

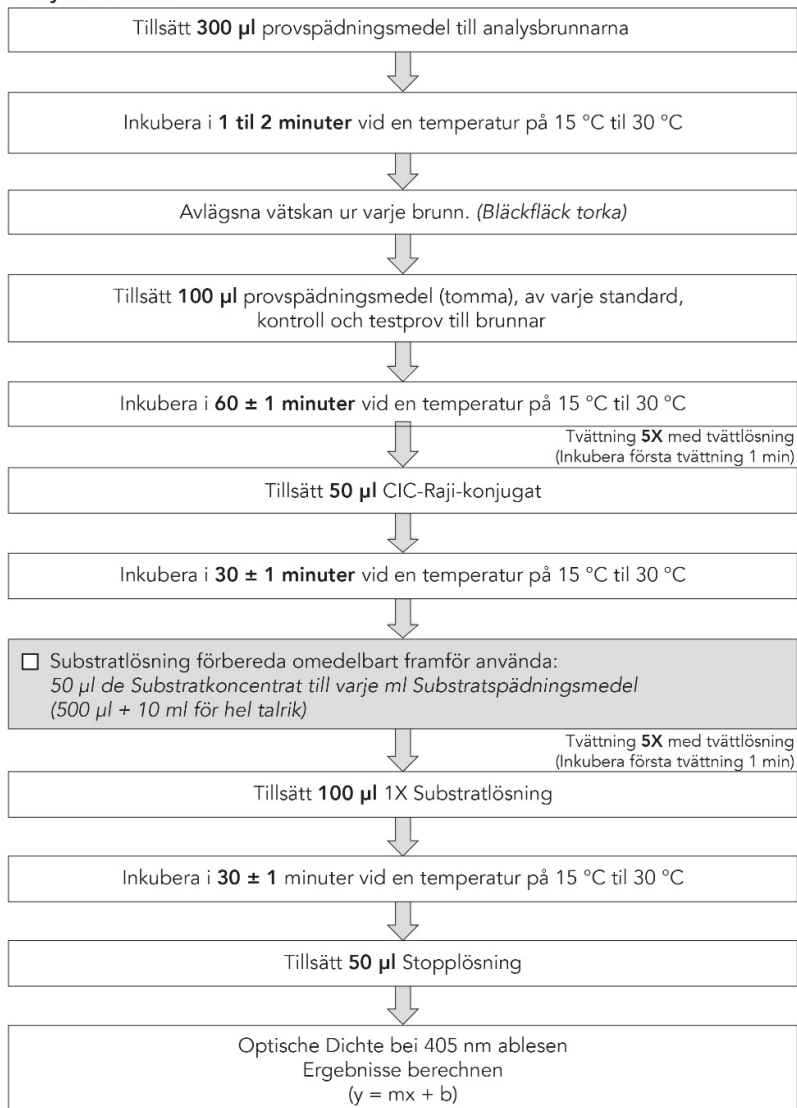
**En enzymimmunoanalys för kvantitering av cirkulerande immunkomplex (CIC) innehållande C3-aktiveringsfragment i humant serum eller plasma**

## SAMMANFATTNING

### Reagent, Kontroll och Prov Förberedelse

- Späd tvättlösningskoncentrat 1:20 med avjoniserat vatten.
- Rekonstruera var Kontroll med 1.0 ml av det Komplementprov- spädningsmedel, blanda absolut, och äggkläckningsmaskin för 15 minuterna.  
*(Till bekräfta hög kontroll, använd 1.0 ml av spä ut för rekonstruera steg.)*
- Späd prover 1:50 med Komplementprovspädningsmedel (10 µL + 490 µL).
- Om bekräftande hög prov, spä ut 1:50 med CIC-Raji- bekräftelsespädningsmedel.

### Analysförfarande





## AVSEDD ANVÄNDNING

MicroVues enzymimmunoanalys för CIC-Raji-cellersättning mäter immunkomplex innehållande C3-aktiverings-fragment i humant serum och plasma.

### SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Betydelsen av cirkulerande immunkomplex (CIC), och deras samband med olika sjukdomar, har undersökts under många år. Bildning av immunkomplex utgör en skyddande, fortlöpande och normalt godartad process i ett normalt fungerande immunsystem. CIC avlägsnas från cirkulationen i en normal värd genom ett antal komplexa biokemiska, enzymatiska och cellulära processer. Den effektiva elimineringen av många CIC kräver aktivering av komplement. Komplementaktivering leder till C3-fragmentavsättning i immunkomplexet, följt av förstärkt eliminering av fagocytiska celler i retikuloendotelial-systemet. Vid vissa sjukdomstillstånd, som man ännu inte förstår till fullo, kan immunkomplex inte elimineras från kroppen på ett effektivt sätt. Vid sådana sjukdomar kan immunkomplexen ackumulera och initiera komplementberoende skador på olika organ och i olika vävnader. Denna komplementaktivering kan inleda en serie potentiellt destruktiva händelser i värden, inklusive anafylatoxinproduktion, celllys, leukocytstimulering och aktivering av makrofager och andra celler.<sup>1</sup> När immun-komplex fäster vid kärnvägggar eller cellmembran kan normal vävnad förstöras, exempelvis i vissa fall av glomerulonfrit.

Vissa egenskaper hos CIC inverkar på den potentiella patogeniciteten. Speciellt viktigt är följande: (1) antigenens art, storlek och concentration; (2) antikroppens art, storlek och concentration och; (3) immunkomplexens bildningshastighet och eliminering.<sup>1,2</sup>

Cirkulerande immunkomplex har konstaterats vid många olika tillstånd: exempelvis infektioner, autoimmun-störningar, trauma och neoplastiska proliferativa sjukdomar. Enligt aktuella studier kan CIC-bestämning vara viktig för utvärderingen av vissa sjukdomar samt, ibland, vid övervakning av behandlingseffektivitet. Detta gäller i synnerhet för systemisk lupus erytematös (SLE) och vissa former av reumatoid artrit (RA).<sup>3,4</sup> Det första sjukdomstillståndet som kopplades till bildning av immunkomplex utgjordes av serumsjuka, som beskrevs av von Pirquet i början av 1900-talet. Sedan dess har förhöjda CIC-halter beskrivits för autoimmunsjukdomar (SLE, SLE-relaterat syndrom, RA), glomerulonefrit, neoplastisk sjukdom (Hodgkins, leukemi), bakterieinfektioner (subakut bakteriell endokardit, lepra), parasitinfektioner (malaria, schisto-somias) och virusinfektioner (hepatit, mononukleos).

Mer än 40 analysmetoder för detektering och kvantitering av CIC har beskrivits. Sådana tester som Rajicellanalys, C1q-avvikelsestest, konglutininest, vätskefas-C1q-bindnings-förfaranden, reumatoid faktoranalys, PEG-precipitintest, och fastfas-C1q-analyser har beskrivits.<sup>1,5</sup> Eftersom storleken på och de fysiokemiska egenskaperna för CIC varierar i hög grad, har ingen av dessa analyser accepterats som en standard. En gemensam studie sponsrad av världshälsoorganisationen WHO år 1978 kom fram till att ingen av metoderna lämpade sig för samtliga sjukdomstillstånd, och rekommenderade att minst två olika analysmetoder skulle tillämpas för detektering och mätning av CIC på ett adekvat sätt.

### FÖRFARANDETS PRINCIP

Fragment av den tredje komplementkomponenten, C3, binds ofta kovalent till komplementaktiverande immunkomplex. Rajiceller, som härletts från en kontinuerlig B-lymfocytodlingscellstam, bär CR2-komplementreceptorer som binder iC3b-, C3d,g- och C3d-fragmenten av aktiverat C3.<sup>6,7,8</sup> Rajicell-CIC-analysen bygger på Rajicell-CR2-receptorernas förmåga att binda immunkomplex innehållande dessa C3-fragment.<sup>6</sup> MicroVues enzymimmunoanalys för CIC-Rajicellersättning mäter även CIC-innehållande C3-fragment med hjälp av en immobiliserad monoklonal antikropp som specifikt binder iC3b-, C3d,g- och C3d-aktiveringsfragmenten av C3 på ett sätt som är analogt med Rajicell-CR2-bindningsreaktionen.

I det första skedet tillsätts standarder och serum- eller plasmaprover som späts med komplementprovspädningsmedel till de mikroanalysbrunnar som är belagda med monoklonala antikroppar till humana C3-

fragment och inkuberas. Under denna inkubation tas immunkomplex innehållande C3-aktiveringsfragment upp av fastfasantikropparna. Efter inkubationen avlägsnar en tvättcykel obundna serum- eller plasmaproteiner.

Under det andra skedet tillsätts pepparrotsperoxid-askonjugerat (HRP) mus-anti-humant IgG till varje testbrunn och inkuberas. Under denna inkubation binder konjugatet till de immunkomplex som nu är bundna till mikroanalysbrunnarna. En tvättcykel avlägsnar obundet konjugat.

Under det tredje skedet tillsätts ett enzymsubstrat till varje testbrunn. De bundna, HRP-konjugerade antikropparna reagerar med det kromatogena substratet så att en grön färg bildas. Efter inkubation tillsätts en reagens för att stoppa färgutvecklingen.

Standardens och testprovets absorbanser ( $A_{405}$ -värden) mäts spektrofotometriskt. Intensiteten på den gröna färg som uppkommer är proportionell mot den mängd CIC som binder till fastfasen. En standardkurva erhålls genom plottning av de  $A_{405}$ -värden som erhålls för varje standard relativt dess indikerade koncentration. Immunkomplex-koncentrationen i testprovet bestäms med hjälp av standardkurvan. Resultaten uttrycks i form av mg serum-behandlade, värmeaggregerade humana gammaglobolinekvivalenter (HAGG) per mL ( $\mu\text{g Eq/ml}$ ). För att bekräfta ett positivt CIC-resultat kan provet analyseras efter spädning i CIC-Raji-bekräftelsespädningsmedel, som innehåller blockerande antikroppar med specifititer som motsvarar dem för de antikroppar som immobiliserats på mikroanalysbrunnen.

## REAGENSER OCH MATERIAL SOM INGÅR

EIA-kitet för CIC-Rajicellersättning innehåller följande:

<b>A</b>	<b>CIC-Rajistandarder</b>	<b>Art. A9970-A9974</b>	<b>2 mL/st</b>
<b>B</b>	Var och en innehåller en känd kvantitet serumbehandlat, värmeaggregerat humant gammaglobulin		
<b>C</b>	(HAGG) i PBS, 2,5 % stabiliserare, 0,01 % thimerosal		
<b>D</b>			
<b>E</b>			
<b>L</b>	<b>Låg CIC-RCR-kontroll</b>	<b>Art. A9919</b>	<b>3 varje</b>
	(Lyofiliserade) Efter rekonstituering, innehåller låga halter serumbehandlat HAGG i humant serum, 20 mM EDTA, 0,01 % timerosal		
<b>H</b>	<b>Hög CIC-RCR-kontroll</b>	<b>Art. A9920</b>	<b>3 varje</b>
	(Lyofiliserade) Efter rekonstituering, innehåller höga halter serumbehandlat HAGG i humant serum, 20 mM EDTA, 0,01 % timerosal		
<b>1</b>	<b>Mikroanalysplatta</b>	<b>Art. A9512</b>	<b>12 av vardera</b>
	96-brunnars med fäste och hållare, bestående av remsor med åtta brunnar, med mus-anti-humana C3-fragment i en återförslutbar foliepåse		
<b>2</b>	<b>Stopplösning</b>	<b>Art. A3673</b>	<b>6 mL</b>
	Innehåller 250 mM oxalsyra		
<b>3</b>	<b>20 X-tvättlösningsskoncentrat</b>	<b>Art. A9957</b>	<b>2 x 50 mL</b>
	Innehåller var och en fosfatbuffrad saltlösning (phosphate buffered saline – PBS), 1,0 % Tween-20® samt 0,035 % ProClin® 300		
<b>4</b>	<b>Komplementprovspädningsmedel</b>	<b>Art. A3670</b>	<b>50 mL</b>
	Innehåller PBS, 2,5 % stabiliserare, 0,035 % ProClin 300		
<b>5</b>	<b>Substratspädningsmedel</b>	<b>Art. A3672</b>	<b>25 mL</b>
	Innehåller 0,1 M citratbuffert och 0,05 % $\text{H}_2\text{O}_2$		
<b>6</b>	<b>Substratkoncentrat</b>	<b>Art. A3671</b>	<b>1,5 mL</b>
	Innehåller 0,7 % 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-svavelsyra), diammoniumsalt		

**7 CIC-Rajikonjugat** **Art. A9516** **2 x 3 mL**  
Innehåller peroxidaskonjugerat (mus)anti-humant IgG löst i HRP-stabiliseringsbuffert med konserveringsmedel

**8 CIC-Raji-bekräftelsepändningsmedel** **Art. A9517** **12 mL**  
Innehåller PBS, 2,5 % stabiliserare, anti-humana C3-fragmentantikroppar, 0,035 % ProClin 300

Tween-20® är ett varumärke som tillhör Atlas Chemical Industries, Inc.  
ProClin® är ett varumärke som tillhör Rohm and Haas Company.

## MATERIAL SOM BEHÖVS MEN SOM INTE MEDFÖLJER

- Timer (60 minuters omfång)
- Räknare eller annan beräkningsmöjlighet för validering av analysen
- Rena, obegagnade mikroanalysplattor och/eller provrör och rack
- Behållare för tvättbuffertlösning
- Tvättflaska eller annat immunoanalystvättsystem
- Ställbar multikanalpipett (8 eller 12 kanaler), eller repeterande mikropipetter (tillval)
- Rena pipetter, 1 mL, 5 mL och 10 mL
- Mikropipetter och pipettspetsar
- Plattläsare med kapacitet för en optisk  $A_{405}$ -densitet på mellan 0,0 och 2,0
- Avjoniserat eller destillerat vatten

## VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSANVISNINGAR

- För *in vitro*-diagnostik.
- Behandla alla prover som biologiskt riskmaterial.
- Hantera satsens innehåll och patientprover med försiktighet.
- Medföljande reagenser används som en enhet fram till det utgångsdatum som anges på förpackningen.
- Förvara analysreagenser enligt anvisningen.
- Använd inte remsor med beläggning om det finns hål på förpackningen.
- Thimerosal används som konserveringsmedel. Oavsiktlig kontakt med, eller sväljning av, buffertar eller reagenser som innehåller thimerosal kan leda till ökade överkänslighetsreaktioner, däribland retning av hud, ögon eller mun. Sök läkarhjälp i händelse av symptom. Exponering för thimerosal kan ha mutagena effekter. Undvik kontakt med starka syror och baser.
- ProClin 300 används som konserveringsmedel. Tillfällig kontakt med eller förtäring av buffertlösningar eller reagenser med ProClin kan orsaka irritation på hud, ögon och mun. Tillämpa god laboratoriepraxis för att reducera exponeringen. Sök läkarhjälp i händelse av symptom.
- Användning av multikanal- eller repeterpipetter rekommenderas vid uppmätning av reagenser.
- För korrekt provmätning ska exakta mängder prover och standarder tillsättas. Pipettera omsorgsfullt med kalibrerad utrustning.
- Korrekt provtagning och förvaring av testprover är av avgörande betydelse för korrekta resultat (se *PROVTAGNING OCH PROVFÖRVARING*).
- Undvik mikrobiell kontaminering eller korskontaminering av prover, reagenser eller material. Kontaminering kan leda till felaktiga resultat.
- Dubbeltesta varje prov.
- Använd inte en mikroanalysbrunn för mer än ett test.
- Tillämpning av andra inkubationstider och temperaturer än dem som anges i avsnittet Förfarande kan leda till felaktiga resultat.
- **Substratkoncentratet är ljuskänsligt. Undvik långvarig exponering för starkt eller direkt ljus. Förvara reagenserna mörkt när de inte används.**
- Låt inte mikroanalysbrunnarna torka när analysen har påbörjats.
- Undvik att skrapa eller beröra brunnarnas väggar vid tillsats av vätskor till eller aspirering av vätskor från mikroanalysbrunnarna.
- Värmeinaktiverade, hyperlipemiska eller kontaminerade prover kan leda till felaktiga resultat.

- Undvik aerosolbildning vid tvätt genom att använda en apparat som aspirerar tvättvätskan till en flaska innehållande ett kommersiellt blekmedel.
- Analysen utförs med någon validerad tvättmetod. **För bästa resultat, använd inte en multkanalpipett för att tvätta av mikroanalysplattan.**
- Behållare och oanvänt innehåll ska kasseras i enlighet med gällande lagar och bestämmelser.
- Testning ska utföras i utrymmen med tillräcklig ventilation.
- Kassera behållare och oanvänt innehåll i enlighet med gällande nationella och lokala reglerings föreskrifter.
- Använd lämpliga skyddskläder, -handskar och -glasögon/ansiktsskydd vid hantering av kitets innehåll.
- Tvätta händerna grundligt efter hantering.
- För ytterligare information om farosymboler, säkerhet, hantering och bortskaffande av delarna som ingår i denna sats, hänvisas till säkerhetsdatabladet (SDS) på [quidel.com](http://quidel.com).

## FÖRVARING

Förvara det öppnade kitet vid en temperatur på 2 °C till 8 °C. När kitet har öppnats kan 20 X-tvättlösningsskoncentratet förvaras vid en temperatur på 2 °C till 30 °C.

Efter val av de reagenser eller material som ska användas för analysen ska de oanvända reagenserna omedelbart åter placeras i sina tillämpliga förvaringstemperaturer. Låt reagenser och material få rumstemperatur (15 °C till 30 °C) före användning.

## INDIKATIONER PÅ INSTABILITET HOS ELLER FÖRSÄMRING AV REAGENSER

Substratkoncentratets färg kan variera mellan färglös och ljus- eller mörkgrönt. Färgen inverkar inte på prestandan. Den nyberedda substratlösningen ska emellertid vara färglös till ljusgrön. En mörkgrön färg indikerar att substratlösningen har försämrats och måste kasseras, och att ny substratlösning ska beredas i rent glasmaterial.

Grumlighet hos eller missfärgning av den utspädda tvättlösningen indikerar försämring av denna reagens. När så är fallet ska lösningen kasseras.

## PROVTAGNING OCH FÖRVARING

Hantera och kassera alla prover med försiktighet.

Alla prover ska tas aseptiskt och beredas med standard-metoder för klinisk laboratorietestning.<sup>9,10</sup> Värmeinaktivera inte proven. Avlägsna eventuella partiklar från proven genom centrifugering med lågt varvtal före testning.

Proven kan förvaras på is, vid en temperatur på ungefär 0 °C, i upp till 6 timmar. Om proven ska förvaras vid en längre tid än så ska de frysas vid en temperatur på -70 °C eller under (förvaring vid en temperatur på -20 °C kan leda till felaktiga resultat).

## FÖRBEREDANDE AV REAGENS

Se tabell 1 för information om substratlösningssmängder och hur många mikroanalysremсор som behövs för olika antal tester. När de reagenser och det material som behövs tagits till vara ska oanvända reagenser och oanvänt material återföras till sina respektive förvarings-temperaturer (se *FÖRVARING*). **Låt reagenser och material för analysen få rumstemperatur (15 °C till 30 °C) före användning.**

### 1. Tvättlösning.

Blanda 20 X-tvättlösningsskoncentratet genom att vända flaskan uppochner flera gånger. Om 20 X-tvättlösningsskoncentratet har förvarats vid en temperatur på 2 °C till 8 °C kan kristaller ha bildats. För att lösa upp kristallerna värmer man flaskan i ett vattenbad på 37 °C till 50 °C tills alla är upplösta och blandar därefter om omsorgsfullt. Bered tvättlösningen genom att späda ut hela innehållet i en av flaskorna med 20 X-tvättlösningsskoncentrat till en liter med destillerat eller avjoniserat vatten. Blanda

omsorgsfullt. Tvättlösningen är stabil i 30 dagar vid förvaring i en ren behållare vid en temperatur på 2 °C til 8 °C. Vid missfärgning eller grumling ska reagensen kasseras.

2. **Välja mikroanalysremсор.**

Betäm hur många mikroanalysremсор som behövs för analysen med hjälp av tabell 1. Ta bort remsfästet från den monterade plattan. Ta bort de remсор som inte behövs och placera dem i förvaringspåsen, återförslut påsen och återför den till förvaring vid en temperatur på 2 °C til 8 °C. Säkra de remсор som ska användas i analysen.

3. **Provspädning.**

**Försiktighet: Behandla alla prov som potentiellt infektiösa. Använd inte värmeinaktiverade eller kontaminerade prover.**

Beräkna hur många (N) prover som ska testas. Märk provrören med nr. 1 till och med nr. N, och registrera vilka prov som motsvarar vilka provrör på det medföljande databladet.

Bered en spädning i förhållandet 1:50 av varje prov med komplementprovspädningsmedel (dvs. 10 µL testprov blandat med 490 µL komplementprov-spädningsmedel). Blanda omsorgsfullt men undvik skum- och bubbelbildning. Förvara eller återanvänd inte spädda prover.

4. **Tillsätta utspädda prover till mikrotitrerbrunnarna.**

Endera av två metoder kan användas vid tillsättning av de utspädda proverna, standarderna, kontrollerna och bufferten till brunnarna (se steg 5 i *ANALYS-FÖRFARANDE*). För små analyskörningar, då endast ett fåtal prover testas, kan de utspädda proven och de övriga reagenserna tillsättas direkt till respektive brunn med en mikropipett (100 µL/brunn). För små eller stora körningar, men i synnerhet stora körningar, rekommenderar vi användning av en multikanalpipett för tillsättning av proverna, enligt nedan. **(En multikanalpipett kan även användas för att på ett praktiskt sätt tillsätta konjugat, substrat och stopplösning.)**

För att ladda standarderna, kontrollerna och de utspädda proverna i mikroanalysbrunnarna så snabbt som möjligt kan man använda sig av en "replikplatteteknik". I stället för att tillsätta 100 µL av varje standard, kontroll eller utspätt prov till de antikroppsbelagda brunnarna individuellt kan 120-130 µL av varje lösning tillsättas till de individuella brunnarna på en tom platta (ingår inte) som motsvarar det önskade slutliga EIA-mönstret. När alla lösningar som ska testas har tillsatts till mikroanalysbrunnarna i den tomma plattan överför man sedan snabbt 100 µL från varje brunn till de antikroppsbelagda brunnarna med en multikanalmikropipett. För att eliminera risken för korskontaminering måste pipettspetsarna bytas varje gång sammansättningen på de prover som ska överföras ändras.

5. **CIC-Raji-bekräftelsepändningsmedel (valfritt).**

Om bekräftelser av positiva resultat önskas beräknas hur många (N) prover som ska bekräftas. Märk provrören med nr. 1c till och med nr. Nc och registrera dem. Bered en spädning på 1:50 med användning av CIC-Raji-bekräftelsepändningsmedlet. Ett prov som späts med CIC-Raji-bekräftelsepändningsmedel måste köras samtidigt med samma utspädning av provet i komplementprovutspändningsmedel.

6. **Beredning av substratlösning.**

**Bered alldeles före användning.** Bestäm önskad volym substratlösning med hjälp av tabell 1 nedan. Bered substratlösningen genom att tillsätta 50 µL substratkoncentrat till varje mL substratpändningsmedel. Blanda omsorgsfullt.

7. **CIC-kontroller.**

Varje kontroll ska rekonstitueras med  $1,0 \pm 0,05$  mL av det komplementprovspändningsmedel medföljer. Efter rekonstitueringen blandas varje flaska försiktigt, men fullständigt, för att säkerställa komplett rehydrering. Låt de rehydrerade lösningarna inkubera vid rumstemperatur (15 °C til 30 °C) i 10-15

minuter. Blanda försiktigt, men fullständigt, på nytt och använd sedan. INGEN YTTERLIGARE SPÄDNING KRÄVS!

**Tabell 1**  
**Analysbehov**

Brunnar <sup>1</sup>	Remsor med åtta brunnar	Mängd substratlösning som behövs (ml)	Substrat-spädnings-lösning (ml)	Substrat-koncentrat (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

<sup>1</sup>Beräkna hur många prover som ska testas och lägg till femton (15) brunnar för de fem (5) standarder och den låga och höga kontroll som ska testas (i duplikat), samt en tom brunn. Vi rekommenderar att duplikatstandarderna och – kontrollerna testas på separata mikroanalysremсор om så är möjligt.

## ANALYSFÖRFARANDE

Läs hela produktbladet innan analysen påbörjas.

Läs *REAGENSBEREDNING* och *VARNINGAR OCH SÄKERHETSFÖRESKRIFTER* innan du fortsätter.

1. Registrera mikroanalysbrunnarnas positioner för den eller de tomma brunnarna, samtliga testprover, standarder och kontroller, samt de indikerade satsnumren från viaetiketterna. Märk ut ett av hörnen på mikroanalysplattan för orientering.
2. Bered mikroanalysbrunnarna så här:
  - a. Rehydrera mikroanalysbrunnarna genom att tillsätta ungefär 300 µL tvättlösning till varje brunn med hjälp av en tvättflaska eller annan automatiserad fyllningsanordning.
  - b. Inkubera i 1 till 2 minuter vid rumstemperatur (15 °C till 30 °C).
  - c. Aspirera innehållet i varje brunn.
  - d. Vänd plattan uppochner och knacka kraftigt över det absorberande papperet två gånger för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska. Låt inte brunnarna torka.
3. Tillsätt 100 µL komplementprovspädningsmedel till den eller de duplikatbrunnar som ska användas för blankning av plattläsaren.
4. Tillsätt 100 µL av varje CIC-Raji-standard (A, B, C, D och E) till duplikatbrunnarna.
5. Tillsätt 100 µL av varje utspätt prov till dess tillägnade mikroanalysbrunn. Se *REAGENSBEREDNING*, steg 4
6. Inkubera i 60 ± 1 minut vid rumstemperatur (15 °C till 30 °C).
7. Tvätta mikroanalysbrunnarna så här:
  - a. Avlägsna innehållet ur varje brunn efter inkubationen i steg 6 (och i steg 9 nedan).
  - b. Tillsätt ungefär 300 µL tvättlösning till varje brunn med hjälp av en tvättflaska eller annan fyllningsanordning.
  - c. Inkubera brunnarna i 1 minut vid rumstemperatur (15 °C till 30 °C).
  - d. Avlägsna vätskan ur varje brunn
  - e. Tillsätt ungefär 300 µL tvättlösning till varje brunn
  - f. Avlägsna vätskan ur varje brunn
  - g. Upprepa stegen e-f ytterligare tre gånger.

- h. Vänd på plattan efter den femte tvättcykeln och knacka kraftigt två gånger över absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska.
8. Dispensera med hjälp av en multikanalpipett eller repeterande pipett 50 µL CIC-Raji-konjugat i varje tvättad testbrunn, inklusive blankbrunnen/brunnarna
9. Inkubera mikroanalysremsorna i  $30 \pm 1$  minut vid rumstemperatur (15 °C til 30 °C). **Bered substratlösningen under denna inkubation (se REAGENSBEREDNING steg 6).**
10. Tvätta mikroanalysbrunnarna efter den 30 minuter långa inkubationen i steg 9, enligt anvisningarna ovan, steg 7.
11. Dispensera direkt efter tvättförfarandet 100 µL av den nyberedda substratlösningen i varje brunn, inklusive blankningsbrunnen/brunnarna, med en multikanalpipett eller repeterande pipett.
12. Inkubera mikroanalysremsorna i  $30 \pm 1$  minut vid rumstemperatur (15 °C til 30 °C).
13. Tillsätt med en multikanalpipett eller repeterande pipett 50 µL av stopplösningen till varje brunn för att avbryta den enzymatiska reaktionen. Stopplösningen ska tillsättas till brunnarna i samma ordningsföljd och med samma tempo som vid tillsättningen av substratlösningen. Knacka lätt på plattan för att sprida färgutvecklingen jämnt.
14. Läs av absorbansen vid 405 nm ( $A_{405}$ -värde) för varje testbrunn inom en timme från tillsatsen av stopplösningen (steg 13), och utför en blankkorrigering beroende på det spektrometrisystem som används.
15. Behåll remshållaren och remsfästet för framtida bruk.
16. Kassera återstående utspädda prover, substrat och de begagnade mikroanalysremsorna i enligt gällande nationella och lokala reglerings föreskrifter.. Behåll remshållaren och remsfästet för framtida bruk.

## REKOMMENDERAD BEKRÄFTELSEMETOD

Om separat bekräftelse av ett positivt resultat krävs, eller om ett positivt resultat inte överensstämmer med den kliniska tolkningen, kan det positiva provet analyseras om med ett bekräftelsetest. Ett negativt resultat kan inte bekräftas. Bekräftelsemetoden använder ett provspädningsmedel (CIC-Raji-bekräftelsepådningsmedlet) som innehåller anti-humana C3-fragmentantikroppar. För att bekräfta ett positivt resultat måste en aliquot av provet spädas i CIC-Raji-bekräftelsepådningsmedel, och en andra aliquot som späts på motsvarande sätt i komplementprovspädningsmedlet. Bägge proven analyseras därefter med det vanliga EIA-förfarandet med MicroVues CIC-Raji-cellersättning. Se *REAGENSBEREDNING* och *TOLKNING AV RESULTATEN* för ytterligare information.

## KVALITETSKONTROLL

Om den positiva och/eller negativa kontrollen inte fungerar på avsett sätt ska Quidels tekniska support kontaktas så snart som möjligt.

Utöver kontrollerna så innefattar MicroVues analys för CIC-Raji-cellersättning även en *REKOMMENDERAD BEKRÄFTELSEMETOD* och *VALIDERINGSPARAMETRAR*.

Genom att använda kontrollerna, standarder med validering och bekräftelsemetoden bör reproducerbart och korrekt resultat erhållas.

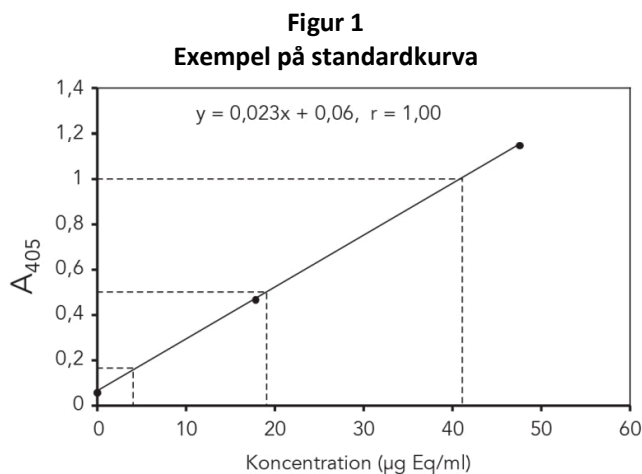
## TOLKNING AV RESULTATEN

### Resultatberäkning

**Beräkningar:** Standardkurvan genereras med hjälp av det blanksubtraherade  $A_{405}$ -värdet för varje CIC-Raji-standard på y-axeln, relativt de tilldelade mikrogrammen serumbehandlade, värmeaggregerade gammaglobulinekvivalenter/ml ( $\mu\text{g Eq/ml}$ ) som indikeras på violetiketten för varje standard på x-axeln. Efter linjär regression måste den genererade standardkurvan uppfylla valideringskraven (se nedan). Provkoncentrationerna beräknas sedan direkt på basis av standardkurvan. De flesta datorer och räknare går att använda för dessa beräkningar.



Alternativt kan berörda data läggas in i ett diagram manuellt och värdena ( $\mu\text{g Eq/ml}$ ) för testproverna läsas av direkt från den standardkurvlinje som passar bäst. Ett exempel på en typisk standardkurva återges i figur 1.



**Beräkning för bekräftelsetest:** För att bekräfta ett positivt resultat dividerar man den immunkomplexkoncentration [CIC] som fastställts för ett prov spätt i CIC-Raji-bekräftelsespädningsmedel med den immunkomplexkoncentration som uppmäts i ett prov spätt i komplementprovspädningsmedel, för att få fram ett förhållande:

$$\text{förhållande} = \frac{[\text{CIC}] \text{ i CIC-Raji-bekräftelsespädningsmedel}}{[\text{CIC}] \text{ i komplementprovspädningsmedel}}$$

Prov	A <sub>405</sub>	$\mu\text{g Eq/mL}$
Standard A	0,6	0
Standard B	0,18	5
Standard C	0,45	17
Standard D	0,75	30
Standard E	1,16	48
Prov 1	0,15	3,9
Prov 2	0,50	19,1
Prov 3	1,00	40,9
r = 1,00	m = 0,023	b = 0,06

### Validering

Bestäm lutningen, avskärningen och korrelationskoefficienten för den härledda linjen som passar in bäst. Värdena måste hamna inom de specificerade intervallen för att kvalificera analysen:

korrelationskoefficient (r): > 0.95

lutning (m): da 0,013 a 0,034

y-avskärning (b): (-)0,07 a (+)0,10

De flesta normala subjekt uppvisar mätbara CIC-halter. Eftersom det inte finns någon bestämd onormal CIC-nivå ska användaren fastställa sina egna normala nivåer. Som en riktlinje så gäller att CIC-nivåerna, på basis av resultat erhållna från de normalpopulationer som beskrivs i *FÖRVÄNTADE VÄRDEN*, är som följer:

**Normala resultat:** Värden på under eller lika med 15 µg Eq/ml betraktas som normala för CIC-nivåer.

**Onormala resultat:** Värden på över eller lika med 20 µg Eq/ml betraktas som onormala för CIC-nivåer. Prov med uppmätta CIC-värden som är högre än för CIC-Raji-standard E ska rapporteras som högre än den tilldelade CIC-Raji-standard E-koncentration som anges på vialetiketten.

**Tvivelaktiga värden:** Värden på över 15 µg Eq/ml eller under 20 µg Eq/ml betraktas som tvivelaktiga. Dessa prov kan antingen testas om, eller också kan man ta ett nytt prov och testa det. Om ett tvivelaktigt prov vid upprepade testning är tvivelaktigt på nytt, ska provet betraktas som betydligt högre än normalt och kan rapporteras som onormalt.

**Bekräftelseresultat:** Om förhållandet är lägre än 0,5 bekräftas det positiva CIC-resultatet. Med andra ord så bekräftar en reduktion på mer än 50 % av den synbara CIC-koncentrationen ett positivt resultat.

Ibland bekräftas inte positiva prover. Att prover inte bekräftas kan bland annat bero på följande: (1) felhanterade prover (exempelvis kontaminerade eller värmeinaktiverade), eller (2) prover som innehåller IgG-antikroppar som binder till mus-IgG. Sådana prover är emellertid inte nödvändigtvis negativa för CIC. Det material som vållar det synbarligen falskt positiva resultatet kan maskera samtidigt förekommande CIC som, om de förelåg separat, annars skulle ha givit upphov till ett bekräftelsebart positivt CIC-resultat.

## PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

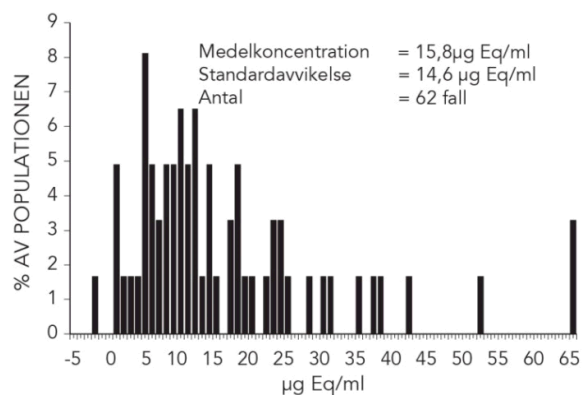
Testet mäter immunkomplex eller aggregat av humant IgG innehållande C3-aktiveringsfragment. Förhållanden som främjar aggregering av IgG eller komplement-aktivering måste därför undvikas vid provtagning och provbehandling.

## FÖRVÄNTAT VÄRDERAR

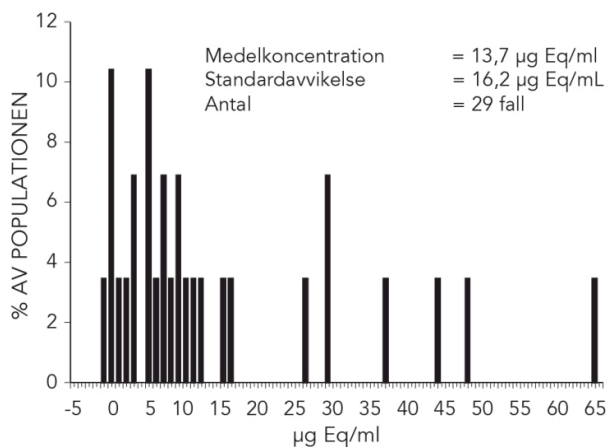
Femtio (50) utvalda sera togs från ett laboratorium som tar emot prover från hela USA. Dessa sera testades i MicroVues EIA för CIC-Raji-cellersättning och i referenslaboratoriets Rajicellanalys. Det förelåg en överensstämmelse på 92 % mellan de två analyserna med avseende på mätning av förekomsten av CIC.

Sera erhållna från sextiotvå (62) SLE-patienter vid två kliniker i östra USA, och från tjugonio (29) RA-patienter vid en reumatikklinik i södra USA, testades med MicroVues EIA för CIC-Raji-cellersättning. Dessutom testades sera från tjugosex (26) normala, friska subjekt vid de två SLE-klinikerna, och från tjugofem (25) kliniskt icke-autoimmuna patienter som rapporterade till reumatikkliniken. CIC-medelkoncentrationerna, standardavvikelserna och frekvensfördelningen för varje population redovisas i figurerna 2, 3 och 4.

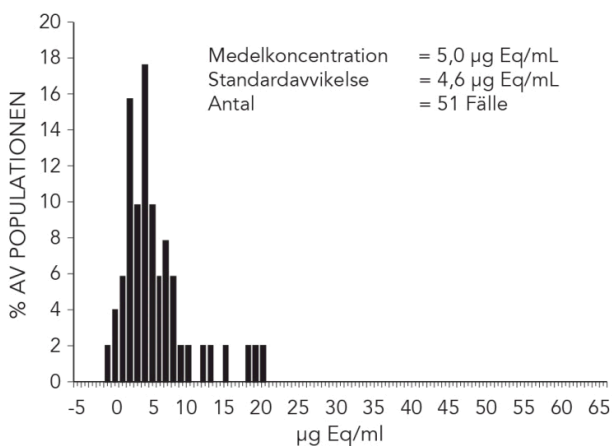
**Figur 2**  
**EIA för CIC-Raji-Cellersättning**  
**Population med systemisk lupus erytematos**



**Figur 3**  
**EIA för CIC-Raji-Cellersättning**  
**Population med rheumatoid artrit**



**Figur 4**  
**EIA för CIC-Raji-Cellersättning**  
**Kontrollpopulation**



Inom en SLE-institution och vid RA-institutionen tilldelades graden sjukdomsaktivitet oberoende av eventuella CIC-laboratoriedata. Denna bedömning gjordes av den eller de verkställande läkarna. För att säkerställa konsekvent rapportering gick en läkare vid vardera institutionen sedan igenom patientjournalerna och tilldelade sjukdomsaktiviteten. En RA-patient beskrevs såsom befinnande sig i ett framskridet skede av "utbrändhet." CIC-resultatet för denna patient var 1 µg Eq/ml. Eftersom det inte förekom några andra liknande RA-patienter har detta individuella resultat inte tagits med i tabell 2. Tabell 2 åskådliggör den observerade relationen mellan det CIC som uppmätts med MicroVues enzymimmunoanalys för CIC-Raji-cellersättning och patienternas sjukdomsaktivitet.

**Tabell 2**  
**Resultaten av CIC-Raji-Cellersättningsanalysen Jämförda med Sjukdomsaktiviteten**

	% Onormala*		
	Låg aktivitet	Medelhög aktivitet	Hög aktivitet
SLE	8 % (1/12)	36 % (4/11)	79 % (11/14)
RA	0 % (0/4)	19 % (3/16)	50 % (4/8)

\* Inom parentes (efter varje värde för % onormala) anges antalet patienter testade som onormala, dividerat med antalet patienter som klassificerats med den specifika sjukdomsaktiviteten.

## PRESTANDAKARAKTERISTIKA

### Noggrannhet

En immunkomplexstandard från WHO (världshälsoorganisationen), bestående av tetanustoxoid-anti-tetanustoxoidkomplex som preinkuberats i färskt normalt humant serum, användes för standardisering av analysen. För att testa analysens noggrannhet testades fem utspädningar av WHO-standarderna i tre exemplar i tre körningar i MicroVuekitet.

De analyserade koncentrationerna uppvisade en korrelation på 0,99 med de kända värdena.

### Reproducerbarhet

Patientprover och kitstandarder testades i nio analyskörningar i två olika kitsatser. Samtliga testades i tre exemplar vid varje analyskörning. Den genomsnittliga variationen för proverna och kitstandarderna mellan de olika körningarna redovisas som variation mellan analyser i tabell 3. Den genomsnittliga variationen för proverna och kitstandarderna inom varje körning redovisas som variation inom analyser i tabell 3.

**Tabell 3**  
**Analysreproducerbarhet**

		Medel	Mellan analyser	Inom analys
		( $\mu\text{g Eq/mL}$ )	(% CV)	(% CV)
<b>Prov</b>	1	56	5	9
	2	13	9	23
<b>Standard</b>	1	4	8	30
	2	11	7	15
	3	23	5	9
	4	32	4	6
	5	40	5	6
	6	48	4	5
	7	59	3	4

### Känslighet

MicroVues EIA för CIC-Raji-cellersättning mäter minst 4  $\mu\text{g Eq/ml}$  eller mer CIC-analyt på basis av jämförelser med WHO-standarderna.

### Specificitet

De femtioen (51) kontrollsera som beskrivs i avsnittet *PROV VÄRDEN* testades i MicroVues analys CIC-Raji-cellersättning. Endast tre av dem var positiva (upprepat över 15  $\mu\text{g Eq/ml}$ ), vilket ger en specificitet på 94 %.

## SUPPORT

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

## REFERENSER

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.
10. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.

**REF** A002 – CIC-Raji Cell Replacement

**IVD**



**EC REP**

MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover,  
Germany



**Quidel Corporation**  
2005 East State Street, Suite 100  
Athens, OH 45701 USA  
[quidel.com](http://quidel.com)

**PIA002001SV00 (04/17)**

## ORDLISTE

---

**REF**

Katalognummer



CE-märkning om överensstämmelse

---

**EC REP**

Auktoriserad representant inom europeiska gemenskapen

**LOT**

Satskod

---



Använd före



Tillverkare

---



Temperaturbegränsning



Avsedd användning

---



Konsultera e-märkning bruksanvisning



Biologisk risk

---

**IVD**

För *in vitro*-diagnostik



Innehållet räcker till 96 bestämningar

---

**CONT**

Innehåll/innehåller

**CONTROL**

Kontroll

---