

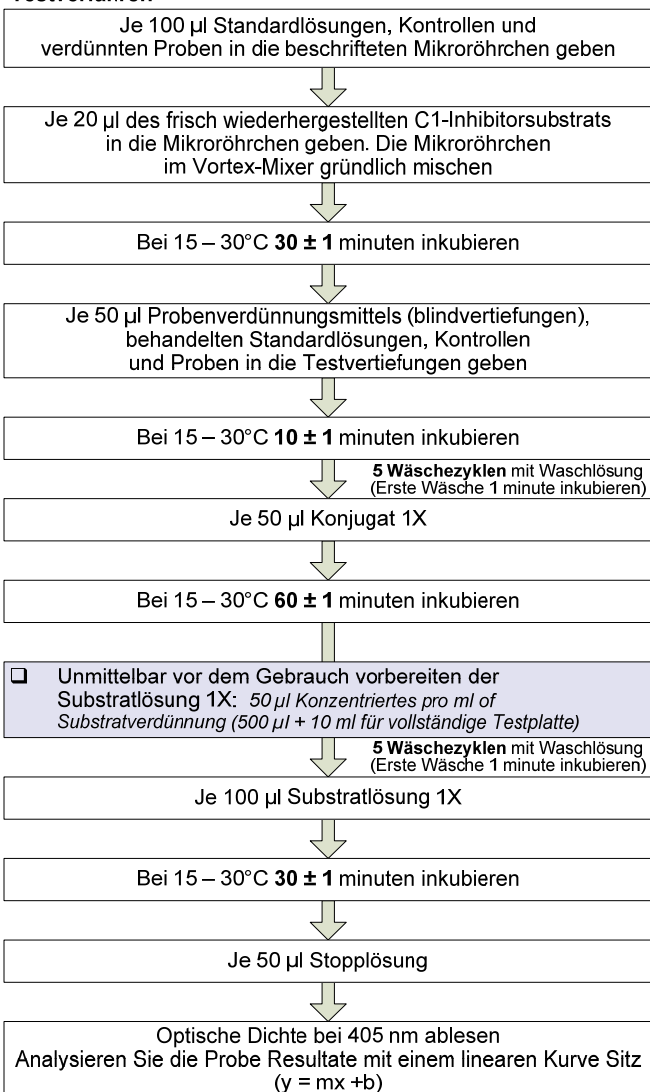
Enzym-Immunoassay zum Bestimmen funktioneller C1-Inhibitorproteine in Humanplasma oder Humanserum

## C1-Inhibitor EIA Zusammenfassung

### Vorbereitung von Reagenzien, Kontrollen und Proben

- Verdünnt Konzentrierte Waschlösung 1:20 mit vollentsalztem Wasser
- Verdünnt Konzentrierte Probenverdünnungsmittel 1:5 mit vollentsalztem Wasser
- Verdünnt Konzentrierte C1-Inhibitor-Konjugat 1:100 mit Konjugatverdünnungsmittel
- Jede Standardlösungen und Kontrollen sollte mit 1,0 ml Hydrierungsreagenz  
(gründlich mischen, und ließ sitzen für 15 Minuten)
- In jedes benötigte Fläschchen des C1-Inhibitorsubstrats 0,5 ml Hydrierungsreagenz geben (Die wiederhergestellten Fläschchen mindestens 15 Minuten) (Ein Fläschchen reicht für ungefähr 25 Proben)
- Verdünnt Proben 1:101 mit Probenverdünnungsmittel 1X (e.g. 10 µL + 1 mL)

### Testverfahren



## VORGESEHENER VERWENDUNGSZWECK

Der MicroVue C1-Inhibitor Enzyme Immunoassay 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 enzym-regulierende Aufgabe hat.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

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)<sup>3,4</sup> bezeichnete kongenitale Form und zum anderen die erworbene Form, die mit einer Vielzahl von Krankheiten, wie beispielsweise malignen Erkrankungen der Lymphozyten, im Zusammenhang steht.<sup>5</sup> Hereditäre Angioödem werden normalerweise von transitorischen und rezidivierenden, anfallartig ablaufenden nicht pruritischen Schwellungen begleitet, die verschiedenen Gewebe des Körpers 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 entstanden ist. 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 für funktionellen C1-INH, die Werte für C1-INH-Antigen sind jedoch auf Grund eines dysfunktionellen Proteins normal oder erhöht.<sup>6</sup>

Die Veränderlichkeit der Symptome über den Verlauf der Krankheit macht es unmöglich, eine Diagnose zu stellen, die ausschließlich auf den klinischen Daten beruht. Hereditäre und 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 können.

Für den Nachweis von funktionellem C1-INH oder C1-INH-Antigen wurden verschiedene Methoden veröffentlicht. Dazu gehören Methoden der Enzyminhibition,<sup>7,8</sup> radialen Immundiffusion,<sup>9</sup> Immunelektrophorese und die Inhibition der Immunhämolyse.<sup>10</sup> Jede dieser Methoden bietet ganz bestimmte Vorteile. Die Einrichtung und Durchführung von Enzyminhibitionstests<sup>7</sup> lässt sich im Routinebetrieb nur mit Schwierigkeiten 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,<sup>9</sup> 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 der 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 C1 $\bar{5}$ ) 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 Inkubationsmischung, in dem sich das C1-Inhibitor-substrat 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 der Inkubation wird ungebundenes Konjugat im Waschschrift entfernt.

Im zweiten 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 das 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 Mikroassay-Vertiefungen gegeben. Das gebundene HRP-Konjugat reagiert mit dem Substrat und bildet eine grüne Färbung. Die Enzymreaktion wird nach der Inkubation chemisch gestoppt und die Farbintensität bei 405 nm spektrophotometrisch gemessen. Die Farbintensität der Reaktionsmischung ist proportional zur Konzentration der funktionellen C1-INH-Proteine, die in den Proben, Standardlösungen und Kontrollen vorliegen.

## REAGENZIEN UND MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Der C1-Inhibitor-Enzym-Immunoassay enthält die folgenden Komponenten:

- A C1-INH-Standardlösungen**  
**B** Artikelnr. A4469–A4473 je 2, 1 ml  
**C** (lyophilisiert) Bei Wiederherstellung enthält jede Standardlösung  
**D** eine bekannte Menge an C1-Inhibitor in Humanplasma,  
**E** phosphatgepufferte Kochsalzlösung und Stabilisatoren
- L Anomale C1-INH-Kontrolle (human)**  
**Artikelnr. A9524 je 2, 1 ml**  
 (lyophilisiert) Bei Wiederherstellung enthält jede Kontrolle Humanplasma mit einer geringen Konzentration an C1-Inhibitor in phosphatgepuffertes Kochsalzlösung und Stabilisatoren
- N Normale C1-INH-Kontrolle (human)**  
**Artikelnr. A9523 je 2, 1 ml**  
 (lyophilisiert) Bei Wiederherstellung enthält jede Kontrolle Humanplasma mit einer normalen Konzentration an C1-Inhibitor in phosphatgepuffertes Kochsalzlösung und Stabilisatoren
- 1 Mikroassay-Platte Artikelnr. 4634 je 12**  
 Teststreifen mit jeweils 8 Vertiefungen, beschichtet mit Avidin in einem wiederverschließbaren Kunststoffbeutel
- 2 Stopplösung Artikelnr. A3673 6 ml**  
 Enthält 250 mmol/l Oxalsäure.
- 3 20fach konzentrierte Waschlösung Artikelnr. A9957 je 2, 50 ml**  
 Enthält im verdünnten Zustand phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 0,05 % Tween-20® und 0,035 % Proclin® 300
- 4 5fach konzentriertes Probenverdünnungsmittel Artikelnr. A9519 25 ml**  
 Enthält im verdünnten Zustand phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Stabilisatoren und 0,035 % ProClin 300
- 5 Substratverdünnung Artikelnr. A3672 25 ml**  
 Enthält 0,1 mol/l Zitratpuffer und 0,05 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 6 Konzentriertes Substrat Artikelnr. A3671 1,5 ml**  
 Enthält 0,7 % 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), Diammoniumsalz
- 7 C1-Inhibitor-konjugat (100fach konzentriert) Artikelnr. A9525 0,25 ml**  
 Enthält in 100fach konzentrierter Form peroxidasekonjugierten, antihumanen C1-Inhibitor (Ziege) in phosphatgepuffertes Kochsalzlösung, Stabilisatoren und 0,01 % Thimerosal
- 8 Hydrierungsreagenz Artikelnr. A3675 25 ml**  
 Enthält 0,035 % ProClin 300
- 9 Konjugatverdünnungsmittel Artikelnr. A9526 10 ml**  
 Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung und 0,01 % Thimerosal
- 10 C1-Inhibitorsubstrat Artikelnr. A9527 je 4, 0,5 ml**  
 Enthält bei Wiederherstellung biotinyliertes (biotinkonjugiertes), aktiviertes C1 $\bar{5}$  in phosphatgepuffertes Kochsalzlösung mit Stabilisatoren

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 Proberöhrchen und Ständer
- Behälter für die Waschpufferverdünnung
- Waschflasche oder anderes für Immunassays geeignetes Waschsystem
- Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanäle) Mehrfachmikropipetten (optional)
- Saubere Pipetten, 1 ml, 5 ml und 10 ml
- Mikropipetten und Pipettenspitzen
- Plattenlesegerät für Extinktionsmessungen über den Bereich von 0,0 bis 2,0
- Vollentsalztes oder destilliertes Wasser

## **WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

1. Zur *In-vitro*-Diagnostik.
2. Beim Arbeiten mit diesem Kit und den Proben allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
3. Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit und örtlich geltender Bestimmungen entsorgen.
4. Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
5. Bei der Handhabung der Kitkomponenten geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
6. Die Reagenzien des Assays wie angegeben lagern.
7. Beim Hinzufügen oder Ansaugen von Flüssigkeiten zu bzw. von den Mikroassay-Vertiefungen nicht den Boden der Vertiefungen ankratzen oder berühren.
8. Durch die Verwendung von Inkubationszeiten und -temperaturen, die von den unter „Testverfahren“ gegebenen Werten abweichen, können falsche Ergebnisse erhalten werden.
9. Die Mikroassay-Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
10. Die Mikroassay-Vertiefungen jeweils nur für eine Bestimmung verwenden.
11. Für ein zügiges und effizientes Dosieren von Flüssigkeiten wird der Gebrauch von Mehrkanal- oder Mehrfachpipetten empfohlen.
12. Zum Gewährleisten genauer Messungen bei der Zugabe der Proben und Standardlösungen genau arbeiten. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen und nur kalibrierte Geräte verwenden.
13. Für den Erhalt genauer Ergebnisse müssen die Proben fachgerecht entnommen und aufbewahrt werden.
14. Eine mikrobielle Kontamination bzw. Kreuzkontamination von Proben, Reagenzien oder Materialien vermeiden. Eine Kontaminationen kann zu falschen Ergebnissen führen.

15. Thimerosal wird als Konservierungsstoff verwendet. Der unbeabsichtigte Kontakt mit Pufferlösungen oder Reagenzien, die Thimerosal enthalten, bzw. deren Einnahme kann zu gesteigerten Überempfindlichkeitsreaktionen einschließlich Reizungen der Haut, der Augen oder des Mundes führen. Beim Auftreten der ersten Symptome einen Arzt aufsuchen. Die Wirkung einer Thimerosalexposition ist potenziell mutagen. Den Kontakt mit starken Säuren und Basen vermeiden.
16. ProClin 300 wird als Konservierungsstoff verwendet. Der unbeabsichtigte Kontakt mit Pufferlösungen oder Reagenzien, die ProClin enthalten, bzw. deren Einnahme kann zu Reizungen der Haut, der Augen oder des Mundes führen. Die Anforderungen guter Laborpraxis beachten, um die Exposition möglichst gering zu halten. Beim Auftreten der ersten Symptome einen Arzt aufsuchen.
17. Das konzentrierte Substrat ist lichtempfindlich. Es darf daher nicht über längere Zeit hellem Licht oder direkter Lichteinstrahlung ausgesetzt werden. Die Reagenzien bei Nichtgebrauch im Dunkeln aufbewahren.
18. Um beim Waschen die Bildung von Aerosolen zu vermeiden, eine Vorrichtung verwenden, mit der die Waschflüssigkeit in eine Flasche mit haushaltsüblichem Bleichmittel gesaugt wird.
19. Hitzeinaktivierte, hyperlipämische oder kontaminierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.

## **LAGERUNG**

Ungeöffnetes Kit bei 2–8 °C aufbewahren. Nach dem Öffnen des Kits können die 20fach konzentrierte Waschlösung und das Hydrierungsreagenz bei 2–30 °C aufbewahrt werden.

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

## **ANZEICHEN FÜR INSTABILITÄTEN ODER ZERSETZUNGSVORGÄNGE DER REAGENZIEN**

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

## ENTNAHME UND LAGERUNG DER PROBEN

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

Für diesen Test werden mindestens 10 µl Serum oder EDTA-Plasma benötigt. Alle Proben sollten unter keimfreien Bedingungen entnommen und gemäß Standardverfahren für die klinische Laborpraxis getestet werden. Beste Ergebnisse werden mit frisch entnommenen, nicht hämolysierten Proben erzielt. EDTA-Plasmaproben können bei Raumtemperatur (15–30 °C) für 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 (–20 °C oder tiefer) werden. 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 VON REAGENZIEN

Die erforderlichen Mengen an Reagenzien und Materialien sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt. Nach der Entnahme der erforderlichen Reagenzien und Materialien die nicht mehr benötigten Komponenten wieder auf die erforderliche Lagertemperatur bringen (siehe *LAGERUNG*). Alle Reagenzien vor dem Test auf Raumtemperatur (15–30 °C) bringen. Das Kit nach dem Test wieder im Kühlschrank (2–8 °C) lagern.

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

- 3. Ansetzen bzw. 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 wiederhergestellten Fläschchen mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur (15–30 °C) rehydrieren lassen und dann gründlich mischen. Darauf achten, dass sich beim Mischen kein Schaum und keine Blasen bilden. Die wiederhergestellten Standardlösungen und Kontrollen sind — die Lagerung bei 2–8 °C vorausgesetzt — für 30 Tage stabil. **HINWEIS: Vor der Durchführung des Tests ist keine weitere Verdünnung der wiederhergestellten 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. **Wiederhergestelltes C1-Inhibitorsubstrat ist bei 2–8 °C bis zu vierundzwanzig (24) und bei Raumtemperatur (15–30 °C) bis zu zwei (2) Stunden stabil.**
- 4. Vorbereiten des 1fach konzentrierten Probenverdünnungsmittels.** Weitere Informationen zum Bestimmen der erforderlichen Menge an 1fach konzentriertem Probenverdünnungsmittel in Tabelle 1. Die erforderliche Menge an 1fach konzentriertem Probenverdünnungsmittel vorbereiten, indem die angegebenen Volumina vollentsalzten oder destillierten Wassers und 5fach konzentrierten Probenverdünnungsmittels miteinander vermischt werden.

**TABELLE 1**  
**1FACH KONZENTRIERTES**  
**PROBENVERDÜNNUNGSMITTEL**  
**(erforderliche Mengen und Vorbereitung)**

Anz. der Teststreifen	Erforderliche 1fach konzentrierte Probenverdünnung (ml)	Volumina der erforderlichen Reagenzien	
		Wasser (ml)	5fach konzentrierte Probenverdünnung (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 1 bis N beschriften und die Probandaten jedes Teströhrchens schriftlich festhalten. Von jeder Probe mit dem 1fach konzentrierten Probenverdünnungsmittel 1 ml einer 1:101-Verdünnung (10 µl Probe auf 1 ml 1fach konzentriertes Probenverdünnungsmittel) ansetzen. Gründlich mischen, dabei jedoch die Bildung von Schaum und Blasen vermeiden. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden.
6. **Vorbereiten des 1fach konzentrierten Konjugats.** Pro drei zu testende Teststreifen 25 µl 100fach konzentriertes Konjugat auf 2,5 ml Konjugatverdünnungsmittel geben. 1fach konzentriertes Konjugat ist bei 2–8 °C für bis zu 12 Stunden stabil.
7. **Vorbereiten der Substratlösung. Unmittelbar vor dem Gebrauch vorbereiten.** Die Substratlösung erst in Schritt 8 des Testverfahrens vorbereiten. Das erforderliche Volumen der Substratlösung anhand von Tabelle 2 bestimmen. **Die Substratlösung vorbereiten, indem für jeden ml der Substratverdünnung 50 µl konzentriertes Substrat hinzugegeben wird.** Gründlich mischen. Wenn sich die Substratlösung vor der Verwendung nach dunkelgrün verfärbt, muss sie entsorgt und durch eine frische Lösung in einem sauberen Behälter ersetzt werden.

**TABELLE 2**  
**1FACH KONZENTRIERTE SUBSTRATLÖSUNG**  
**(erforderliche Mengen und Vorbereitung)**

Anz. der Teststreifen	Erforderliche Substratlösung (ml)	Volumina der erforderlichen Reagenzien	
		Substratverdünnung (ml)	Konzentr. Substrat (µl)
2	2	2	100
3	3	3	150
4	4	4	200
5	5	5	250
6	5	5	250
7	6	6	300
8	7	7	350
9	8	8	400
10	9	9	450
11	9	9	450
12	10	10	500

## TESTVERFAHREN

### Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

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

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 festhalten.
2. Behandeln von Standardlösungen, Kontrollen und Proben mit dem C1-Inhibitorsubstrat:
  - a. Je 100 µl der wiederhergestellten 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 wiederhergestellten C1-Inhibitor-substrats in die Mikroröhrchen mit den Standardlösungen, Kontrollen und verdünnten Proben geben. Die Mikroröhrchen im Vortex-Mixer gründlich mischen.
  - e. Bei Raumtemperatur (15–30 °C) für 30 ± 1 Minuten inkubieren.
3. Je nach den Anforderungen des EIA-Plattenlesegeräts eine oder mehrere Vertiefungen für die Blindwertbestimmung (Blindvertiefungen) auswählen und 50 µl des 1fach konzentrierten Probenverdünnungsmittels 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. Bei Raumtemperatur (15–30 °C) für 10 ± 1 Minuten 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 von Schritt 5 (und Schritt 8 — siehe unten) die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
  - b. Mit einer Waschflasche oder einer geeigneten Fülleinrichtung (ungefähr 300 µl) Waschlösung in jede Vertiefung geben.
  - c. Die Vertiefungen bei Raumtemperatur (15–30 °C) für 1 Minute inkubieren.
  - d. Den Inhalt aus den verschiedenen Vertiefungen entfernen.
  - e. Alle Vertiefungen mit (ungefähr 300 µl) Waschlösung füllen.
  - f. Den Inhalt aus den verschiedenen Vertiefungen entfernen.
  - g. Die Schritte e-f dreimal wiederholen.**
  - h. Die Platte nach dem fünften Waschschrift umdrehen und zweimal vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
- Die Vertiefungen nicht austrocknen lassen.**
7. Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette jeweils 50 µl des C1-Inhibitor-konjugats (siehe 6) in die gewaschenen Testvertiefungen und die Blindvertiefung(en) geben.

8. Die Mikroassay-Teststreifen bei Raumtemperatur (15-30 °C) für  $60 \pm 1$  Minuten inkubieren. **Während dieser Inkubation die Substratlösung vorbereiten (siehe Schritt 7 unter VORBEREITUNG VON REAGENZIEN).**
9. Die Mikroassay-Vertiefungen nach der 60 Minuten dauernden Inkubation (Schritt 8) wie unter TESTVERFAHREN beschrieben waschen.
10. Unmittelbar nach dem Waschschrift je 100 µl der frisch angesetzten Substratlösung in die Vertiefungen und Blindvertiefung(en) geben.
11. Die Mikroassay-Teststreifen bei Raumtemperatur (15-30 °C) für 30 Minuten inkubieren.
12. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion je 50 µl Stopplösung in die Vertiefungen geben. Die Zugabe der Stopplösung in die Vertiefungen sollte in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgen wie bei der Zugabe der Substratlösung. Die Platte 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 405 nm bestimmen ( $E_{405}$ -Wert) und je nach verwendetem Spektrophotometer eine Blindwertkorrektur vornehmen.
14. Die verbleibenden verdünnten Proben, Kontrollen, Substrat, Konjugat, C1-Inhibitorsubstrat und die benutzten Mikroassay-Teststreifen entsorgen (siehe WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN). Den Halter und die Feststelleinrichtung für Teststreifen für zukünftige Bestimmungen 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 Probensatz, 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-Inhibitorserie. Darüber hinaus können externe, vom Anwender angesetzte Kontrollen eingesetzt werden, um die Richtigkeit der Testergebnisse zu gewährleisten.

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

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

### Validierung

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

Korrelationskoeffizient (r)	> 0,95
Steigung (m)	0,798 bis 1,944
y-Schnittpunkt (b)	(-)0,115 bis (+)0,047

### 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 GENAUIGKEIT unter LEISTUNGSMERKMALE). Der auf dem mittleren Normalwert beruhende Prozentsatz einer 1:101-verdünnten Probe wird wie unter BERECHNUNG DER ERGEBNISSE beschrieben bestimmt.

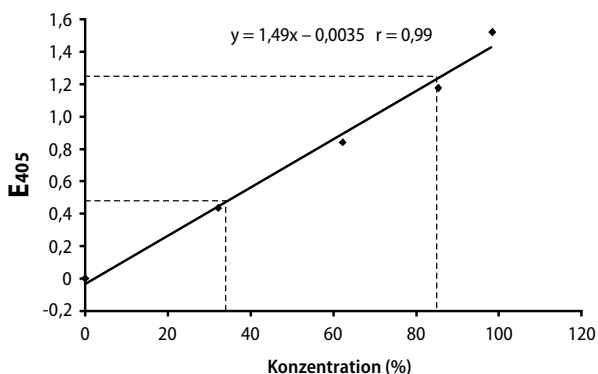
**Anomale Ergebnisse:** C1-INH-Konzentrationen  $\leq 40$  % des mittleren Normalwertes werden als signifikant niedriger als normal betrachtet und sollten als anomal eingestuft werden. Auch Proben, die beim wiederholten Testen ein nicht eindeutiges Ergebnis erhalten (siehe unten), sollten als anomal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

## Beispiel einer Eichgeraden

ABB. 1



## GRENZEN DER METHODE

Der MicroVue C1-Inhibitor Enzyme Immunoassay 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 Enzyme Immunoassay getestet. Zwischen den pädiatrischen und adulten Proben wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Die durchschnittliche Konzentration von C1-INH-Proteinen 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 Proben typen gefunden.

Darüber hinaus wurden Proben von achtundzwanzig (28) Patienten mit diagnostiziertem C1-Inhibitor mangel 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 gefunden. Diese Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

TABELLE 3  
ANGIOÖDEMPATIEN

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

\* 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 anormal bewertet.

## LEISTUNGSMERKMALE

### Genauigkeit

Die C1-Inhibitor konzentrationen 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 Kit-Standardlösungen 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 gefunden werden. Der Mittelwert von 100 normalen Serumproben, die mit dem MicroVue C1-Inhibitor Enzyme Immunoassay 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 4 zusammengefasst.

**TABELLE 4**  
**REPRODUZIERBARKEIT DES TESTS**

Typ	Mittel (E <sub>405</sub> )	Intraassay (%VK)	Interassay (%VK)
Probe 1	1,26	3	11
Probe 2	0,68	5	15
Probe 3	(-) 0,02	26	47
Standard A	(-) 0,02	22	33
Standard B	0,39	5	19
Standard C	1,35	6	13

## 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.

## 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](http://www.quidel.com).

## LITERATURVERWEISE

1. Ratnoff, O.D., J. Pensky, D. Ogston, and G.B. Naff. The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma permeability factor, and C<sub>1</sub>r subcomponent of the first component of complement by serum C<sub>1</sub> esterase inhibitor. *J. Exp. Med.* 129:315, 1969.
2. Travis, J. and G.S. Salvesen. Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 52:655, 1983.
3. Donaldson, V.H. and R.R. Evans. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema. Absence of serum inhibitor of C<sub>1</sub>-esterase. *Am. J. Med.* 35:37, 1963.
4. Rosen, F.S., C.A. Alper, J. Pensky, M.R. Klemperer, and 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, and M.M. Frank. Acquired C1 esterase inhibitor deficiency and angioedema: a review. *Medicine.* 58:321, 1979.
6. Kerr, M.A. and A.A.C. Yeung-Laiwah. C1-Inhibitor deficiency and angioedema. In: *Complement in Health and Disease*, ed. K. Whaley, MTP Press Limited, p. 53, 1987.
7. Donaldson, V.H. Serum inhibitor of C<sub>1</sub>-esterase in health and disease. *J. Lab. Clin. Med.* 68:369, 1966.
8. Levy, L.R. and I.H. Lepow. Assay and properties of serum inhibitor of C1-esterase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101:608, 1959.
9. Ziccardi, R.J. and 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, and 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 (suppl no. 2S):001.

## GLOSSAR



Gebrauchsanweisung beachten auf CDROM



Vorgesehener Verwendungszweck

REF A003 – MICROVUE<sup>®</sup> C1-Inhibitor EIA Kit  
Complement



Quidel Corporation | 10165 McKellar Court  
San Diego, CA 92121 USA | [www.quidel.com](http://www.quidel.com)



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover, Germany