

Enzymimmunoassay zum Bestimmen funktioneller C1-Inhibitorproteine in Humanplasma oder-serum

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

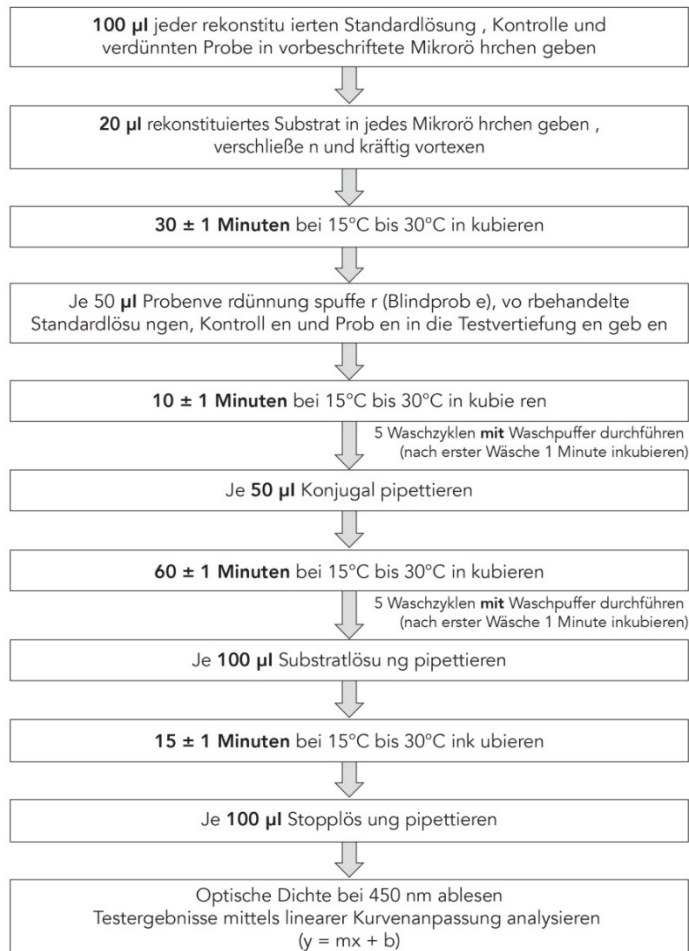
Eine Erklärung zu den Symbolen finden Sie unter quidel.com/glossary.

ZUSAMMENFASSUNG

Reagenz, Standardlösungen, Kontrollen und Vorbereitung von Proben

- Konzentrierte Waschlösung im Verhältnis 1 :20 mit entionisiertem Wasser verdünnen
- Konzentrierten Probenverdünnungspuffer im Verhältnis 1 :5 mit entionisiertem Wasser verdünnen
- Jede Standardlösung und Kontrolle mit 1,0 ml Hydrierungsreagenz rekonstituieren (15 Minuten stehen lassen und dann gründlich mischen)
- C1-Inhibitorsubstrat mit 0,5 ml Hydrierungsreagenz rekonstituieren (leicht schwenken und 15 Minuten lang stehen lassen) (1 Fläschche n reicht für ca. 25 Proben)
- Proben im Verhältnis 1:101 mit 1-fach konzentriertem Probenverdünnungspuffer verdünnen (z. B. 10 µl + 1 ml)

Testverfahren





VORGESEHENER VERWENDUNGSZWECK

Der MicroVue C1-Inhibitor Enzymimmunoassay dient zum Bestimmen funktioneller C1-Inhibitorproteine in Humanplasma oder Humanserum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Beim C1-Inhibitor (C1-INH) handelt es sich um einen multispezifischen Proteaseinhibitor, der in normalem Humanplasma und -serum vorkommt und in Komplement-, Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systemen sowie in kininbildenden Systemen eine enzymregulierende Aufgabe hat.¹ Zu den durch dieses Protein regulierten Enzymen (Proteasen) gehören die C1r- und C1s-Untereinheiten des ersten aktivierten Komplementfaktors, der aktivierte Hageman-Faktor (Faktor XIIa), Fragmente des Hageman-Faktors, das aktivierte Plasma-Thromboplastin-Antecedent (PTA oder Faktor XIa), Kallikrein (Fletcher-Faktor) und Plasmin.²

Ein Mangel an funktionell aktivem C1-INH kann zu lebensbedrohlichen Angioödem führen. Es wurde von zwei Hauptformen des C1-INH-Mangels berichtet: zum einen die als hereditäres Angioödem (HAE)^{3,4} bezeichnete kongenitale Form und zum anderen die erworbene Form, die mit einer Vielzahl von Krankheiten, wie beispielsweise malignen Erkrankungen der Lymphozyten, im Zusammenhang steht.⁵ Hereditäre Angioödem werden normalerweise von transitorischen und rezidivierenden, anfallartig ablaufenden, nicht-pruritischen Schwellungen begleitet, die verschiedene Körpergewebe betreffen können. Die Symptomatologie hängt von den betroffenen Organen ab. Intestinale Anfälle führen zu einer Vielzahl von Symptomen, zu denen Schmerzen, Krämpfe, Erbrechen und Durchfall zählen. Die häufigste Todesursache bei dieser Krankheit ist ein Verschluss der Atemwege infolge eines Kehlkopfödems, das im Verlauf des Anfalls entsteht. Biochemisch lassen sich zwei Typen von hereditären Angioödem unterscheiden. Patienten mit dem häufiger auftretenden Typ (85% der HAE-Patienten) haben niedrige Werte an funktionellem C1-INH und C1-INH-Antigen. Bei den Patienten vom zweiten Typ (15% der HAE-Patienten) finden sich zwar niedrige Werte des funktionellen C1-INH, die Werte des C1-INH-Antigens sind jedoch aufgrund eines dysfunktionellen Proteins normal oder erhöht.⁶

Die Veränderlichkeit der Symptome über den Verlauf der Krankheit macht es unmöglich, eine Diagnose zu stellen, die ausschließlich auf den klinischen Daten beruht. Hereditäre oder erworbene Angioödem können nur mit Hilfe von Labortests eindeutig diagnostiziert werden, bei denen eine deutliche Reduktion der funktionellen C1-INH-Werte im Plasma oder Serum des Patienten nachgewiesen werden kann.

Für den Nachweis von funktionellem C1-INH oder C1-INH-Antigen wurden verschiedene Methoden veröffentlicht. Dazu gehören Methoden der Enzyminhibition,^{7,8} der radialen Immundiffusion,⁹ Immunelektrophorese und die Inhibition der Immunhämolysen.¹⁰ Jede dieser Methoden weist ganz bestimmte Nachteile auf. Die Einrichtung und Durchführung von Enzyminhibitionstests⁷ lässt sich im Routinebetrieb nur problematisch gestalten. Immunchemische Methoden zum Bestimmen des Gesamtantigengehalts sind dagegen nicht in der Lage, zwischen funktionellen und nicht funktionellen C1-INH-Proteinen zu unterscheiden und die Anti-C1r-Immundiffusionsmethode,⁹ die für die Bestimmung der funktionellen C1-INH-Aktivität entwickelt wurde, ist nicht quantitativ. Der MicroVue Test ermöglicht es, als bequemer, standardisierter und reproduzierbarer EIA funktionell aktive C1-INH-Proteine in Plasma- oder Serumproben quantitativ zu bestimmen.

FUNKTIONSPRINZIP

Der MicroVue C1-Inhibitor-Enzym-Immunoassay dient zur quantitativen Bestimmung funktioneller C1-Inhibitorproteine (einem Proteaseinhibitor) in Humanplasma oder Humanserum und besteht aus vier Verfahrensschritten. Im ersten Schritt werden Standardlösungen, Kontrollen und Proben mit C1-Inhibitorsubstrat (biotinyliertes, aktiviertes C1s) inkubiert. Während dieser Inkubation geht der in den Standardlösungen, Kontrollen und Proben vorliegende, funktionell aktive C1-INH Bindungen mit dem C1-Inhibitorsubstrat ein und bildet so Komplexe.

Im zweiten Schritt wird ein aliquoter Teil der Inkubations-mischung, in dem sich das C1-Inhibitorsubstrat befindet, in die mit Avidin beschichteten Mikrotiter-Vertiefungen gegeben. C1-Inhibitorsubstrat: In den Standardlösungen, Kontrollen oder Proben vorliegende C1-INH-Komplexe werden an die mit Avidin beschichteten Mikroassay-Vertiefungen gebunden. Nach einer Inkubationszeit wird durch einen Waschzyklus ungebundenes Material entfernt.

Im dritten Schritt wird an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierter antihumaner C1-INH von Ziegen in die verschiedenen Testvertiefungen gegeben. Der HRP-konjugierte Anti-C1-INH wird in diesem Schritt an C1-Inhibitorsubstrat C1-INH-Komplexe, die vom Avidin in den Mikroassay-Vertiefungen erfasst wurden, gebunden. Nach der Inkubation wird das überschüssige Konjugat im Waschschrift entfernt.

Im vierten Schritt wird ein chromogenes Enzymsubstrat in die verschiedenen Mikroassay-Vertiefungen gegeben. Das gebundene HRP-Konjugat reagiert mit dem Substrat und bildet dabei eine blaue Farbe. Nach einer Inkubationszeit wird die Enzymreaktion chemisch gestoppt, was zu einer Farbänderung von Blau zu Gelb führt. Die Farbintensität wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Farbintensität der Reaktionsmischung ist proportional zur Konzentration der funktionellen C1-INH-Proteine, die in den Proben, Standardlösungen und Kontrollen vorliegen.

REAGENZIEN UND MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Der C1-Inhibitor-Enzymimmunassay enthält die folgenden Komponenten:

A	C1-INH Standardlösungen	Artikel-Nr. A4469-A4473	je 2 x 1 ml
	(lyophilisiert) Bei Wiederherstellung enthält jede Standardlösung eine bekannte Menge an		
E	C1-Inhibitor in Humanplasma, phosphatgepufferte Kochsalzlösung und Stabilisatoren		
L	Anomale C1-INH-Kontrolle (human)	Artikel-Nr. A9524	2 x 1 ml
	(lyophilisiert) Bei Wiederherstellung enthält jede Kontrolle Humanplasma mit einer geringen Konzentration an C1-Inhibitor in phosphatgepuffert Kochsalzlösung und Stabilisatoren		
N	Normale C1-INH-Kontrolle (human)	Artikel-Nr. A9523	2 x 1 ml
	(lyophilisiert) Bei Wiederherstellung enthält jede Kontrolle Humanplasma mit einer normalen Konzentration an C1-Inhibitor in phosphatgepuffert Kochsalzlösung und Stabilisatoren		
1	Mikroassay-Platte	Artikel-Nr. 4634	je 1
	Mit Avidin beschichtete Teststreifen mit jeweils 8 Vertiefungen in einem wiederverschließbaren Folienbeutel		
2	Stopplösung	Artikel-Nr. A9947	12 ml
	Enthält 1 N (4%) Salzsäure		
3	20-fach konzentrierte Waschlösung	Artikel-Nr. A9957	2 x 50 ml
	Enthält im verdünnten Zustand phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 0,05%iges Tween-20® und 0,035%iges Proclin® 300		
4	5-fach konzentrierter Probenverdünnungspuffer	Artikel-Nr. A9519	25 ml
	Enthält im verdünnten Zustand phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Stabilisatoren und 0,035%iges ProClin 300		
5	TMB-Substratlösung	Artikel-Nr. 5059	12 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid		
6	C1-Inhibitorsubstrat	Artikel-Nr. A9527	5 x 0,5 ml
	Enthält bei Wiederherstellung biotinyliertes (biotinkonjugiertes), aktiviertes C1 ⁻ in phosphatgepuffert Kochsalzlösung mit Stabilisatoren		

- | | | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------|
| 7 | C1-Inhibitor-konjugat
Enthält peroxidasekonjugierten antihumanen C1-Inhibitor (Ziege) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung, Stabilisatoren | Artikel-Nr. A9525 | 7 ml |
| 8 | Hydrierungsreagenz
Enthält 0,035%iges ProClin 300 | Artikel-Nr. A3675 | 25 ml |

Tween® 20 ist eine eingetragene Marke der ICI Americas Inc.
ProClin® ist eine eingetragene Marke der 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 Proberöhrchen und Ständer
- Behälter für die Verdünnung des Waschpuffers
- Waschflasche oder anderes, für Immunassays geeignetes Waschsysteem
- Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanäle) oder Mehrfachmikropipetten (optional)
- Saubere Pipetten, 1 ml, 5 ml und 10 ml
- Mikropipetten und Pipettenspitzen
- Plattenlesegerät für Messungen der optischen Dichte A_{450} im Bereich von 0,0 bis 3,0
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Zur *In-vitro*-Diagnostik.
- Bei der Arbeit mit diesem Kit und den Patientenproben die allgemein gültigen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit oder örtlich geltender Richtlinien 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 bzw. Gesichtsschutz tragen.
- Die Testreagenzien wie angegeben lagern.
- Beim Hinzufügen oder Ansaugen von Flüssigkeiten zu bzw. von den Mikroassay-Vertiefungen nicht den Boden der Vertiefungen ankratzen oder berühren.
- Wenn die Inkubationszeiten und -temperaturen bei der Testdurchführung von den Vorgaben im Abschnitt „Testverfahren“ abweichen, können falsche Ergebnisse auftreten.
- Die Mikroassay-Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
- Eine Mikroassay-Vertiefung jeweils nur für einen Test verwenden.
- Für ein zügiges und effizientes Dosieren der Reagenzien wird der Gebrauch von Mehrkanal- oder Mehrfachpipetten empfohlen.
- Um genaue Messungen zu gewährleisten, 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 Stopplösung ist ätzend und kann Reizungen verursachen. Nicht einnehmen. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen. Im Fall der Einnahme einen Arzt aufsuchen.
- 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 der guten Laborpraxis beachten, um die Exposition möglichst gering zu halten. Beim Auftreten erster Symptome einen Arzt aufsuchen.

- Das TMB-Substrat ist lichtempfindlich und muss bei der Lagerung und während der Inkubation vor Licht geschützt werden. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen.
- Um beim Waschen die Bildung von Aerosolen zu vermeiden, eine Vorrichtung verwenden, mit der die Waschflüssigkeit in eine Flasche mit haushaltsüblichem Bleichmittel gesaugt wird.
- Hitzeinaktivierte, hyperlipämische oder kontaminierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
- Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
- Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt (SDB) auf quidel.com, um weitere Informationen zu Gefahrensymbolen, Sicherheit, Handhabung und Entsorgung der Komponenten in diesem Kit zu erhalten.

LAGERUNG

Ungeöffnetes Kit bei 2°C bis 8°C aufbewahren. Nach dem Öffnen des Kits können die 20-fach 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 umgehend wieder auf die erforderliche Lagertemperatur bringen. Alle Reagenzien und Materialien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (15°C bis 30°C) bringen.

ANZEICHEN FÜR INSTABILITÄTEN ODER ZERSETZUNGSVORGÄNGE DER REAGENZIEN

Eine Trübung oder Farbveränderung der verdünnten Waschlösung weist auf einen Zersetzungsprozess des betreffenden Reagenz hin. In diesem Fall muss die Lösung entsorgt werden.

ENTNAHME UND LAGERUNG DER PROBEN

Bei der Handhabung und der Entsorgung aller 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. Beste Ergebnisse werden mit frisch entnommenen, nicht hämolysierten Proben erzielt. EDTA-Plasmaproben können bei Raumtemperatur (15°C bis 30°C) bis zu 24 Stunden aufbewahrt werden. Serumproben sollten dagegen nicht länger als 6 Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden. Ist eine Lagerung über längere Zeiträume erforderlich, müssen Plasma- und Serumproben eingefroren werden (mindestens –20°C). Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Schwebstoffteilchen sollten vor dem Testen durch Zentrifugieren bei niedrigen Drehzahlen von den Proben entfernt werden.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (15°C bis 30°C) bringen. Das Kit nach dem Test wieder im Kühlschrank (2°C bis 8°C) lagern. Nach der Entnahme der erforderlichen Reagenzien und Materialien die nicht benötigten Komponenten wieder auf die entsprechende Lagertemperatur bringen (siehe *LAGERUNG*). Die erforderlichen Mengen an Reagenzien und Materialien sind in der Tabelle aufgeführt.

1. Waschlösung

Die 20-fach konzentrierte Waschlösung durch mehrfaches Umdrehen der Flasche mischen. Wenn die 20-fach konzentrierte Waschlösung bei 2°C bis 8°C gelagert wurde, haben sich u. U. Kristalle gebildet. Zum Auflösen dieser Kristalle die Flasche in einem 37°C bis 50°C warmen Wasserbad erwärmen, bis sich alle Kristalle aufgelöst haben, und anschließend sorgfältig mischen. Gründlich mischen. Die Waschlösung zum Waschen der Mikroassay-Vertiefungen vorbereiten, indem der gesamte Inhalt einer Flasche mit 20-fach konzentrierter Waschlösung mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf bis 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. Auswählen der Mikroassay-Teststreifen

Die Anzahl der zu testenden Proben bestimmen und fünfzehn (15) Vertiefungen für die fünf Standardlösungen, die zu testenden normalen und anomalen Kontrollen (in Duplikaten) sowie eine Blindvertiefung hinzufügen. Duplizierte Standardlösungen und Kontrollen sollten sofern möglich auf separaten Mikroassay-Teststreifen getestet werden. Entsprechend der Anzahl der erforderlichen Vertiefungen die gewünschte Anzahl an Teststreifen entnehmen Die für den Test zu verwendenden Teststreifen im Plattenrahmen befestigen. Die nicht benötigten Teststreifen wieder in den Beutel legen, den Beutel verschließen und bei 2°C bis 8°C lagern.

3. Wiederherstellen der C1-Inhibitor-Standardlösungen, Kontrollen und des C1-Inhibitorsubstrats

In die Standardfläschchen (A-E) und die Kontrollen je 1 ml Hydrierungsreagenz geben. In jedes benötigte Fläschchen des C1-Inhibitorsubstrats 0,5 ml Hydrierungsreagenz geben. (Ein Fläschchen reicht für ungefähr 25 Proben.) Die rekonstituierten Fläschchen mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur (15°C bis 30°C) rehydrieren lassen und dann gründlich mischen. Darauf achten, dass sich beim Mischen kein Schaum und keine Blasen bilden. Rekonstituierte Standardlösungen und Kontrollen sind – vorausgesetzt, sie werden bei 2°C bis 8°C gelagert – 30 Tage stabil. **HINWEIS: Vor der Durchführung des Tests ist keine weitere Verdünnung der rekonstituierten Standardlösungen und Kontrollen erforderlich.** Da das Kit vier (4) Fläschchen C1-Inhibitorsubstrat umfasst, können mit den Materialien des Kits bis zu vier (4) verschiedene Testserien durchgeführt werden. **Rekonstituiertes C1-Inhibitorsubstrat ist bei 2°C bis 8°C bis zu vierundzwanzig (24) und bei 15°C bis 30°C bis zu zwei (2) Stunden stabil.**

4. Vorbereiten des 1-fach konzentrierten Probenverdünnungspuffers

Informationen zur Bestimmung der erforderlichen Menge an 1-fach konzentriertem Probenverdünnungspuffer sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Die erforderliche Menge an 1-fach konzentriertem Probenverdünnungspuffer vorbereiten, indem die angegebenen Volumina entionisierten oder destillierten Wassers und 5-fach konzentrierten Probenverdünnungspuffers miteinander vermischt werden.

Tabelle 1
1-Fach Konzentrierter Probenverdünnungspuffer (Erforderliche Mengen und Vorbereitung)

Anz. Streifen	Erforderlicher 1-fach konz. Probenverdünnungspuffer (ml)	Volumen der erforderlichen Reagenzien	
		Wasser (ml)	5-fach konz. Probenverdünnungspuffer (ml)
2	6	4,8	1,2
3	15	12,0	3,0
4	22	17,6	4,4
5	30	24,0	6,0
6	38	30,4	7,6
7	46	36,8	9,2
8	54	43,2	10,8
9	62	49,6	12,4
10	70	56,0	14,0
11	78	62,4	15,6
12	86	68,8	17,2

5. Probenverdünnung

Die Anzahl (N) der zu testenden Proben bestimmen. Die Teströhrchen mit 1 bis N beschriften und die Probedaten jedes Teströhrchens schriftlich festhalten. Von jeder Probe mit dem 1-fach konzentrierten Probenverdünnungsmittel 1 ml einer 1:101-Verdünnung (10 µl Probe auf 1 ml 1-fach konzentriertem Probenverdünnungspuffer) ansetzen. Gründlich mischen, dabei jedoch Schaum- und Blasenbildung vermeiden. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden.

TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

Vor dem Fortfahren die unter *VORBEREITUNG DER REAGENZIEN* angegebenen Informationen durchlesen.

1. Die Positionen der Mikroassay-Vertiefungen aller Proben, Standardlösungen und Kontrollen sowie die auf den Flaschenetiketten angegebenen Chargennummern auf einem Datenblatt schriftlich festhalten. Die Ausrichtung der Mikroassay-Platte durch die Markierung einer Plattenecke kennzeichnen.
2. Behandeln von Standardlösungen, Kontrollen und Proben mit dem C1-Inhibitorsubstrat:
 - a. Je 100 µl der rekonstituierten C1-Inhibitor-Standardlösungen (A, B, C, D und E) in die beschrifteten Mikroröhrchen geben.
 - b. Je 100 µl der anomalen und normalen C1-Inhibitor-kontrollen in die beschrifteten Mikroröhrchen geben.
 - c. Je 100 µl der 1:101-verdünnten Proben (siehe Schritt 5 *Probenverdünnung* unter *VORBEREITUNG DER REAGENZIEN*) in ein beschriftetes Mikroröhrchen geben.
 - d. Je 20 µl des frisch rekonstituierten C1-Inhibitor-substrats in die Mikroröhrchen mit den Standardlösungen, Kontrollen und verdünnten Proben geben. Die Mikroröhrchen kräftig vortexieren.
 - e. Die Mikroröhrchen 30 ± 1 Minuten bei 15°C bis 30°C inkubieren.
3. Je nach den Anforderungen des EIA-Plattenlesegeräts eine oder mehrere der Vertiefungen für die Blindwertbestimmung (Blindvertiefungen) auswählen und 50 µl des 1-fach konzentrierten Probenverdünnungspuffers in diese Mikroassay-Vertiefungen geben.
4. Je 50 µl der mit C1-Inhibitorsubstrat behandelten (Schritt 2) Standardlösungen und Kontrollen in die als Duplikate vorgesehenen Mikroassay-Vertiefungen geben. Je 50 µl der mit C1-Inhibitorsubstrat behandelten (Schritt 2) Proben in die vorgesehenen Mikroassay-Vertiefungen geben.
5. 10 ± 1 Minuten bei 15°C bis 30°C inkubieren.
6. Die Mikroassay-Vertiefungen wie folgt waschen:

Hinweis: Das Waschen der Mikroassay-Vertiefungen ist von großer Bedeutung. Die Waschanleitungen müssen daher genau befolgt werden.

 - a. Nach der Inkubation aus Schritt 5 (und Schritt 8 unten) die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - b. Mit einer Waschflasche oder einer geeigneten Füllvorrichtung Waschlösung (ungefähr 300 µl) in jede Vertiefung geben.
 - c. Die Vertiefungen 1 Minute bei 15°C bis 30°C inkubieren.
 - d. Die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen.
 - e. Alle Vertiefungen mit (ungefähr 300 µl) Waschlösung füllen.
 - f. Die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen.
 - g. Die Schritte e–f dreimal wiederholen.**
 - h. Nach dem fünften Waschzyklus die Platte umdrehen und kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeit zu entfernen. **Die Vertiefungen nicht austrocknen lassen.**
7. Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette jeweils 50 µl des C1-Inhibitor-konjugats in die gewaschenen Testvertiefungen und die Blindvertiefung(en) geben.
8. Die Mikroassay-Teststreifen 60 ± 1 Minuten bei 15°C bis 30°C inkubieren.
9. Die Mikroassay-Vertiefungen nach der 60-minütigen Inkubation (Schritt 8) wie unter *TESTVERFAHREN* beschrieben waschen.
10. Unmittelbar nach dem Waschverfahren 100 µl der TMB-Substratlösung in jede Vertiefung geben, auch in die Blindvertiefung(en).

11. Die Mikroassay-Teststreifen 15 Minuten bei 15°C bis 30°C inkubieren.
12. In jede Vertiefung 100 µl Stopplösung geben, um die enzymatische Reaktion zu stoppen. Die Zugabe der Stopplösung in die Vertiefungen sollte in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgen wie die Zugabe der Substratlösung. Die Platte auf dem Labortisch vorsichtig antippen, damit sich die Farbentwicklung des Substrats gleichmäßig verteilt.
13. Innerhalb von einer Stunde nach der Zugabe der Stopplösung (Schritt 12) die Extinktion für jede Testvertiefung bei 450 nm bestimmen (A_{450} -Wert) und je nach verwendetem Spektrophotometer eine Blindwertkorrektur vornehmen.
14. Die verbleibenden verdünnten Proben, Kontrollen, Substrate, Konjugate, C1-Inhibitorsubstrate und die benutzten Mikroassay-Teststreifen entsorgen (siehe *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*). Den Halter und die Feststelleinrichtung für Teststreifen für spätere Verwendung aufbewahren.

QUALITÄTSKONTROLLE

Gemäß guter Laborpraxis sollten Kontrollen verwendet werden, um die Richtigkeit der Testergebnisse zu gewährleisten. Zu diesem Zweck enthalten die C1-Inhibitor-Kits normale und anomale Kontrollen. Diese Kontrollen sollten mindestens einmal pro Probencharge, d. h. einmal pro Testserie, getestet werden. Die Befolgung der Anleitungen vorausgesetzt, sollten die Kontrollen einen Prozentsatz der mittleren Normalwerte ergeben, die innerhalb der auf den Flaschenetiketten angegebenen Bereiche liegen. Da diese Kontrollen genau auf die gleiche Weise wie die Proben mit C1-Inhibitorsubstrat behandelt und getestet werden, dienen sie als Kontrolle für jede C1-Inhibitor-Plus-Serie. Darüber hinaus können externe, vom Anwender angesetzte Kontrollen eingesetzt werden, um die Richtigkeit der Testergebnisse zu gewährleisten.

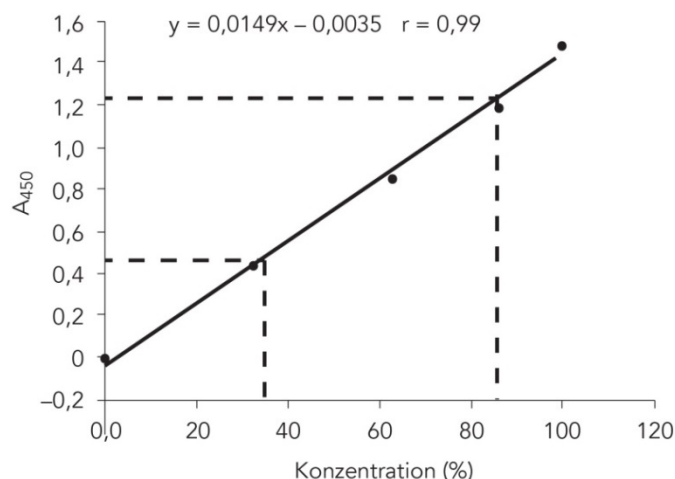
Zudem ist auf der Packungsbeilage festgelegt, dass die Eichgerade, die mit den Standardlösungen A-E des Testkits erstellt wurde, strengen Validierungsanforderungen gerecht werden muss (siehe *AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE*). Die Standardlösungen sollten für jede Testserie als Duplikate getestet werden. Erfüllt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

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Berechnung der Ergebnisse

Die Eichgerade wird mit den Blindwert-korrigierten A_{450} -Werten der verschiedenen Standardlösungen (auf der y-Achse) und den entsprechenden Standardkonzentrationen (auf der x-Achse) erstellt. Die Eichgerade muss den Validierungsanforderungen entsprechen. Diese Berechnung wird von den meisten Rechnern und Taschenrechnern unterstützt. Ein Beispiel einer typischen Eichgerade ist in Abbildung 1 dargestellt.

Abb. 1
Beispiel einer Eichgeraden



Die prozentualen Konzentrationen der Proben werden mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse von der Eichgerade berechnet.

Validierung

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

korrelationskoeffizient (r):	Größer als 0,95
steigung (m):	0,0107 bis 0,0262
y-Schnittpunkt (b):	(-)0,1685 bis 0,0910

Auswertung

Die in einer bestimmten Probe vorliegende Konzentration von funktionellem C1-INH wird als Prozentsatz des Mittelwertes in normalen Proben angegeben. Auf den Proben von 100 normalen Probanden beruhend, die alle von drei verschiedenen Laboranten getestet wurden, wurde für diesen Test ein mittlerer Normalwert für funktionellen C1-INH bestimmt (siehe *LEISTUNGSMERKMALE, GENAUIGKEIT*). Der auf dem mittleren Normalwert beruhende Prozentsatz einer im Verhältnis 1:101 verdünnten Probe wird wie unter *Berechnung der Ergebnisse* beschrieben bestimmt.

Anomale Ergebnisse: C1-INH-Konzentrationen $\leq 40\%$ des mittleren Normalwertes werden als signifikant niedriger als normal betrachtet und sollten als anomal eingestuft werden. Auch Proben, die beim wiederholten Testen ein nicht eindeutiges Ergebnis erhalten (siehe unten), sollten als anomal eingestuft werden.

Nicht eindeutige Ergebnisse: C1-INH-Konzentrationen, die zwischen 41% und 67% des mittleren Normalwertes liegen werden – auch wenn sie unterhalb des als normal erwarteten Werts liegen – nicht als signifikant niedriger als normal betrachtet und daher als nicht eindeutig eingestuft. Diese Proben können erneut getestet werden, oder eine neue Probe kann entnommen und getestet werden. Wird für eine nicht eindeutige Probe wiederholt ein nicht eindeutiges Ergebnis erhalten, wird sie als signifikant niedriger als normal betrachtet und kann als anomal angegeben werden.

Normale Ergebnisse: Konzentrationen $\geq 68\%$ des mittleren Normalwerts werden als normal betrachtet.

GRENZEN DER METHODE

Der MicroVue C1-Inhibitor Enzymimmunoassay wurde zum Testen von Proben eingesetzt, die als Serum oder Plasma in EDTA vorlagen. Andere Antikoagulanzen als EDTA wurden nicht untersucht.

ERWARTETE WERTE

Es wurden über hundert (100) normale Serumproben, von denen neunundvierzig (49) von Kindern und einundfünfzig (51) von erwachsenen Probanden stammten, mit dem MicroVue C1-Inhibitor Enzymimmunoassay getestet. Zwischen den pädiatrischen und adulten Proben wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die durchschnittliche Konzentration von C1-INH-Protein wurde in diesen Proben als 100% des mittleren Normalwertes definiert (Standardabweichung = 15,8%).

Von fünfzehn (15) normalen Erwachsenen wurden paarweise EDTA-Plasma- und Serumproben entnommen und mit diesem Test untersucht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Probenotypen festgestellt.

Darüber hinaus wurden Proben von achtundzwanzig (28) Patienten mit diagnostiziertem C1-Inhibitormangel mit diesem Test analysiert. Diese Proben stammten von mehreren Kliniken in verschiedenen Teilen der USA. Bei allen achtundzwanzig getesteten Patienten wurden im Vergleich zum

mittleren Normalwert signifikant niedrigere Werte an funktionellem C1-INH festgestellt. Diese Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2
Angioödempatienten

Patient Nr.	Klinik	Prozentsatz vom mittleren Normalwert (%)	Auswertung
1P*	A	19	Anomal
1S*	A	37	Anomal
2**	A	0	Anomal
2**	A	6	Anomal
3	A	0	Anomal
4	A	17	Anomal
5	A	6	Anomal
6	A	0	Anomal
7	A	0	Anomal
8†	A	56	Anomal
9†	A	61	Anomal
10	B	8	Anomal
11	C	0	Anomal
12	D	28	Anomal
13	D	14	Anomal
14	D	32	Anomal
15	D	21	Anomal
16†	D	45	Anomal
17	D	3	Anomal
18	D	24	Anomal
19	E	0	Anomal
20	E	0	Anomal
21	E	2	Anomal
22	E	13	Anomal
23	E	17	Anomal
24	E	19	Anomal
25	E	4	Anomal
26	E	3	Anomal
27†	E	44	Anomal
28	E	0	Anomal

*1S steht für Serum und 1P für EDTA-Plasma, die beide gleichzeitig von einem Patienten entnommen wurden

**Die beiden Proben von Patient 2 wurden in einem zeitlichen Abstand von drei Jahren entnommen.

†Diese Patienten gaben bei der Testwiederholung nicht eindeutige Ergebnisse und wurden daher als anomal bewertet

LEISTUNGSMERKMALE

Genauigkeit

Die C1-Inhibitorkonzentrationen der fünfzehn normalen Seren, die mit dem EIA gemessen wurden, wurden mittels Radialimmundiffusion bestimmt. Dabei kam ein lineares Regressionsmodell zum Einsatz. Die C1-INH-Konzentration des Primärstandards wurde mit Hilfe eines linearen Regressionsmodells auf den Werten von Standardlösungen aus dem Kit beruhend bestimmt. Um die Genauigkeit des Modells zu testen, wurden für den Primärstandard mittels Radialimmundiffusion zudem sechs Bestimmungen der C1-INH-Konzentration durchgeführt. Zwischen diesen beiden Verfahren für die Bestimmung der C1-INH-Konzentration konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Der Mittelwert von 100 normalen Serumproben, die mit dem MicroVue C1-Inhibitor Enzymimmunassay untersucht wurden, betrug

182 µg/ml. Dieser Wert stimmt deutlich mit der veröffentlichten normalen Konzentration von 180 µg/ml überein.

Präzision

Drei Kit-Chargen wurden untersucht. Alle Chargen wurden insgesamt dreimal von verschiedenen Laboranten getestet. Die Proben wurden jeweils mit drei Replikaten in neun Testserien analysiert. Die resultierenden Intraassay- und Interassay-Variationen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3
Reproduzierbarkeit Des Tests

Typ	C-1-Inhibitor (%)	Intraassay VK ¹ (%)	Interassay VK ² (%)
Probe 1	105,2	3,3	5,7
Probe 2	78,54	4,0	5,7
Probe 3	21,48	5,4	6,4
Probe 4	16,42	5,1	10,0

¹n = 20 replikate ²n = 10 assays

Spezifität

Der für das Konjugat verwendete antihumane C1-INH von Ziegen wurde mit einem anderen handelsüblichen, FDA-zugelassenen C1-INH-Antikörper verglichen. Eine Unterscheidung in einem Immundiffusionstest war nicht möglich. Zudem wurde das Quidel Antiserum gegenüber C1-INH als monospezifisch bewertet. Diese Bewertung beruht auf Tests dieses Antiserums bei verschiedenen Konzentrationen, die mittels Doppelimmundiffusion, ein- und zweidimensionaler Immunelektrophorese sowie Rocket-Immunelektrophorese im Vergleich zu frisch entnommenem Humanserum mit 10 mmol/l EDTA durchgeführt wurden.

KUNDENDIENST

Um eine Bestellung aufzugeben oder technische Unterstützung zu erhalten, wenden Sie sich bitte an einen Quidel Vertreter unter +1.800.874.1517 (innerhalb der USA), +1.858.552.1100 (außerhalb der USA), montags bis freitags zwischen 8.00 und 17.00 Uhr Eastern Time. Bestellungen können auch per Fax unter der Nummer +170.592.9820 aufgegeben werden.

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

LITERATURVERWEISE

1. Ratnoff, O.D., J. Pensky, D. Ogston y G.B. Naff. The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma permeability factor, and C'1r subcomponent of the first component of complement by serum C'1 esterase inhibitor. *J. Exp. Med.* 129:315, 1969.
2. Travis, J. y G.S. Salvesen. Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 52:655,1983.
3. Donaldson, V.H. y R.R. Evans. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema. Absence of serum inhibitor of C'1-esterase. *Am. J. Med.* 35:37, 1963.
4. Rosen, F.S., C.A. Alper, J. Pensky, M.R. Klemperer y V.H. Donaldson. Genetically determined heterogeneity of the C1 esterase inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. *J. Clin. Invest.* 50:2143, 1971.
5. Gelfand, J.A., G.R. Boss, C.L. Conley, R. Reinhart y M.M. Frank. Acquired C1 esterase inhibitor deficiency and angioedema: a review. *Medicine.* 58:321,1979.
6. Kerr, M.A. y A.A.C. Yeung-Laiwah. C1-Inhibitor deficiency and angioedema. En: *Complement in Health and Disease*, ed. K. Whaley, MTP Press Limited, p. 53,1987.

7. Donaldson, V.H. Serum inhibitor of C'1-esterase in health and disease. *J. Lab. Clin. Med.* 68:369,1966.
8. Levy, L.R. y I.H. Lepow. Assay and properties of serum inhibitor of C1-esterase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101:608, 1959.
9. Ziccardi, R.J. y N.R. Cooper. Development of an immunochemical test to assess C1 inactivator function in human serum and its use for the diagnosis of hereditary angioedema. *Clin. Immunol. Immunopath.* 15:465,1980.
10. Gigli, I., S. Ruddy y K.F. Austen. The stoichiometric measurement of the serum inhibition of the first component of complement by the inhibition of immune hemolysis. *J. Immunol.* 100(6): 1154, 1968.
11. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (sup. no. 2S):001.

REF A037 – MicroVue C1-Inhibitor Plus EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA037003DE00 (02/20)

GLOSSAR

REF

Katalog-Nr.



CE-Konformitätskennzeichnung

EC REP

Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft

LOT

Chargencode



Verwenden bis



Hersteller



Temperaturbegrenzung



Verwendungszweck

Rx ONLY

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



Consult E-Beschriftung
Gebrauchsanweisung beachten



Biogefährdung

IVD

Zur *In-vitro*-Diagnostik



Inhalt ist ausreichend für 96 Bestimmungen

CONT

Inhalt/Enthält

CONTROL

Kontrolle
