekontaminieren, indem sie 30 Minuten in einer 1:10-Lösung von haushaltsüblichem Bleichmittel (Natriumhypochlorit) eingeweicht oder bei 121°C und 1,03 bar 30 Minuten autoklaviert werden.
- Durch die Verwendung von Inkubationszeiten und -temperaturen, die von den unter *TESTVERFAHREN* gegebenen Werten abweichen, können falsche Ergebnisse auftreten.
- Das konzentrierte Substrat muss vor hellem oder direktem Licht geschützt werden.
- Die Mikroassay-Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
- Beim Entfernen von Flüssigkeiten von den Mikroassay-Vertiefungen nicht den Boden der Vertiefungen ankratzen oder berühren.
- Hitzeinaktivierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
- Hyperlipämische oder kontaminierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
- Um beim Waschen die Bildung von Aerosolen zu vermeiden, eine Vorrichtung verwenden, mit der die Waschflüssigkeit in eine Flasche mit haushaltsüblichem Bleichmittel gesaugt wird.
- Zum Waschen der Platte eine Waschflasche oder ein automatisiertes Dosiergerät verwenden (siehe *TESTVERFAHREN*, Schritt 6). Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassay-Platte verwenden.
- Testverfahren in Bereichen mit angemessener Belüftung durchführen.
- Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
- Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt (SDB) auf quidel.com, um weitere Informationen zu Gefahrensymbolen, Sicherheit, Handhabung und Entsorgung der Komponenten in diesem Kit zu erhalten.

LAGERUNG

Ungeöffnetes Kit bei 2°C bis 8°C aufbewahren. Alle Reagenzien vor dem Gebrauch auf 15°C bis 30°C bringen. Die nicht benötigten Mikroassay-Teststreifen wieder in den Beutel legen, den Beutel verschließen und bei 2°C bis 8°C lagern.

ANZEICHEN FÜR INSTABILITÄT ODER ZERSETZUNG DER REAGENZIEN

Das konzentrierte Substrat kann farblos sein oder eine Farbe von blass- bis dunkelgrün annehmen. Die frisch angesetzte Substratlösung sollte jedoch farblos oder blassgrün sein. Eine dunkelgrüne Farbe zeigt an, dass das Reagenz Zersetzungserscheinungen aufweist und entsorgt werden muss. Es muss dann eine neue Substratlösung in einem sauberen Glasbehälter angesetzt werden.

Eine Trübung der Waschlösung weist auf eine Zersetzung dieses Reagenzes hin. Die Lösung sollte in diesem Fall entsorgt werden.

ENTNAHME UND LAGERUNG DER PROBEN

Beim Arbeiten und Entsorgen der Proben die allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Entnahme, Bearbeitung und Lagerung der Proben müssen fachgerecht durchgeführt werden, da C4d bei unsachgemäß entnommenen und gelagerten Proben proteolyseanfällig ist.

Die Normalwerte von Serumproben sind etwas höher als die der entsprechenden EDTA-Plasmaproben. Die C4d-Konzentrationen in EDTA-Plasma sind daher u. U. besser mit den tatsächlichen *In-Vivo*-Konzentrationen vergleichbar.

Serum- und EDTA-Plasmaproben sollten gemäß Standardverfahren unter keimfreien Bedingungen entnommen werden. Die Proben sollten umgehend getestet oder bei 4°C bzw. auf Eis gelagert werden. Diese kurzzeitige Lagerung auf Eis sollte jedoch auf vier Stunden beschränkt sein.

Für längere Lagerzeiten sollten Serum- und Plasmaproben innerhalb von 2 Stunden nach der Entnahme bei -70°C oder tieferen Temperaturen eingefroren werden. Eingefrorene Proben sollten unmittelbar nach dem Auftauen getestet oder bis zum Testen auf Eis (nicht länger als vier Stunden) gelagert werden.

Humanserum- und Plasmaproben können auch mit einem Probenstabilisator (Artikelnr. A9576) präpariert werden. Mit diesem Produkt, das nur von Quidel erhältlich ist, muss die Probe vor dem Einfrieren im Verhältnis 1:1 verdünnt werden. Weitere Informationen zu diesem Probenstabilisator sind auf Anfrage erhältlich.

Eingefrorene Proben sollten unmittelbar nach dem Auftauen getestet oder bis zum Testen auf Eis (nicht länger als vier Stunden) gelagert werden. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen wird nicht empfohlen.

VORBEREITUNG VON REAGENZIEN

Alle Reagenzien und Materialien vor dem Gebrauch auf 15°C bis 30°C bringen.

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

Die Mengen an Reagenzien und Materialien, die für eine bestimmte Anzahl von Bestimmungen erforderlich sind, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Waschlösung

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

Entnehmen der Mikroassay-Teststreifen

Die für den Test erforderliche Anzahl der Teststreifen bestimmen. Blindvertiefungen, Kontrollen und Standardlösungen sollten in Doppelbestimmungen getestet werden. Die Teststreifen-Feststelleinrichtung von der Platte entfernen. Die nicht benötigten Teststreifen entnehmen und in den Beutel legen. Den Beutel wieder verschließen und bei 2°C bis 8°C aufbewahren. Die für den Test zu verwendenden Teststreifen befestigen.

Wiederherstellen der C4d-Standardlösungen und Kontrollen

In die Standardfläschchen (A-E) sowie die niedrige und hohe Kontrolle je 2,0 ml Hydrierungsreagenz geben. Die wiederhergestellten Fläschchen mindestens 15 Minuten bei 15°C bis 30°C rehydrieren lassen und dann gründlich mischen. Darauf achten, dass sich beim Mischen kein Schaum und keine Blasen bilden. Die wiederhergestellten Standardlösungen und Kontrollen sind — die Lagerung bei 2°C bis 8°C vorausgesetzt — für 30 Tage stabil.

Probenverdünnung

Vorsicht: Beim Arbeiten mit Proben die allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten. Hitzeinaktivierte, kontaminierte oder falsch gelagerte Proben dürfen nicht verwendet werden.

Alle Proben mit Komplement-Verdünnungsmittel auf ein geeignetes Verhältnis verdünnen (siehe Berechnung Der Ergebnisse). Für normale Proben wird ein Verdünnungsverhältnis von 1:70 empfohlen. Gründlich mischen, dabei jedoch die Bildung von Schaum und Blasen vermeiden. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden.

Hinzugeben der verdünnten Proben in die Mikrotiter-Vertiefungen

Zum Hinzugeben der verdünnten Proben, Standardlösungen, Kontrollen und Pufferlösungen in die Vertiefungen stehen zwei Methoden zur Verfügung (siehe Schritt 4 unter *TESTVERFAHREN*). Bei kleinen Testserien, die aus einer geringen Anzahl von Proben bestehen, können die verdünnten Proben und andere Reagenzien mit einer Mikropipette (100 µL/Vertiefung) direkt in die vorgesehenen Vertiefungen gegeben werden. Für kleine und umfangreiche Testdurchläufe, besonders jedoch für letzteren Fall, sollten zum Hinzugeben der Proben wie folgt Mehrkanalpipetten verwendet werden. (Auch für die Zugabe von Konjugat, Substrat und Stopplösung kann eine Mehrkanalpipette verwendet werden.)

Um die Aufgabe von Standardlösungen, Kontrollen und verdünnten Proben in die Mikroassay-Vertiefungen so schnell wie möglich zu gestalten, kann ein „Doppelplattenverfahren“ eingesetzt werden. Anstelle der Zugabe von jeweils 100 µL Standardlösung, Kontrolle und verdünnter Probe in die verschiedenen, mit Antikörpern beschichteten Vertiefungen werden dabei 120–130 µL jeder Lösung in der gewünschten EIA-Anordnung in die verschiedenen Vertiefungen einer inaktiven Platte (nicht im Lieferumfang enthalten) gegeben. Nachdem alle zu testenden Lösungen in die Vertiefungen der inaktiven Mikroassay-Platte gegeben wurden, werden nun mit einer Mehrkanal-Mikropipette von jeder Vertiefung der inaktiven Platte 100 µL in die Vertiefungen der aktiven — d. h. mit Antikörper beschichteten Platte — überführt. Um das Risiko von Kreuzkontaminationen möglichst gering zu halten, müssen die Pipettenspitzen immer dann ausgewechselt werden, wenn sich die Zusammensetzung der zu überführenden Proben ändert.

Vorbereiten der Substratlösung

Erst unmittelbar vor Gebrauch vorbereiten. Das erforderliche Volumen der Substratlösung anhand von Tabelle 1 bestimmen. (Pro Teststreifen werden 1 ml Substratlösung d. h. 125 µL/Vertiefung benötigt.) Die Substratlösung vorbereiten, indem für jeden ml der Substratverdünnung 50 µL konzentriertes Substrat hinzugegeben wird. Gründlich mischen. Die Substratlösung erst in Schritt 8 des Testverfahrens vorbereiten. Wenn sich die Substratlösung vor der Verwendung dunkelgrün verfärbt, muss sie entsorgt und durch eine frische Lösung in einem sauberen Behälter ersetzt werden.

Tabelle 1. Benötigte Reagenzien

Vertiefung ¹	Teststreifen (8 Vert.)	Substratlösung (ml)	Konzentr. Substrat (µL)
16	2	2,0	100
24	3	3,0	150
32	4	4,0	200
40	5	5,0	250
48	6	5,0	250
56	7	6,0	300
64	8	7,0	350
72	9	8,0	400
80	10	9,0	450
88	11	9,0	450
96	12	10,0	500

¹Die Anzahl der zu testenden Proben bestimmen und fünfzehn (15) Vertiefungen für die fünf Standardlösungen, die zu testenden niedrigen und hohen Kontrollen (in Duplikaten) sowie eine Blindvertiefung hinzufügen. Duplizierte Standardlösungen und Kontrollen sollten, sofern möglich, auf separaten Mikroassay-Teststreifen getestet werden.

TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

Siehe hierzu auch VORBEREITUNG VON REAGENZIEN und WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN.

1. Die Positionen der Blindvertiefungen, aller Proben, Standardlösungen und Kontrollen sowie die auf den Flaschenetiketten angegebenen Chargennummern schriftlich festhalten. Die Ausrichtung der Mikroassay-Platte durch die Markierung einer Plattenecke festhalten.
2. Die Mikroassay-Teststreifen wie folgt vorbereiten:
 - a. Die Mikroassay-Vertiefungen rehydrieren, indem mit einer Waschflasche oder einem automatisierten Dosiergerät in jede Vertiefung 250-300 µL Waschlösung gegeben wird.
 - b. Bei 15°C bis 30°C für eine Minute inkubieren.
 - c. Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - d. Ungefähr 250-300 µL Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - e. Den Inhalt der verschiedenen Vertiefungen absaugen.
 - f. Die Schritte d-e einmal wiederholen.**
 - g. Die Platte umdrehen und zweimal vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
3. Eine oder mehrere Vertiefungen als Blindvertiefung auswählen. 100 µL des Probenverdünnungsmittels in diejenige(n) Vertiefung(en) geben, die zur Bestimmung des Nullwertes des Plattenlesegeräts verwendet werden sollen (die sog. Blindvertiefungen).
4. Je 100 µL der wiederhergestellten C4d-Standardlösungen (A, B, C, D und E), Kontrollen und der verdünnten Proben in die entsprechenden Vertiefungen geben.
5. Bei 15°C bis 30°C für 30 ± 1 Minuten inkubieren.
6. Die Mikroassay-Vertiefungen wie folgt waschen:
 - a. Nach der Inkubation von Schritt 5 (und Schritt 8 — siehe unten) die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - b. Mit einer Waschflasche oder einem automatisierten Dosiergerät ungefähr 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - c. Die Vertiefungen bei 15°C bis 30°C für 1 Minute inkubieren.
 - d. Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - e. Ungefähr 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - f. Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - g. Die Schritte e-f dreimal wiederholen.**
 - h. Die Platte nach dem fünften Waschschrift umdrehen und zweimal vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
7. Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette jeweils 50 µL des C4d-Konjugats in die gewaschenen Testvertiefungen und die Blindvertiefungen geben.
8. Die Mikroassay-Teststreifen bei 15°C bis 30°C für 30 ± 1 Minuten inkubieren. Während dieser Inkubation die Substratlösung vorbereiten (siehe *VORBEREITUNG VON REAGENZIEN*).
9. Die Mikroassay-Vertiefungen nach der 30 Minuten dauernden Inkubation (Schritt 8) wie in Schritt 6 unter *TESTVERFAHREN* beschrieben waschen.
10. Unmittelbar nach dem Waschschrift je 100 µL der frisch angesetzten Substratlösung in die Vertiefungen und Blindvertiefung(en) geben.
11. Die Mikroassay-Teststreifen bei 15°C bis 30°C für 30 ± 1 Minuten inkubieren.
12. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion je 50 µL Stopplösung in die Vertiefungen geben. Die Zugabe der Stopplösung in die Vertiefungen sollte in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgen wie bei der Zugabe der Substratlösung. Die Platte vorsichtig antippen, damit sich die Farbentwicklung gleichmäßig verteilt.
13. Innerhalb von einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung (Schritt 12) die Extinktion der Testvertiefungen bei 405 nm bestimmen (E_{405} -Wert) und eine Blindwertkorrektur vornehmen.
14. Die Konzentration der Proben und Kontrollen anhand der Standardkurve bestimmen.
15. Die verbleibenden verdünnten Proben und Kontrollen sowie die benutzten Mikroassay-Teststreifen entsorgen (siehe *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*).

QUALITÄTSKONTROLLE

Gemäß guter Laborpraxis sollten Kontrollen verwendet werden, um die Richtigkeit der Testergebnisse zu gewährleisten. Zu diesem Zweck enthält das C4d Fragment EIA Kit hohe und niedrige Kontrollen. Diese

Kontrollen sollten pro Kit mindestens einmal getestet werden. Zudem wird auf der Packungsbeilage angegeben, dass die Eichgerade, die mit den Standardlösungen des Testkits erstellt wurde, strengen Validierungsanforderungen gerecht werden muss. Erfüllt der Test diese Anforderungen nicht, den Test wiederholen oder den technischen Service von Quidel verständigen.

Das diesem Kit beiliegende Analysezertifikat ist chargenspezifisch und soll sicherstellen, dass die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse denen von Quidel entsprechen. Die gegebenen Extinktionswerte sollen lediglich als Richtwerte dienen. Die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse können davon abweichen.

Die im Rahmen der Qualitätskontrolle zu verwendenden Bereiche sind angegeben. Die Kontrollwerte haben die Aufgabe, die Gültigkeit der Kurve und der Probenergebnisse zu bestätigen. Jedes Labor sollte eigene Kriterien festlegen, nach denen die Testergebnisse anzunehmen sind. Wenn die Kontrollwerte nicht innerhalb der zulässigen Grenzwerte Ihres Labors liegen, sollten die Testergebnisse in Frage gestellt und die Proben wiederholt werden.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Berechnung der Ergebnisse

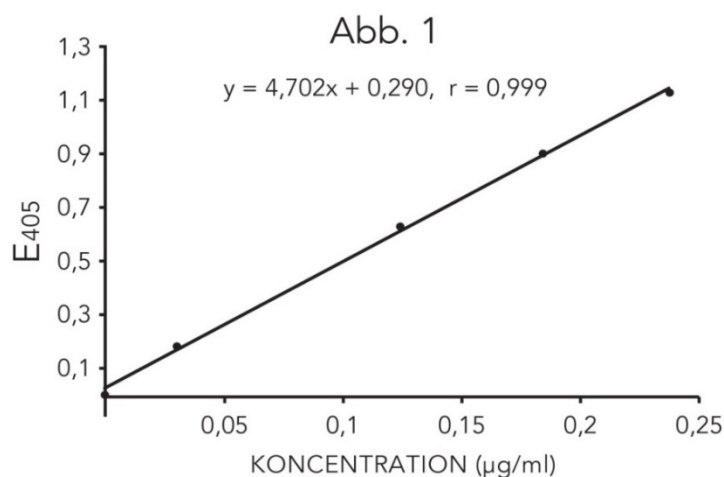
Es hat sich gezeigt, dass eine Verdünnung des normalen Humanplasmas und -serums im Verhältnis 1:70 mit dem C4d Fragment EIA Kit zu optimalen Ergebnissen führt. Bei einer Verdünnung der Plasma- und Serumproben über den Bereich von 1:40 bis 1:100 ist eine vollständige und genaue quantitative Bestimmung von C4d möglich. Bei einem Verdünnungsverhältnis normaler Plasma- und Serumproben von über 1:100 werden u. U. E_{405} -Werte unter 0,1 erhalten, die zu ungenauen Ergebnissen führen können.

Je nach Probenkonzentration und Versuchsbedingungen müssen die Proben u. U. weiter verdünnt werden (d. h. auf ein höheres Verdünnungsverhältnis), damit E_{405} -Werte erhalten werden, die innerhalb des Bereichs der Kit-Standardlösungen liegen. Die C4d-Konzentration kann dann berechnet werden. Die C4d-Konzentration kann jedoch auch als ein Wert angegeben werden, der — für die getestete Verdünnung — größer oder gleich der maximal berechenbaren Konzentration ist.

Verwendung der Eichgeraden: Die Eichgerade des C4d Fragment EIA wird mit den blindwert-korrigierten E_{405} -Werten der verschiedenen Standardlösungen (auf der y-Achse) und den entsprechenden Standardkonzentrationen (auf der x-Achse) erstellt. Nach der Durchführung der linearen Regression muss die erstellte Eichgerade den Validierungsanforderungen (siehe unten) gerecht werden. Diese Berechnungen werden von den meisten Rechnern und Taschenrechnern unterstützt.

Die Daten können auch ohne Rechnerunterstützung, d. h. zeichnerisch, in ein Diagramm eingetragen werden. Die Werte der Proben ($\mu\text{g/ml}$) werden dann von der durch die Punkte gelegten Gerade abgelesen. Ein Beispiel einer typischen Eichgerade ist in Abb. 1 dargestellt.

Repräsentative Standardkurve



Validierung

Die Steigung, den Schnittpunkt mit der y-Achse und den Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden bestimmen, die für die Standardlösungen des C4d Fragment EIA Kits berechnet wurden. Diese Werte müssen innerhalb der folgenden Bereiche liegen, damit der Test gültig ist:

korrelationskoeffizient (r): > 0,95
steigung (m): 3,32 bis 6,50
y-schnittpunkt (b): (-)0,056 bis 0,063

Der zulässige C4d-Konzentrationsbereich ist für die niedrigen und hohen Kontrollen auf den Fläschchen angegeben.

GRENZEN DER METHODE

Dieser Test ist ausschließlich für Forschungsanwendungen vorgesehen und sollte nicht für diagnostische Zwecke eingesetzt werden.

Der MicroVue C4d Fragment EIA wurde zum Testen von Proben eingesetzt, die als Serum oder Plasma in EDTA vorlagen. Andere Antikoagulanzen wurden nicht untersucht.

BEISPIELWERTE

Mit dem MicroVue C4d Fragment EIA wurden achtzig (80) EDTA-Plasmaproben und vierundfünfzig (54) Serumproben (beide 1:70 verdünnt in Probenverdunnungsmittel) getestet. Die Bereiche der Plasma- und Serumproben sind im Folgenden aufgeführt:

	n	Mittel	Bereich	
			± 2 SA	± 3 SA
Plasma - EDTA	80	3,5	0,7 µg-6,3 µg/ml	0-7,7 µg/ml
Serum	54	4,6	1,2 µg-8,0 µg/ml	0-9,7 µg/ml

LEISTUNGSMERKMALE DES TESTS

Grenzen

Nachweisgrenze: Die Nachweisgrenze des C4d-Tests liegt bei 0,001 µg/ml und wurde im Rahmen einer Nullstandardstudie an der 3fachen Standardabweichung festgelegt.

Untere Bestimmungsgrenze: Die untere Bestimmungsgrenze des C4d-Tests liegt bei 0,022 µg/ml. Dies entspricht der niedrigsten Konzentration der Eichkurve, die den NCCLS-Kriterien für Genauigkeit und Präzision noch gerecht wird.

Störsubstanzen

Natriumcitrat und Tetranatrium-EDTA wurden jeweils mit den Konzentrationen 1000 mg/dl und 800 mg/dl getestet. Sie stellen keine Störungen für diesen Test dar.

Präzision

Die intraindividuelle und interindividuelle Präzision wurde durch die Analyse von 3 Plasmaproben (20 Wiederholungen in 9 Serien) ermittelt.

C4d (µg/ml)	Intraindividuell ¹ C.V. (%)	Interindividuell ² C.V. (%)
4,4	9,7	11,2
4,7	7,4	8,8
7,9	6,1	8,5

¹n=20 wiederholungen ²n=9 serien

Linearität

Die Linearität wurde geprüft, indem eine hohe Plasmaprobe mit einer niedrigen Plasmaprobe in verschiedenen Verhältnissen gemischt wurde, so dass verschiedene intermediäre Analytkonzentrationen entstanden. Die mittlere Wiederfindungsrate betrug 92,7%, mit einem absoluten Bereich von 87,0% bis 99,0%.

UNTERSTÜTZUNG

Zum Bestellen oder für technischen Support wenden Sie sich bitte an einen Vertreter von Quidel unter 800 874 1517 (in den USA) oder 858 552 1100 (außerhalb der USA), Montag bis Freitag, von 8:00 bis 17:00 Uhr amerikanische Ostküstenzeit. Bestellungen können auch per Fax unter 740 592 9820 getätigt werden. Für Unterstützung per E-Mail wenden Sie sich an customerservice@quidel.com oder technicalsupport@quidel.com.

Informationen zum Serviceangebot außerhalb der USA erhalten Sie von Ihrer Vertretung vor Ort. Zusätzliche Informationen zu Quidel, unseren Produkten und Vertretungen finden Sie auf unserer Website www.quidel.com.

LITERATURVERWEISE

1. Müller-Eberhard, H.J. 1975. Complement. *Annu. Rev. Biochem.* 44:697.
2. Cooper, N.R. 1985. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol.* 37:151
3. Gorski, J.P., Hugli, T.E., and Müller-Eberhard, H.J. 1979. C4a: The third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc. Natl. Acad., Sci, (USA)* 76:5299.
4. Bokisch, V.A. and Sobel, A.T. 1974. Receptor for the fourth component of complement on human B lymphocytes and cultured human lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* 140: 1336.
5. Fearon, D.T. 1977. Purification of C3b inactivator and demonstration of its two polypeptide chain structure. *J. Immunol.* 119: 1248.
6. Scharfstein, J., Ferreira, A., Gigli, I., and Nussenzweig, V. 1978. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J. Exp. Med.* 148:207.
7. Medof, M.E., and Nussenzweig, V. 1984. Control of the function of substrate-bound C4b-C3b by the complement receptor Cr1. *J. Exp. Med.* 159:1669.
8. Ross, G.D., and Medof, M.E. 1985. Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3. *Adv. Immunol.* 37:217.
9. Fujita, T., Gigli, I., and Nussenzweig, V. 1978. Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b Inactivator. *J. Exp. Med.* 148: 1044.
10. Nagasawa, S., Ichihara, C., and Stroud, R.M. 1980. Cleavage of C4b by C3b inactivator: production of a nicked form of C4b, C4b', as an intermediate cleavage product of C4b by C3b inactivator. *J. Immunol.* 125:578.
11. Milgrom, H., Curd, J.G., Kaplan, R.A., Müller-Eberhard, H.J., and Vaughan, J.H. 1980. Activation of the fourth component of complement (C4): assessment by rocket immunoelectrophoresis and correlation with the metabolism of C4. *J. Immunol.* 124:2780.
12. Nitsche J. F., Tucker, E.S., Sugimoto, S., Vaughan, J.H., and Curd, J.G. 1981. Rocket immunoelectrophoresis of C4 and C4d. A simple sensitive method for detecting complement activation in plasma. *Am. J. Clin. Path.* 76:679.
13. Perrin, L.H., Shiraishi, S., Stroud, R.M., and Lambert, P.H. 1975. Detection and quantitation in plasma and synovial fluid of a fragment of human C4 with α mobility generated during the activation of the complement system. *J. Immunol.* 115:32.
14. Tucker, E.S. 1984. Complement activation in autoimmune disease. *J. Clin. Immunol.* 7:310.
15. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
16. Centers for Disease Control/National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. U.S. *Department of Health and Human Services*, 2007.

REF A008 – MicroVue C4d 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

PIA008002DE00 (08/19)

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
