

Enzym-Immunoassay (EIA) zum Bestimmen der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen Komplementwegs in Humaserum

Zur *In-vitro*-Diagnostik

ZUSAMMENFASSUNG

Vorbereitung von Reagenzien, Kontrollen und Proben

- Waschpuffer vorbereiten
Waschpufferkonzentrat 1:20 verdünnen mit vollentsalztem Wasser
- Rekonstituieren sie die Kontrollen mit 100 µl entionisiertem Wasser
(kurz mischen, 15 min Raumtemperatur ruhen lassen, dann vortexen und bis zum Gebrauch auf Eis lagern)

Testverfahren

Mischen Sie den Aktivator kontinuierlich während des Gebrauchs

Je **86 µl** Aktivator in die Teströhrchen oder Mikroassay-Vertiefungen geben

Je **14 µl** der Kontrollen und Proben in die Teströhrchen oder Mikroassay-Vertiefungen geben und gut mischen

Abdecken der Teströhrchen oder Mikroassay-Vertiefungen und bei 37°C **60 ± 1 Minute** inkubieren
(hiernach können Proben und Kontrollen bis zu 14 Tage bei ≤ -20 °C gelagert werden)

- Die aktivierten Proben und Kontrollen nach der Aktivierung mit Probenverdünnungsmittel im Verhältnis 1:200 verdünnen
HINWEIS: Das empfohlene Verdünnungsschema ist 5 µl aktivierte Probe oder Kontrolle + 995 µl Probenverdünnungslösung

Je **~300 µl** Waschpuffer in die Testvertiefungen geben

Bei 20 °C bis 27 °C **2 Minuten** inkubieren

Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen (Blot dry)

Je **100 µl** Komplement-Probenverdünnungsmittels (Blank), Standardlösungen, aktivierten Kontrollen und aktivierten Proben in die Testvertiefungen geben

Bei 20 °C bis 27 °C **60 ± 1 Minute** inkubieren

7 Waschzyklen mit Waschpuffer (den ersten Waschzyklus 1 Minute inkubieren)

Je **50 µl** Konjugat

Bei 20 °C bis 27 °C **60 ± 1 Minute** inkubieren

7 Waschzyklen mit Waschpuffer (den ersten Waschzyklus 1 Minute inkubieren)

Je **100 µl** Substratlösung

Bei 20 °C bis 27 °C **15 ± 1 Minute** inkubieren

Je **100 µl** Stopplösung

Extinktion bei **450 nm** ablesen
Analysieren Sie die Probe Resultate mit einem linearen Kurve Sitz
($y = mx + b$)



VORGESEHENER VERWENDUNGSZWECK

Mit dem MicroVue CH50 Eq EIA kann die gesamthämolytische Aktivität des klassischen Komplementwegs in Humanserum gemessen werden. Auch ein Mangel der Komplementfaktoren C1 bis C9 kann mit ihm erkannt werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Der klassische Komplementweg wird durch die Bindung der Untereinheit C1q des C1-Faktors an Immunkomplexe ausgelöst. Durch diese Aktivierung wird eine Vielfalt enzymatischer und nicht enzymatischer Reaktionen gestartet, die schließlich in die Bildung terminaler Komplementkomplexe (TCC) mündet. Die Menge an TCC, die unter Standardbedingungen in einem Serum gebildet werden kann, ist eine quantitative Funktion der hämolytischen Gesamtaktivität des klassischen Komplementwegs im Serum.

Traditionell wird die hämolytische Gesamtaktivität des klassischen Komplementwegs mit dem CH50-Test bestimmt.¹ Bei dieser Methode handelt es sich um ein lytisches Verfahren, bei dem der klassische Komplementweg durch Antikörper-sensitivierte Erythrozyten (EA) von Schafen aktiviert wird. Die Menge, die für eine Lyse von 50 % erforderlich ist, wird mittels verschiedener Verdünnungen des Testserums bestimmt. Die prozentuale Hämolyseaktivität wird spektrophotometrisch bestimmt. Das Ergebnis des CH50-Tests dient als ein direktes Maß für TCC, sind die terminalen Komplementkomplexe doch selbst direkt verantwortlich für die gemessene Hämolyseaktivität.

Der MicroVue CH50 Eq EIA ermöglicht durch die quantitative Bestimmung von TCC, das unter Standardbedingungen gebildet wurde, die direkte Messung der hämolytischen Gesamtaktivität des klassischen Komplementwegs. Für den Nachweis der terminalen Komplementkomplexe wird dabei ein monoklonaler Antikörper gegen ein einzigartiges Neoantigen eingesetzt. Da sowohl der CH50 Eq EIA als auch der CH50-Test auf der Bildung von TCC beruhen und miteinander korrelieren, werden die Testergebnisse des CH50 Eq EIA in Äquivalenten von CH50-Einheiten pro Milliliter angegeben.

FUNKTIONSPRINZIP

Die mit dem CH50 Eq EIA durchgeführte quantitative Bestimmung der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen Komplementwegs lässt sich in Humanserum grundsätzlich in drei Verfahrensschritte unterteilen: (1) Komplementaktivierung, (2) Verdünnung der Proben und (3) Bestimmung der terminalen Komplementkomplexe (TCC).

Zum Aktivieren des klassischen Komplementwegs werden unverdünnte Humanserumproben und Kontrollen in Mikroassay-Vertiefungen oder aktivatorhaltige Teströhrchen gegeben. Während der Inkubation wird der klassische Komplementweg ausgelöst und die TCC-Bildung gestartet.

Im zweiten Schritt werden die aktivierten Seren in Mikroassay-Vertiefungen oder Teströhrchen verdünnt und zusammen mit den Standardlösungen des Kits direkt auf eine Mikroassay-Platte gegeben. Die in den aktivierten Proben vorliegenden TCCs werden an die monoklonalen Antikörper gebunden, mit denen die Mikroassay-Vertiefungen beschichtet sind.

Im dritten Verfahrensschritt wird die Mikroassay-Platte gewaschen und dann mit einem HRP-Konjugat gefüllt, das mit dem bereits gebundenen TCC eine Bindung eingeht. Nach dem Waschschrift wird ein chromogenes Enzymsubstrat auf die TCC-Mikroplatte gegeben. Nach der Inkubation wird dann zum Stoppen der Farbentwicklung ein Reagenz hinzugegeben. Die Extinktion (E_{450} -Werte) der Kontrollen, Kit-Standardlösungen und Proben wird spektrophotometrisch gemessen. Die Farbintensität der Reaktionsmischung ist proportional zur TCC-Konzentration und den CH50-Einheiten. Die Testergebnisse der Kit-Standardlösungen werden auf einer Eichgeraden in Äquivalenten von CH50-Einheiten pro Milliliter (CH50 E Äq/ml) dargestellt.

REAGENZEN UND MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Der CH50 Eq EIA enthält folgende Komponenten:

A Standards

- B Standardlösungen** Artikelnr. **A3719-A3723** je **1, 1.5 ml**
C Enthalten Humanserum mit festgelegten Äquivalenten von CH50- Einheiten pro Milliliter (E Äq/ml),
D Proteinstabilisatoren
E

N Normal Controls

- Normale Kontrolle** Artikelnr. **A3724** je **3, 100 µl**
(lyophilisiert) Enthalten nach Wiederherstellung Humanserum

L Low Controls

- Niedrige Kontrolle** Artikelnr. **A3725** je **3, 100 µl**
(lyophilisiert) Enthalten nach Wiederherstellung Humanserum

1 Microassay Plate

- Mikroassay-Platte** Artikelnr. **A3840** je **1**
Platte mit 96 Vertiefungen, einschließlich Feststelleinrichtung und Halterung. Setzt sich aus 12 Teststreifen mit jeweils 8 Vertiefungen zusammen, die mit einem monoklonalen Antikörper von Mäusen beschichtet sind und sich in einem wiederverschließbaren Kunststoffbeutel befinden

2 Stop Solution

- Stopplösung** Artikelnr. **A9947** je **12 ml**
Enthält 1N (4%) Salzsäure

3 20X Wash Solution Concentrate

- 20fach konzentrierte Waschlösung** Artikelnr. **A9957** je **2, 50 ml**
Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 1,0 % Tween-20® und 0,035% ProClin® 300

4 Complement Specimen Diluent

- Komplement-Probenverdünnungsmittel** Artikelnr. **A3670** je **50 ml**
Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 0,05 % Tween-20, 2,5 % Proteinstabilisatoren und 0,035 % ProClin 300

5 TMB Substrate

- TMB Substrat** Artikelnr. **5059** je **12 ml**
Enthält 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

6 Conjugate

- Konjugat** Artikelnr. **A3726** je **7 ml**
Enthält an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte Antikörper (Ziege) gegen TCC

7 Activator

- Aktivator** Artikelnr. **A3718** je **10 ml**
Enthält humanes Gammaglobulin und monoklonale Antikörper von Mäusen in phosphatgepuffertter Kochsalzlösung mit 0,02% Natriumazid

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 Waschsysteem

- Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanäle) Mehrfachmikropipetten (optional)
- Saubere Pipetten, 1 ml, 5 ml und 10 ml
- Mikropipetten und Pipettenspitzen
- Plattenlesegerät für Extinktionsmessungen (E_{450}) über den Bereich von 0,0 bis 3,0
- Vollentsalztes oder destilliertes Wasser
- Inkubator (37 °C) für Mikroassay-Platte
- Wasserbad (37 °C)

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.⁴
- Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen beim Arbeiten mit diesem Kit.
- Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Die Reagenzien des Assays wie angegeben lagern.
- Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
- 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.
- Stopplösung ist ätzend und kann zu Reizungen der Haut. Nicht einnehmen. Berührung mit Haut, Augen und Kleidung vermeiden. Bei Berührung mit Wasser abwaschen. Bei Einnahme einen Arzt konsultieren.
- 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-C-Viren und HBsAg untersucht. Da keine Testmethode mit 100 % iger Sicherheit garantieren kann, dass keine infektiösen Substanzen vorliegen, sollten diese Reagenzien wie alle potenziell infektiösen Human-serum- oder Blutproben gemäß Biosafety Level 2 behandelt werden. Dementsprechende Empfehlungen sind im Handbuch „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,“ 2007, Centers 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 von Proben, Reagenzien oder Materialien vermeiden. Eine Kontamination kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Jede Probe mit Duplikaten testen.
- Die Mikroassay-Vertiefungen jeweils nur für eine Bestimmung verwenden.
- Durch die Verwendung von Inkubationszeiten und -temperaturen, die von den unter *TESTVERFAHREN* gegebenen Werten abweichen, können falsche Ergebnisse erhalten werden.
- Das TMB-Substrat muss während der Lagerung und Inkubation vor Licht geschützt werden. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen.
- 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 handelsüblichem Bleichmittel gesaugt wird.

- Zum Waschen der Platte eine Waschflasche oder ein automatisiertes Dosiergerät verwenden (siehe *TESTVERFAHREN*, Schritt 9). Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassay-Platte verwenden.
- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit und örtlich geltender Bestimmungen entsorgen.

LAGERUNG

Ungeöffnetes Kit bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren. Nach dem Öffnen des Kits können die 20fach konzentrierte Waschlösung 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 (20 °C bis 27 °C) bringen.

ANZEICHEN FÜR INSTABILITÄTEN ODER ZERSETZUNGSVORGÄNGE DER REAGENZIEN

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

Der Aktivator enthält u. U. Schwebstoffteilchen. Dies ist normal und beeinträchtigt die Leistungsfähigkeit des Tests nicht.

ENTNAHME UND LAGERUNG DER PROBEN

Für diesen Test müssen Serumproben verwendet werden. Plasma ist nicht zulässig. **Beim Arbeiten und Entsorgen der Proben die allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten.** Entnahme, Bearbeitung, Aufbewahrung und Transport der Proben müssen fachgerecht durchgeführt werden, da die Komplementfaktoren bei einer unsachgemäßen Handhabung der Proben aktiviert werden können. Ungenaue Testergebnisse sind eine mögliche Folge.

Die Serumproben sollten unter keimfreien Bedingungen entnommen und gemäß Standardverfahren für die klinische Laborpraxis getestet werden. Proben können bis zu 2 Stunden bei Raumtemperatur, bis zu 4 Stunden auf Eis, bis zu 3 Tage bei 4 °C und über längere Zeiträume bei –70 °C oder tieferen Temperaturen eingefroren werden. Die Proben dürfen nicht mehr als sechsmal eingefroren/aufgetaut werden. Eingefrorene Proben sollten unmittelbar nach dem Auftauen getestet oder bis zum Testen auf Eis (nicht länger als vier Stunden) gelagert werden.

Für den Transport sollten die Proben auf viel Eis gelegt werden. Proben, die das Labor im aufgetauten Zustand erreichen, sind u. U. beschädigt. Im Labor neu eingetroffene Proben können bei –70 °C oder tieferen Temperaturen gelagert werden.

VORBEREITUNG VON REAGENZIEN

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 Test auf Raumtemperatur (20 °C bis 27 °C) bringen.

1. 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.

2. 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.

3. Probenverdünnung

VORSICHT: Alle Proben als potenziell infektiöses Material behandeln. Hitzeinaktivierte, kontaminierte oder falsch gelagerte Proben dürfen nicht verwendet werden. Für diesen Test werden Serumproben benötigt.

Serumproben sollten aufgetaut werden, indem sie bei 37 °C kurz in ein Wasserbad gelegt werden. Die Proben unmittelbar nach dem Auftauen bis zur Aktivierung auf Eis legen (siehe *TESTVERFAHREN*). Die Proben vor der Aktivierung nicht verdünnen.

4. Vorbereiten der normalen und niedrigen Kontrollen

Zu einem Fläschchen der lyophilisierten normalen und niedrigen Kontrolle 100 µl vollentsalztes oder destilliertes Wasser geben. Kurz mischen und dann bei Raumtemperatur fünfzehn (15) Minuten ruhen lassen. Erneut im Vortex-Mixer mischen und bis zur Aktivierung auf Eis legen.

TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

Vor dem Fortfahren die unter *VORBEREITUNG VON REAGENZIEN* und *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN* gegebenen Informationen einsehen.

1. **Aktivieren von Proben und Kontrollen.** Den Aktivator, der einfach zu suspendierende Teilchen enthält, durch Schwenken der Flasche mischen. Die Flasche in diesem Schritt wiederholt schwenken, um zu gewährleisten, dass die Teilchen gut suspendiert sind. Je 86 µl Aktivator in die erforderliche Anzahl an Teströhrchen oder Mikroassay-Vertiefungen geben.* Je 14 µl unverdünnte Serumprobe, normale Kontrolle oder niedrige Kontrolle in die Teströhrchen oder Mikroassay-Vertiefungen mit dem Aktivator geben. Gründlich mischen. Abdecken, um die Verdampfung/ Verdunstung auf ein Minimum zu reduzieren. Bei 37 °C für sechzig (60) Minuten inkubieren. (**TIPP:** Sollen die Proben in Chargen getestet werden, können die unverdünnten, aktivierten Proben nach der Aktivierung bei –20 °C oder tieferen Temperaturen bis zum nächsten Verfahrensschritt maximal 14 Tage aufbewahrt werden.)

* Die für die Aktivierung erforderliche Anzahl an Teströhrchen oder Mikroassay-Vertiefungen entspricht der Anzahl der Proben zuzüglich zwei (2) zusätzlicher Röhrchen/Vertiefungen für die beiden Kontrollen.

2. **Verdünnen der aktivierten Proben und Kontrollen.**

Die aktivierten Proben und Kontrollen nach der Aktivierung mit Probenverdünnungsmittel im Verhältnis 1:200 verdünnen. Dazu unbenutzte, saubere Mikroassay-Vertiefungen oder Teströhrchen verwenden.

HINWEIS: Das empfohlene Verdünnungsschema ist 5 µl aktivierte Probe oder Kontrolle + 995 µl Probenverdünnungslösung.

3. 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 Raumtemperatur (20 °C bis 27 °C) für 2 Minuten inkubieren.
 - c. Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - d. Die Platte umdrehen und wiederholt vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
4. 100 µl des Probenverdünnungsmittels in diejenige(n) Duplikatvertiefung(en) geben, die zur Bestimmung des Nullwertes des Plattenlesegeräts verwendet werden sollen (die sog. Blindvertiefungen).

5. Je 100 µl der gebrauchsfertigen Standardlösungen (A–E) in die Duplikatvertiefungen geben. **Die Standardlösungen sind bereits verdünnt und können ohne weitere Vorbereitungen eingesetzt werden.**
6. Je 100 µl der verdünnten, aktivierten normalen und niedrigen Kontrollen in die Duplikatvertiefungen geben.
7. Je 100 µl der verdünnten Probe (als Duplikate) in die entsprechenden Mikroassay-Vertiefungen geben.
8. Bei Raumtemperatur (20 °C bis 27 °C) für 60 ± 1 Minuten inkubieren.
9. Die Mikroassay-Vertiefungen wie folgt waschen: *Hinweis: Für diesen Schritt sollte **keine Mehrkanalpipette eingesetzt werden.***
 - a. Nach der Inkubation von Schritt 8 (und Schritt 12 — siehe unten) die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - b. Die Vertiefungen mit einer Waschflasche, einem automatisierten Plattenwaschgerät oder einer anderen Wascheinrichtung mit jeweils 250–300 µl Waschlösung füllen.
 - c. Die Vertiefungen bei Raumtemperatur (20 °C bis 27 °C) für 1 Minute inkubieren.
 - d. Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - e. Alle Vertiefungen mit jeweils 250–300 µl Waschlösung füllen.
 - f. Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - g. **Die Schritte e-f fünfmal wiederholen.**
 - h. Die Platte nach dem siebent Waschschritt umdrehen und wiederholt vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
10. Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette jeweils 50 µl des Konjugats in die gewaschenen Testvertiefungen und die Blindvertiefungen geben.
11. Die Mikroassay-Teststreifen bei Raumtemperatur (20 °C bis 27 °C) für 60 ± 1 Minuten inkubieren.
12. Die Mikroassay-Vertiefungen nach der 60 Minuten dauernden Inkubation wie in Schritt 9 beschrieben waschen.
13. Unmittelbar nach dem Waschschritt je 100 µl der TMB Substrat in die Vertiefungen und Blindvertiefung(en) geben.
14. Die Mikroassay-Teststreifen bei Raumtemperatur (20 °C bis 27 °C) für 15 ± 1 Minuten inkubieren.
15. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion je 100 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.
16. Innerhalb von einer Stunde nach der Zugabe der Stopplösung die Extinktion der Testvertiefungen bei 450 nm bestimmen (E_{450} -Wert) und eine Blindwertkorrektur vornehmen. Die Verwendung eines Referenzfilters ist nicht erforderlich.
17. Die verbleibenden verdünnten Proben, Kontrollen, Aktivator und benutzten Mikroassay-Teststreifen entsorgen (siehe *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*). Den Halter und die Feststelleinrichtung für Teststreifen für zukünftige Bestimmungen aufbewahren.

QUALITÄTSKONTROLLE

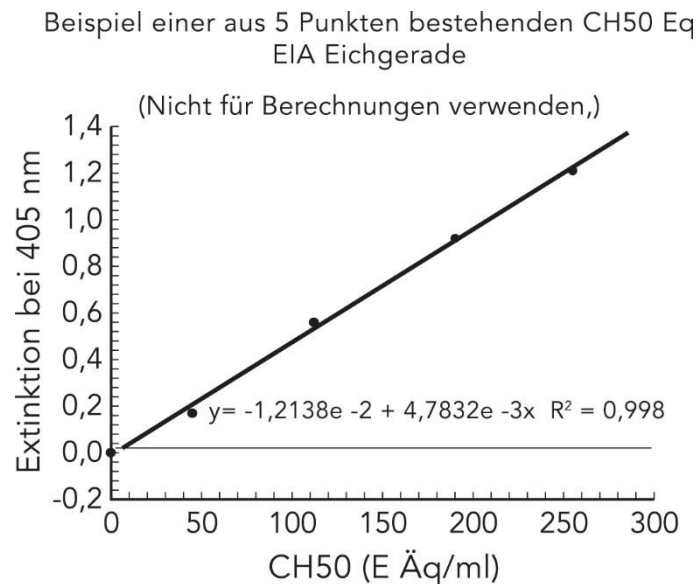
Gute Laborpraxis empfiehlt die Verwendung von Kontrollen, um sicherzustellen, dass der Assay richtig funktioniert. Jedes CH50-Eq-EIA-Kit beinhaltet normale und niedrige Kontrollen, die für diesen Zweck verwendet werden können. Diese Kontrollen sollten mindestens einmal pro Probensatz, d. h. einmal pro Aktivierungs-Testserie, getestet werden. Die Kontrollen sollten bei anweisungsgemäßer Verwendung für CH50 äquivalente Werte zeigen, die innerhalb der auf dem Analysezertifikat angegebenen Bereiche liegen. Da diese Kontrollen genau wie eine typische Probe aktiviert, verdünnt und getestet werden sollen, dienen sie sowohl als Kontrollen als auch als Referenzstandards für jede Aktivierungs- und CH50-Eq-EIA-Testserie. Zudem können von Ihrem Labor vorbereitete externe Kontrollen verwendet werden, um sicherzustellen, dass der Assay richtig funktioniert.

Zudem wird auf der Packungsbeilage angegeben, dass die Eichgerade, die mit den Standardlösungen A–E des Testkits erstellt wurde, strengen Validierungsanforderungen gerecht werden muss (siehe *AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE*). Die Standardlösungen sollten für jede Testserie als Duplikate getestet werden. Erfüllt der Test diese Anforderungen nicht, den Test wiederholen oder den technischen Service von Quidel verständigen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Eichgerade: Die Eichgerade des CH50_Eq_EIA wird mit den Blindwert-korrigierten E_{450} -Werten der verschiedenen Standardlösungen (auf der y-Achse) und den entsprechenden Standardkonzentrationen (auf der x-Achse) erstellt. 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.

Abb 1. Beispiel einer Eichgeraden



Berechnen der CH50 E Äq/ml-Werte in den Proben der Patienten: Die Testergebnisse der Proben werden mit Hilfe einer linearen Regression von der Eichgerade berechnet. Für Proben, die vor dem Testen aktiviert und im Verhältnis 1:200 verdünnt wurden, kann der CH50 E Äq/ml-Wert direkt von der Eichgerade abgelesen werden. Auch die Werte (E Äq/ml) der normalen und niedrigen Kontrollen können direkt von der Eichgerade abgelesen werden, da auch sie im Verhältnis 1:200 verdünnt wurden.

Um für Proben mit E_{450} -Werten, die über dem E_{450} -Wert von CH50 Eq EIA Standardlösung E (oder unter dem E_{450} -Wert von Standardlösung A) liegen, genaue CH50-Bestimmungen zu erhalten, müssen die Proben u. U. mit einem anderen Verdünnungsverhältnis erneut getestet werden, so dass ihre neuen E_{450} -Werte innerhalb dieser Grenzwerte liegen. Bei allen Testwiederholungen müssen auch Standardlösungen und Kontrollen gemessen werden.

Wird eine Probe in einem anderen Verdünnungsverhältnis als 1:200 gemessen, müssen die CH50-Werte der Probe für diese Abweichung entsprechend korrigiert werden. Wird eine Probe z. B. nicht 200fach, sondern 100fach verdünnt und beträgt die anhand der linearen Regression berechnete Konzentration 100 CH50 E Äq/ml, so lautet die tatsächliche Konzentration der Probe 50 CH50 E Äq/ml (d.h. 100 CH50 E Äq/ml geteilt durch 2).

Validierung

Für die normalen und niedrigen Kontrollen den Wert CH50 E Äq/ml berechnen. Darüber hinaus für die Regressionsgerade, die mit den Werten der Standard-lösungen A–E erstellt wurde, den Korrelationskoeffizienten (r) und den Schnittpunkt mit der y-Achse (b) bestimmen. Für die erfolgreiche Validierung des Tests müssen die Werte von r , b und der Kontrollen innerhalb der im Folgenden aufgeführten Bereiche liegen:

Korrelationskoeffizient (r): > 0,96

y-Schnittpunkt (b): (-)0,090 bis (+)0,068

Hang (m): 0,0033 bis 0,0089

Normale und niedrige Kontrolle: Innerhalb der auf dem Analysezertifikat angegebenen Bereiche

GRENZEN DER METHODE

Der MicroVue CH50 Eq EIA wurde zum Testen von Serumproben verwendet. Die Eignung des Tests für mit verschiedenen Antikoagulanzen versetzten Plasmaproben wurde nicht untersucht.

ERWARTETE WERTE

Es wurden 234 normale und anomale Serumproben mit dem MicroVue CH50 Eq EIA getestet. Der für die Gruppe der normalen Proben erhaltene Mittelwert betrug 133 ± 54 CH50 E Äq/ml. Der Grenzwert von 70 CH50 E Äq/ml, der für diese normalen und anomalen Serumproben mittels ROC (Receiver Operator Characteristics)-Analyse² erhalten wurde, soll als Richtlinie gelten. Jedes Labor sollte eigene Grenzwerte für den normalen Bereich festlegen.

Mit dem MicroVue CH50 Eq EIA wurden 221 Proben von Patienten getestet, die von einem großen, in den USA ansässigen Referenzlabor stammten. Im Vergleich zu drei hämolytischen Tests und einem Enzym-Immunassay wurde auf Grundlage des Grenzwertes von 70 CH50 E Äq/ml und der ROC-Analyse eine Gesamtgenauigkeit von über 97 % erhalten.

Auf konventionellen Messungen der klinischen Leistungsfähigkeit beruhend, wurde mit dem MicroVue CH50 Eq EIA eine klinische Genauigkeit von über 97 % erhalten. Die Sensitivität betrug dabei 93,2 % und die Spezifität 99,4 %. Nach dem Verfahren von Bablok-Passing³ wurde zwischen den CH50 E Äq-Werten des MicroVue CH50 Eq EIA und den CH50-Werten des konventionellen hämolytischen Tests des klinischen Labors eine gute Korrelation gefunden ($p < 0,001$).

LEISTUNGSDATEN

Präzision

Die Präzision „in der Serie“ und „von Serie zu Serie“ wurde für 16 Replikate von 4 Serumproben in 10 verschiedenen Testserien ermittelt.

Probe	CH50 (E Äq/ml)	In der Serie ¹ C.V. (%)	Von Serie zu Serie ² C.V. (%)
Serum	150,4	3,2	6,0
	59,96	4,5	5,4
	98,84	3,6	8,7
	48,86	3,9	6,2

¹n = 16 replicate

²n = 10 testserien

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. Mayer, M.M. Complement and Complement Fixation. In: Kabat E.A., Mayer, M.M., eds. *Experimental Immunochemistry*. 2nd ed. Springfield: Charles C Thomas, 1961:133-71.

2. "Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic (ROC) Plots." Tentative Guideline, Dec. 1993. *NCCLS Document GP109-T*, Vol. 13, No 28.
3. Passing, H. And W. Bablok. "A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21(1): 709-720 (1983).
4. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.

MicroVue ist eine Marke der Quidel Corporation. Alle anderen in diesem Dokument genannten Marken befinden sich im Besitz der jeweiligen Eigentümer und ihre Nutzung in diesem Dokument bedeutet nicht, dass irgendwelche Produkte oder Dienste gesponsert oder empfohlen werden.

REF A018 – MicroVue CH50 Eq EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germania



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

PIA018003DE00 (09/21)

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



ACHTUNG: Gesundeheitsschädlich beim Verschlucken (oral)



Biogefährdung

IVD

Zur *In-vitro*-Diagnostik



Inhalt ist ausreichend für 96 Bestimmungen

CONT

Inhalt/Enthält

CONTROL

Kontrolle
