

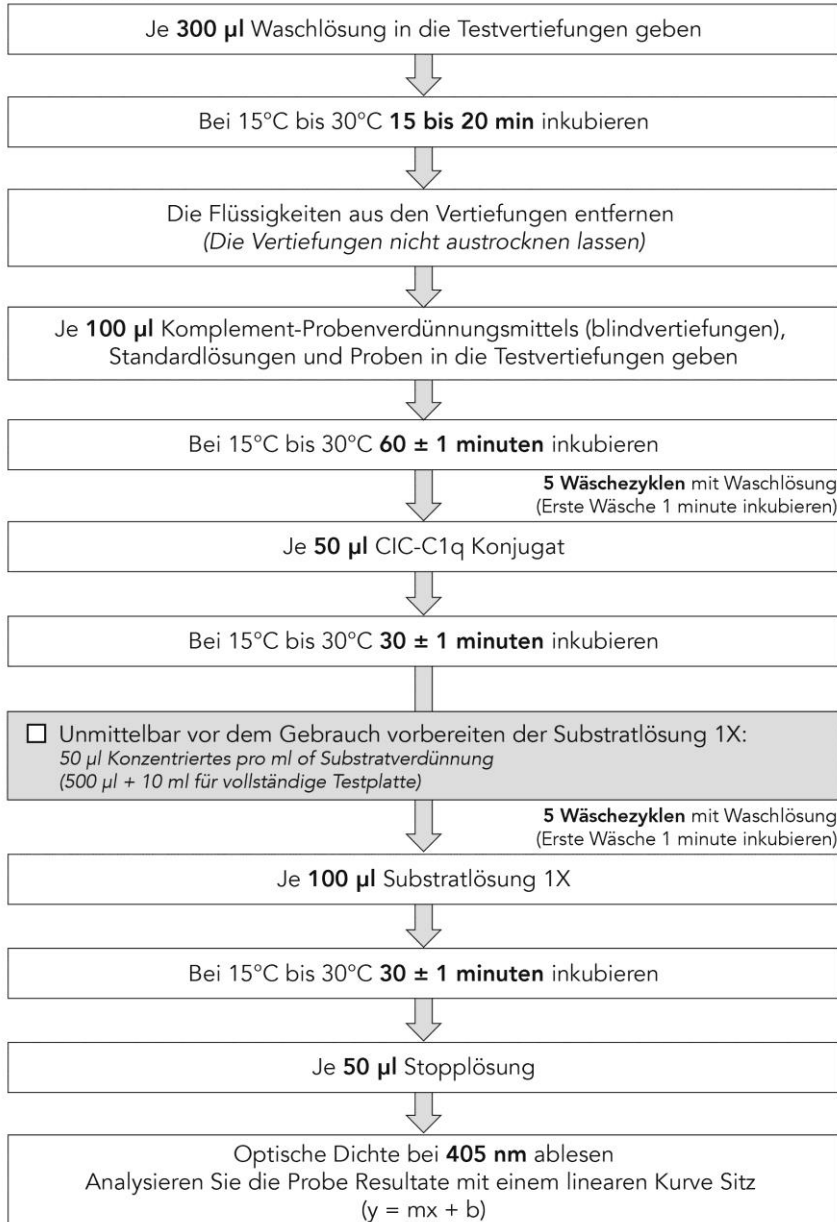
Für den Nachweis von Immunkomplexen in Humanserum und plasma.

ZUSAMMENFASSUNG

Vorbereitung von Reagenzien und Proben

- Konzentrierte Waschlösung verdünnen 1:20 mit vollentsalztem Wasser.
- Jede Standardlösungen wiederherstellen mit 2,0 ml Hydrierungsreagenz, gründlich mischen, und ließ sitzen für 15 Minuten. (Für 30 Tage stabil.)
- Proben verdünnen 1:50 mit Komplement-Probenverdünnungsmittel (10 µl + 490 µl).

Testverfahren





VORGESEHENER VERWENDUNGSZWECK

Der MicroVue CIC-C1q EIA dient dem Nachweis von Immunkomplexen in Humanplasma oder Humanserum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Die Bedeutung zirkulierender Immunkomplexe (CIC) und ihre Rolle in zahlreichen Krankheiten ist bereits seit Jahren Gegenstand verschiedener Untersuchungen. Ihre Bildung stellt einen schützenden, kontinuierlich stattfindenden und gewöhnlich benignen Vorgang eines normal funktionierenden Immunsystems dar. CICs werden im normalen Wirtsorganismus durch eine Reihe komplexer, biochemischer, enzymatischer und zellulärer Vorgänge aus der Zirkulation entfernt. Die Aktivierung des klassischen Komplementwegs spielt bei der effizienten CIC-Elimination eine Schlüsselrolle.

Unter bestimmten Bedingungen, die noch nicht vollständig erforscht sind, können an verschiedenen Organen und Geweben durch Immunkomplexe komplementabhängige Schäden verursacht werden. Durch diese Komplementaktivierung kann eine Reihe potenziell destruktiver Vorgänge im Wirtsorganismus gestartet werden, so z. B. die Bildung von Anaphylatoxinen, Zellauflösung, Leukozytenstimulation sowie die Aktivierung von Makrophagen und anderen Zellen.¹ Bei der Bindung der Immunkomplexe an die Gefäßwände oder Zellmembrane kann eine Zerstörung des normalen Gewebes stattfinden, wie z. B. in einigen Fällen von Glomerulonephritis.

Bestimmte Eigenschaften zirkulierender Immunkomplexe haben einen Einfluss auf ihre potenzielle Pathogenität, dazu gehören insbesondere: (1) Art, Größe und Konzentration des Antigens, (2) Art, Größe und Konzentration des Antikörpers, (3) Bildungs- und Abbaurate der Immunkomplexe.^{1,2}

Zirkulierende Immunkomplexe wurden in einer Reihe von Erkrankungen nachgewiesen, so z. B. bei Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Traumata und neoplastischen, proliferativen Erkrankungen. In jüngst durchgeführten Studien wurde darauf hingewiesen, dass die Bestimmung zirkulierender Immunkomplexe bei der Bewertung bestimmter Erkrankungen und unter bestimmten Umständen auch bei der Überwachung der Therapiewirksamkeit eine wichtige Rolle spielen könnte. Dies trifft besonders für systemischen Lupus erythematodes (SLE) und einige Formen rheumatoider Arthritis (RA) zu.^{3,4} Die erste Erkrankung, die mit der Bildung von Immunkomplexen in Zusammenhang gebracht wurde, war die Serumkrankheit; sie wurde Anfang des 20. Jahrhunderts von Pirquet beschrieben. Seither wurden von erhöhten CIC-Konzentrationen in Autoimmunerkrankungen (SLE, SLE-Syndrom, RA) Glomerulonephritis, neoplastischen Krankheiten (Hodgkin-Krankheit, Leukämie), bakteriellen Erkrankungen (Endocarditis lenta, Lepra), Parasiteninfektionen (Malaria, Schistosomiasis) und Virusinfektionen (Hepatitis, Mononucleosis) berichtet.

Für den Nachweis bzw. die quantitative Bestimmung von zirkulierenden Immunkomplexen wurden über 40 Testverfahren beschrieben. Dazu gehören der Raji-Zellen-Test, der Test auf C1q-Deviation, der Konglutintest, Verfahren zum Nachweis von C1q-Bindung in der Flüssigkeitsphase, der Rheumafaktortest, der PEG-Präzipitationstest sowie C1q-Nachweisverfahren in der festen Phase.^{1,5} Da die Größe und die biochemischen Eigenschaften von CIC stark variieren, konnte sich keiner dieser Tests als Standardverfahren durchsetzen. In einer von der Weltgesundheitsorganisation geförderten Gemeinschaftsstudie wurde 1978 nachgewiesen, dass kein Test als ausschließliches Verfahren für alle vermuteten Krankheiten geeignet war. Es wurde daher empfohlen, zum einwandfreien Nachweis von CIC mindestens zwei unterschiedliche Testverfahren einzusetzen.

FUNKTIONSPRINZIP

Der MicroVue CIC-C1q EIA beruht auf dem Prinzip, dass Komplement-CICs an immobilisierte, gereinigte C1q-Proteine humanen Ursprungs gebunden werden.

In der ersten Phase werden Standardlösungen sowie Serum- und Plasmaproben, die mit Komplement-Probenverdünnungsmittel verdünnt wurden, in die mit C1q beschichteten Mikrotiter-Vertiefungen gegeben und inkubiert. Bei dieser Inkubation bilden Immunkomplexe mit dem an die Mikroassay-Vertiefungen gebundenen C1q Komplexe aus. Zum Bestätigen eines positiven CIC-Ergebnisses können die Proben mit Kontrollverdünnungsmittel verdünnt — letzteres enthält eine hohe Konzentration an Salzen, von denen bekannt ist, dass sie die Bindung von CIC an C1q hemmen^{6,7} — und dann in die Mikrotiter-Vertiefungen gegeben und inkubiert werden. Ungebundene Serumproteine werden im Waschschrift entfernt.

In der zweiten Phasen wird an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiertes antihumanes IgG von Ziegen in die verschiedenen Testvertiefungen gegeben. Während dieser Inkubation geht das Konjugat mit den Immunkomplexen, die bereits an die mit C1q-beschichteten Mikroassay-Vertiefungen gebundenen sind, eine Bindung ein. Ungebundenes Konjugat wird im Waschschrift entfernt.

In der dritten Phasen wird ein Enzymsubstrat in die verschiedenen Testvertiefungen gegeben. Der gebundene, HRP-konjugierte Antikörper reagiert mit dem chromogenen Substrat und bildet eine grüne Färbung. Nach der Inkubation wird zum Stoppen der Farbentwicklung ein Reagenz hinzugegeben.

Die Extinktionswerte (E_{405} -Werte) werden spektrophotometrisch bestimmt. Die Intensität der grünen Färbung ist proportional zur Menge der CIC-IgG-Antikörper, die an das C1q der festen Phase gebunden werden. Es wird eine Eichgerade erstellt, indem die für die verschiedenen Standardlösungen erhaltenen E_{405} -Werte gegen die angegebenen Konzentration aufgetragen werden. Die Konzentration der in der Probe vorliegenden Immunkomplexe wird dann anhand dieser Eichgerade ermittelt. Die Ergebnisse werden als Äquivalente von hitzeaggregiertem, humanem Gammaglobulin pro Milliliter ($\mu\text{g Äq/ml}$) angegeben.

REAGENZEN UND MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Der CIC-C1q EIA enthält folgende Komponenten:

A	CIC-C1q-Standardlösungen	Artikelnr. A9503-A9505	je 2 x 2 ml
	(lyophilisiert) Bei Wiederherstellung enthält jede Standardlösung eine bekannte Menge		
C	hitzeaggregierten Gammaglobulins (HAGG) humanen Ursprungs, phosphatgepufferte Kochsalzlösung und 2,5% Stabilisatoren		
1	Mikroassay-Platte	Artikelnr. A9500	je 12
	Platte mit 96 Vertiefungen, einschließlich Feststelleinrichtung und Halterung. Setzt sich aus Teststreifen mit jeweils 8 Vertiefungen zusammen, die mit gereinigten, humanen C1q-Proteinen beschichtet sind und sich in einem wiederverschließbaren Kunststoffbeutel befinden		
2	Stopplösung	Artikelnr. A3673	6 ml
	Enthält 250 mmol/l Oxalsäure		
3	20fach konzentrierte Waschlösung	Artikelnr. A9957	je 2 x 50 ml
	Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 1,0% Tween-20® und 0,035% ProClin® 300		
4	Komplement-Probenverdünnungsmittel	Artikelnr. A3670	50 ml
	Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 2,5% Stabilisatoren und 0,035% ProClin 300		
5	Substratverdünnung	Artikelnr. A3672	25 ml
	Enthält 0,1 mol/l Zitratpuffer und 0.05% H ₂ O ₂		
6	Konzentriertes Substrat	Artikelnr. A3671	1,5 ml
	Enthält 0,7% 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), Diammoniumsalz		
7	CIC-C1q-Konjugat	Artikelnr. A9506	je 2 x 3 ml
	Enthält an Peroxidase konjugiertes, antihumanes IgG (Ziege), suspendiert in einem stabilisierenden HRP-Puffer mit Konservierungsmittel		

8 Hydrierungsreagenz
Enthält 0,035% ProClin 300

Artikelnr. A3675

25 ml

9 Kontrollverdünnungsmittel

Artikelnr. A9511

je 2 x 10 ml

Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 2,5% Stabilisatoren, 1,2 mmol/l NaCl und 0,035% ProClin 300

Tween-20® ist ein Warenzeichen von ICI Americas Inc.

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

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG)

- Stoppuhr (über einen Bereich 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 (E_{405}) über den Bereich von 0,0 bis 2,0
- Vollentsalztes oder destilliertes Wasser

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Zur *In-vitro*-Diagnostik.
- 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.
- Bei der Handhabung der Kitkomponenten geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- 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 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.
- 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.
- Eine mikrobielle Kontamination bzw. Kreuzkontamination von Proben, Reagenzien oder Materialien vermeiden. Eine Kontamination kann zu falschen Ergebnissen führen.
- 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 erhalten werden.

- Das konzentrierte Substrat ist lichtempfindlich. Es darf daher nicht über längere Zeit hellem Licht oder direkter Lichteinstrahlung ausgesetzt werden. Die Reagenzien bei Nichtgebrauch im Dunkeln aufbewahren.
- Die Mikroassay-Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
- Beim Hinzufügen oder Ansaugen von Flüssigkeiten zu bzw. von den Mikroassay-Vertiefungen nicht den Boden der Vertiefungen ankratzen oder berühren.
- Hitzeinaktivierte, hyperlipämische oder kontaminierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
- Um beim Waschen die Bildung von Aerosolen zu vermeiden, eine Vorrichtung verwenden, mit der die Waschflüssigkeit in eine Flasche mit haushaltsüblichem Bleichmittel gesaugt wird.
- Für dieses Assay kann eine beliebige anerkannte Waschmethode eingesetzt werden.
- 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

Das ungeöffnete Kit bei 2°C bis 8°C lagern. Nach dem Öffnen des Kits können die 20fach konzentrierte Waschlösung und das Hydrierungsreagenz bei 2°C bis 30°C aufbewahrt werden.

Nach der Entnahme der Reagenzien und Materialien, die für den Test verwendet werden sollen, nicht benötigte Reagenzien sofort wieder auf die erforderliche Lagertemperatur bringen. Die Reagenzien und Materialien vor dem Test auf Raumtemperatur (15°C bis 30°C) bringen.

ANZEICHEN FÜR INSTABILITÄTEN ODER ZERSETZUNGSVORGÄNGE DER REAGENZIEN

Das konzentrierte Substrat kann farblos sein oder eine Farbe von blass- bis dunkelgrün annehmen. Diese Färbungen bringen keine Beeinträchtigung der Leistungsfähigkeit mit sich. Die frisch angesetzte Substratlösung sollte jedoch farblos oder blassgrün sein. Eine dunkelgrüne Farbe zeigt an, dass die angesetzte Substratlösung Zersetzungserscheinungen aufweist und entsorgt werden muss. Es muss dann eine neue Substratlösung in einem sauberen Glasbehälter angesetzt werden.

Eine Trübung oder Verfärbung der verdünnten 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.

Für diesen Test werden mindestens 10 µL Serum oder EDTA-Plasma benötigt. Alle Proben sollten unter keimfreien Bedingungen entnommen und gemäß Standardverfahren für die klinische Laborpraxis getestet werden.⁹ Die Proben nicht hitzeinaktivieren. Schwebstoffteilchen sollten vor dem Testen durch Zentrifugieren bei niedrigen Drehzahlen von den Proben entfernt werden.

Die Proben können bei 2°C bis 8°C maximal 7 Tage gelagert werden. Für die Aufbewahrung über längere Zeiträume sollten die Proben bei –20°C oder tieferen Temperaturen in einem Gefrierschrank ohne Abtauautomatik eingefroren werden.

VORBEREITUNG VON REAGENZIEN

Die Mengen an Substratlösung und Mikroassay-Teststreifen, die für eine bestimmte Anzahl von Bestimmungen erforderlich sind, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Nach der Entnahme der erforderlichen Reagenzien und Materialien die nicht mehr benötigten Komponenten wieder auf die erforderliche Lagertemperatur bringen (siehe *LAGERUNG*).

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

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. Gründlich mischen. Die Waschlösung zum Waschen der Mikroassay-Vertiefungen 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 Teststreifen-Feststelleinrichtung von der Platte entfernen. Die Anzahl der benötigten Teststreifen anhand von Tabelle 1 bestimmen. 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, indem die Teststreifen-Feststelleinrichtung auf die Mikroassay-Platte aufgesetzt wird.

Ansetzen bzw. Wiederherstellen der CIC-C1q-Standardlösungen

Je 2,0 ml Hydrierungsreagenz in die Fläschchen der Standardlösungen A-C geben. Die lyophilisierten Standardlösungen mindestens 15 Minuten rehydrieren lassen und dann gründlich mischen. Darauf achten, dass sich beim Mischen kein Schaum und keine Blasen bilden. Die wiederhergestellten Standardlösungen sind — die Lagerung bei 2°C bis 8°C vorausgesetzt — für 30 Tage stabil.

Probenverdünnung

Vorsicht: Alle Proben als potenziell infektiöses Material behandeln. Die Proben nicht hitzeinaktivieren oder kontaminieren. Die Anzahl (N) der zu testenden Proben bestimmen. Die Teströhrchen 1 bis N beschriften und auf dem beiliegenden Datenblatt die Daten jedes Teströhrchens eintragen. Alle Proben mit dem Komplement-Probenverdünnungsmittel im Verhältnis 1:50 verdünnen (z. B. 10 µL Probe auf 490 µL Komplement-Probenverdünnungsmittel). Gründlich mischen, dabei jedoch die Bildung von Schaum und Blasen vermeiden. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden. Ist die für eine Probe gemessene Immunkomplexkonzentration größer als die Konzentration von Standardlösung C und wird für die am Ende des Standardbereichs liegenden Punkte eine höhere Genauigkeit benötigt, sollte die Probe in einer Verdünnung von 1:200 (eine vierfache Verdünnung der 1:50-Verdünnung) erneut getestet werden. **Hinweis:** Proben mit einer gemessenen CIC-Konzentration, die unter der von Standardlösung C liegt, sollten nicht verdünnt und wiederholt getestet werden.

Hinzugeben der verdünnten Proben in die Mikroassay-Vertiefungen

Zum Hinzugeben der verdünnten Proben, Standardlösungen, Kontrollen und Pufferlösungen in die Vertiefungen stehen zwei Methoden zur Verfügung (siehe Schritt 3 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 Testserien, 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 C1q 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 C1q beschichteten Platte — überführt. Um das Risiko von Kreuzkontaminationen möglichst gering zu halten, müssen die Pipettenspitzen jedes Mal, wenn sich die Zusammensetzung der zu überführenden Proben ändert, ausgewechselt werden.

Kontrollverdünnungsmittel (optional)

Ist eine Bestätigung erforderlich, die Anzahl (N) der zu bestätigenden Proben bestimmen. Die Teströhrchen 1c bis Nc beschriften und auf dem beiliegenden Datenblatt die Daten jedes Teströhrchens eintragen. Mit dem Kontrollverdünnungsmittel die erforderlichen Verdünnungen (1:50 oder 1:200) herstellen. Eine mit Kontrollverdünnungsmittel verdünnte Probe muss gleichzeitig mit der gleichen Verdünnung der Probe in Komplement-Probenverdünnungsmittel getestet werden.

Vorbereiten der Substratlösung

Unmittelbar vor dem Gebrauch vorbereiten. Das erforderliche Volumen der Substratlösung anhand von Tabelle 1 bestimmen. Die Substratlösung vorbereiten, indem für jeden ml der Substratverdünnung 50 µL konzentriertes Substrat hinzugegeben wird. Gründlich mischen.

Tabelle 1. Testanforderungen

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

¹Die Anzahl der zu testenden Proben bestimmen und sieben (7) Vertiefungen für die drei Standardlösungen (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.

Vor dem Fortfahren die unter **VORBEREITUNG DER REAGENZIEN** gegebenen Informationen einsehen.

Die Platte stets gut festhalten, um ein unbeabsichtigtes Entfernen der Teststreifen-Feststelleinrichtung zu verhindern.

- Die Positionen der Vertiefungen aller Proben und Standardlösungen sowie die auf den Flaschenetiketten angegebenen Chargennummern auf einem Datenblatt schriftlich festhalten. Die Ausrichtung der Mikroassay-Platte durch die Markierung einer Plattenecke festhalten.
- Die Mikroassay-Teststreifen wie folgt vorbereiten:
 - Die Mikroassay-Vertiefungen rehydrieren, indem mit einer Waschflasche oder einem automatisierten Plattenwaschgerät in jede Vertiefung 300 µL Waschlösung gegeben wird.
 - Bei Raumtemperatur (15°C bis 30°C) für 15-20 Minuten inkubieren.
 - Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.

- d. Die Platte umdrehen und zweimal vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen. **Die Vertiefungen nicht austrocknen lassen.**
3. 100 µL des Komplement-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 CIC-C1q-Standardlösungen (A, B und C) in die Duplikatvertiefungen geben.
 5. Je 100 µL der verdünnten Proben in die entsprechenden Mikroassay-Vertiefungen geben. Siehe hierzu auch Schritt 5 unter *VORBEREITUNG VON REAGENZIEN*.
 6. Bei Raumtemperatur (15°C bis 30°C) für 60 ± 1 Minuten inkubieren.
 7. Die Mikroassay-Vertiefungen wie folgt waschen:

Hinweis: Der Waschschrift der Mikroassay-Vertiefungen kann manuell oder mit Hilfe eines automatisierten Plattenwaschgeräts durchgeführt werden.

 - a. Nach der Inkubation von Schritt 6 (und Schritt 9 — siehe unten) die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - b. Mit einer Waschflasche oder einem automatisierten Plattenwaschgerät ungefähr 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - c. Die Vertiefungen bei Raumtemperatur (15°C bis 30°C) für 1 Minute inkubieren.
 - d. Den Inhalt aus den verschiedenen Vertiefungen entfernen.
 - e. Ungefähr 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - f. Den Inhalt aus den verschiedenen Vertiefungen entfernen.
 - g. Die Schritte e-f dreimal wiederholen.**
 - h. Nach diesem fünften Waschschrift die Platte umdrehen und zweimal vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
 8. Mit einer Mehrkanal-oder Mehrfachpipette jeweils 50 µL des Konjugats in die gewaschenen Testvertiefungen und die Blindvertiefung(en) geben.
 9. Die Mikroassay-Teststreifen bei Raumtemperatur (15°C bis 30°C) für 30 ± 1 Minuten inkubieren. Während dieser Inkubation die Substratlösung vorbereiten (siehe Schritt 8 unter *VORBEREITUNG VON REAGENZIEN*).
 10. Die Mikroassay-Vertiefungen nach der 30 Minuten dauernden Inkubation (Schritt 9) wie in Schritt 7 unter *TESTVERFAHREN* beschrieben waschen.
 11. Unmittelbar nach dem Waschschrift je 100 µL der frisch angesetzten Substratlösung in die Vertiefungen und Blindvertiefungen geben.
 12. Die Mikroassay-Teststreifen bei Raumtemperatur (15°C bis 30°C) für 30 ± 1 Minuten inkubieren.
 13. 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.
 14. Innerhalb von einer Stunde nach der Zugabe der Stopplösung (Schritt 13) die Extinktion für jede Testvertiefung bei 405 nm bestimmen (E_{405} -Wert) und je nach verwendetem Spektrophotometer eine Blindwertkorrektur vornehmen.
 15. Die verbleibenden verdünnten Proben, Substrate und benutzten Mikroassay-Teststreifen entsorgen (siehe Schritt 3 unter *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*). Den Halter und die Feststalleinrichtung für Teststreifen für zukünftige Bestimmungen aufbewahren.

EMPFOHLENES BESTÄTIGUNGSVERFAHREN

Ist eine unabhängige Bestätigung eines positiven Testergebnisses erwünscht oder widerspricht ein positives Testergebnis den klinischen Daten, kann die positive Probe in einem bestätigenden Kontrolltest getestet werden. Negative Testergebnisse können nicht bestätigt werden. Für das Bestätigungsverfahren wird ein Probenverdünnungsmittel (das Kontrollverdünnungsmittel) verwendet, das eine hohe Konzentration an NaCl enthält.^{6,7} Zum Bestätigen eines positiven Testergebnisses muss ein aliquoter Teil der Probe mit Kontrollverdünnungsmittel (1:50 oder 1:200) und ein zweiter aliquoter Teil auf ähnliche Weise wie mit dem Komplement-Probenverdünnungsmittel verdünnt werden. Beide Proben werden dann wie

gewohnt mit dem CIC-C1q EIA getestet. Hierzu auch die unter *VORBEREITUNG VON REAGENZIEN* und *AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE* gegebenen Informationen einsehen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Gemäß guter Laborpraxis sollten positive und negative Kontrollen in jeden Test eingeschlossen werden. Zu diesem Zweck bietet Quidel für den MicroVue CIC-C1q EIA Kontrollen an (CIC-C1q Controls, Katalognr. A013), die gemäß den auf der zugehörigen Packungsbeilage gegebenen Anleitungen eingesetzt werden sollten.

Zusätzlich zu den Kontrollen umfasst dieser EIA auch ein *EMPFOHLENES BESTÄTIGUNGSVERFAHREN* und ein Verfahren zur *VALIDIERUNG*.

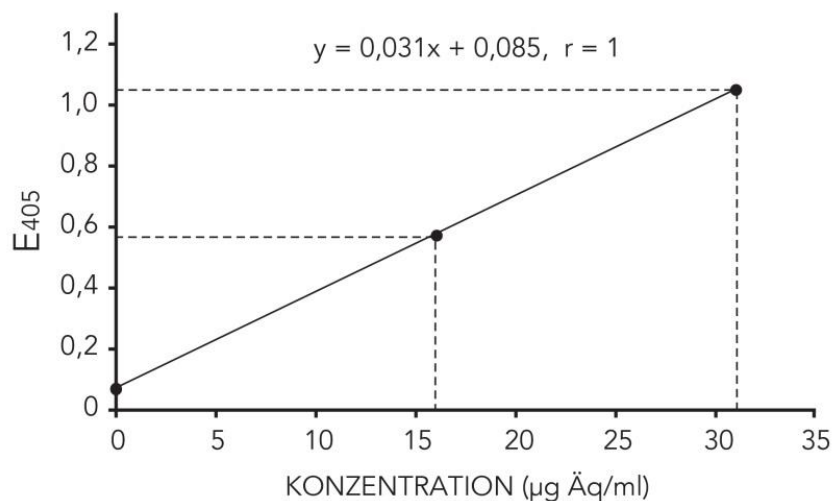
AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Berechnungen

Die Eichgerade wird mit den Blindwert-korrigierten E_{405} -Werten der verschiedenen Standardlösungen (auf der y-Achse) und den entsprechenden Standardkonzentrationen (auf der x-Achse) erstellt. Die Eichgerade muss den Validierungsanforderungen gerecht werden. Diese Berechnung wird von den meisten Rechnern und Taschenrechnern unterstützt. Ein Beispiel einer typischen Eichgerade ist in Abb. 1 dargestellt.

Beispiel einer Eichgeraden

ABB. 1



Probe	(E_{405})	$\mu\text{g Äq/ml}$
Standard A	0,09	0
Standard B	0,57	16
Standard C	1,05	31
Probe 1	0,19	4
Probe 2	0,82	24
Probe 3	0,40	11
$r = 1,00$	$m = 0,031$	$b = 0,085$

Die Konzentrationen ($\mu\text{g Äq/ml}$) der Proben werden mit Hilfe einer linearen Regression von der Eichkurve berechnet.

Korrektur durch den Verdünnungsfaktor

Die CIC-Konzentrationen, die auf den Etiketten der CIC-C1q-Standardlösungen angegeben sind, beruhen auf einer Probenverdünnung von 1:50. Wurden die Proben in einer höheren Verdünnung getestet, müssen die berechneten Ergebnisse mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Wenn die Proben beispielsweise in einer Verdünnung von 1:200 getestet wurden, müssen die Ergebnisse mit dem Faktor 4 multipliziert werden.

Bestätigen der Testberechnungen

Zum Bestätigen eines positiven Testergebnisses wird die Konzentration der Immunkomplexe, [CIC], die in der mit Kontrollverdünnungsmittel verdünnten Probe nachgewiesen wurde, durch die Immunkonzentration geteilt, die in der mit Komplement-Probenverdünnungsmittel verdünnten Probe gemessen wurde. Auf diese Weise wird folgendes Verhältnis erhalten:

$$\text{Verhältnis} = \frac{[\text{CIC}] \text{ in Kontrollverdünnungsmittel}}{[\text{CIC}] \text{ in Komplement-Probenverdünnungsmittel}}$$

Validierung

Die Steigung, den Schnittpunkt mit der y-Achse und den Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden bestimmen. Diese Werte müssen innerhalb der folgenden Bereiche liegen, damit der Test gültig ist:

$$\begin{aligned} \text{Korrelationskoeffizient (r): } &> 0,95 \\ \text{Steigung (m): } &0,022 \text{ bis } 0,056 \\ \text{y-Schnittpunkt (b): } &(-)0,108 \text{ bis } (+)0,238 \end{aligned}$$

Bewertung

Negative Ergebnisse: Werte unter 4 µg Äq/ml werden als negatives Ergebnis betrachtet, da sie keine signifikante Konzentrationen an CIC enthalten.

Positive Ergebnisse: Werte \geq 4 µg Äq/ml werden als positives Ergebnis betrachtet, da sie eine signifikante Konzentration an CIC enthalten.

Bestätigung der Ergebnisse: Bei einem Verhältnis unter 0,7 gilt das positive CIC-Ergebnis als bestätigt. Eine Reduktion um über 30% kann also als Bestätigung für ein positives Ergebnis angesehen werden.

Gelegentlich können positive Proben nicht bestätigt werden. Dafür kommen verschiedene Gründe in Frage: (1) Fehler bei der Probenhandhabung (z. B. Kontamination oder Hitzeinaktivierung) oder (2) die Proben enthalten Antikörper gegen C1q. Dieses Proben sind jedoch nicht zwangsläufig CIC-negativ. Die für das falsch positive Ergebnis verantwortliche Substanz maskiert möglicherweise gleichzeitig auftretende CIC, die — lägen sie isoliert vor — ansonsten ein positives CIC-Ergebnis ergäben, das sich bestätigen lässt.

GRENZEN DER METHODE

Eine Hitzeinaktivierung der Proben kann zu falsch positiven Ergebnissen führen. Da mit dieser Testmethode Aggregationen von humanem IgG nicht-selektiv gemessen werden, müssen bei der Entnahme und der Bearbeitung von Proben Bedingungen vermieden werden, die die Aggregation von IgG fördern.

Der MicroVue CIC-C1q EIA wurde zum Testen von Proben eingesetzt, die als Serum oder Plasma in EDTA-Antikoagulanzen vorlagen. Andere Antikoagulanzen wurden nicht untersucht.

ERWARTETE WERTE

Mit dem MicroVue CIC-C1q EIA wurden zirkulierende Immunkomplexe (CIC) in Serumproben von 312 Probanden bestimmt. Einhundertsechs (106) Seren wurden von normalen, asymptomatischen Probanden genommen. Die mittlere CIC-Konzentration betrug 2,1 µg Äq/ml (SA = 1,9).

Zudem wurden Proben von 206 Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE), rheumatoider Arthritis (RA) und anderen Erkrankungen mit dem MicroVue CIC-C1q EIA und einem anderen handelsüblichen EIA-Kit getestet. Insgesamt wurde zwischen den beiden Testmethoden eine Übereinstimmung von 87% gefunden.

Von den oben genannten Gruppen wurden einundachtzig (81) SLE-Patienten und dreiunddreißig (33) RA-Patienten getestet. Bei 82% dieser Proben stimmten die beiden Kits miteinander überein. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2. Vergleichsdaten Für Die Spezifischen Patientengruppen

Ergebnisse MicroVue Test	-	+	-	+
Ergebnisse Vergleichstest	-	+	+	-
RA-Patienten	18	9	3	3
SLE-Patienten	40	23	15	3
Andere	0	90	2	0

LEISTUNGSDATEN

Genauigkeit

Für die Standardisierung des EIA wurde ein auf hitzeaggregiertem IgG beruhender Immunkomplexstandard der Weltgesundheitsorganisation (WHO) verwendet. Zum Bestimmen der Testgenauigkeit wurden mit dem MicroVue Kit in neun Serien fünf Verdünnungen des WHO-Standards als Triplikate gemessen. Die Testergebnisse stimmten mit den erwarteten Standardkonzentrationen überein (Koeffizient der Bestimmung = 0,97).

Um die Eignung von Plasmaproben für diesen EIA unter Beweis zu stellen, wurden einundvierzig (41) duplizierte Serum- und Plasmaproben (EDTA-Antikoagulanzen) von SLE- und RA-Patienten miteinander verglichen. Dabei wurde zwischen den Ergebnissen der Serum- und Plasmaproben keine signifikanten Unterschiede gefunden ($\alpha = 0,05$).

Reproduzierbarkeit

In neun Testserien wurden drei Serumproben und drei Standardlösungen von drei unterschiedlichen Kit-Chargen bestimmt. Die Standardlösungen wurden innerhalb der jeweiligen Testserie als Triplikate getestet. Die Serumproben der jeweiligen Serien wurden in separaten Vertiefungen getestet. Die als Interassay-Variation bezeichnete mittlere Variation zwischen den Serien ist für die Proben und die Standardlösungen in Tabelle 3 dargestellt. Die in dieser Tabelle dargestellte Intraassay-Variation bezeichnet für die Standardlösungen die mittlere Variation innerhalb der jeweiligen Serie.

Tabelle 3. Reproduzierbarkeit Des Tests

	Mittelwert (Äq/ml)	Intraassay-SA (%VK)	Interassay-SA (%VK)
Probe 1	30	NG	3,1 (10)
Probe 2	7	NG	2,6 (37)
Probe 3	0	NG	0,3 (ent.)
Standard 1	37	3,2 (9)	3,9 (11)
Standard 2	20	2,1 (10)	1,8 (9)
Standard 3	0	0,1 (ent.)	0,0 (ent.)

NG = nicht getestet ent. = entfällt

Sensitivität

Die Sensitivität des MicroVue CIC-C1q EIA beträgt 1,0 µg Äq/ml.

Spezifität

Einhundertsechs (106) Serum- und Plasmaproben von normalen, asymptomatischen Probanden wurden auf CIC getestet. Die Gesamtspezifität des Tests betrug 94%.

UNTERSTÜTZUNG

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. McDougal, J.S, McDuffie, F.C., Immune Complexes in Man: Detection and Clinical Significance, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 24, p. 1, 1985.
2. Endo, L., Corman, L.C., Panush, R.S., Clinical Utility of Assays for Circulating Immune Complexes, *Medical Clinics of North America*, Vol. 69, No. 4, p. 623, July 1985.
3. Abrass, C.K., Nies, K.M., Louie, J.S., Border, W.A., Glasscock, R.J., Correlation and Predictive Accuracy of Circulating Immune Complexes with Disease Activity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus, *Arthritis Rheum.*, Vol. 23, p. 273, 1980.
4. Duquesnoy, B., Circulating Immune Complexes and Complement in Rheumatoid Arthritis, *Ann. Biol. Clin.*, Vol. 42, p. 71, 1984.
5. Theofilopoulos, A.N., The Raji, Conglutinin, and Anti-C3 Assays for the Detection of Complement-Fixing Immune Complexes, *Methods in Enzymology*, Vol. 74, p. 511, 1981.
6. Agnello, V., Winchester, R.J., Kunkel, H.G., Precipitin Reactions of the C1q Component of Complement with Aggregated Gamma-Globulin and Immune Complexes in Gel Diffusion, *Immunology*, Vol. 19, p. 909, 1970.
7. Hack, C.E., Huijbregts, C.C., Paardekooper, J., Influence of Ionic Strength, EDTA Concentration, Endogenous C1q and Polyanions on the ¹²⁵I-C1q-Binding Test, *J. Immunol. Meth.*, Vol. 72, p. 197, 1984.
8. Richardson, J.H., Barkley, W.E., *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, p. 11–13, 1984.
9. Davidson, I., et al., *The Blood*, p. 1 20. in Cl. Davidson and J.B. Henry (ed.), Todd-Sanford Clinical Diagnosis, W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, 1969.

REF A001 – MicroVue CIC-C1q Eq 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

PIA001001DE00 (04/16)

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
