

QUICK GUIDE TO ASSAY STEPS

Read entire product insert before beginning the assay.

Preliminary Preparations

1. Prepare wash solution.
2. Dilute test specimens.

Assay Procedure

3. Rehydrate microassay wells.
4. Add 100 μ L of Complement Specimen Diluent to blank well(s).
5. Add 100 μ L of each standard and test specimen to appropriate wells.
6. Incubate 60 minutes at room temperature (15–30°C).
7. Wash the microassay wells five times.
8. Add 50 μ L of CIC-Raji Conjugate to each test well.
9. Incubate 30 minutes at room temperature. (Prepare Substrate Solution during this incubation).
10. Wash the microassay wells five times.
11. Add 100 μ L Substrate Solution to each test well.
12. Incubate 30 minutes at room temperature.
13. Add 50 μ L Stop Solution to each test well.
14. Measure absorbance at 405 nm within 60 minutes.

Calculations

15. Plot absorbance vs. concentration of the standards on the provided graph paper or enter into calculator for linear regression analysis.
16. Read test specimen concentrations directly from the graph or perform required functions on calculator to obtain specimen concentrations.

INTENDED USE

The Quidel CIC-Raji Cell Replacement Enzyme Immunoassay measures immune complexes containing C3 activation fragments in human serum and plasma.

SUMMARY AND EXPLANATION

The importance of circulating immune complexes (CIC) and their relationship to various diseases has been the subject of investigation for a number of years. Formation of immune complexes is a protective, on-going, and usually benign process of a normally functioning immune system. CIC are removed from the circulation in the normal host by a number of complex biochemical, enzymatic, and cellular processes. The effective clearance of many CIC requires the activation of complement. Complement activation will result in C3 fragment deposition within the immune complex followed by enhanced elimination by phagocytic cells of the reticuloendothelial system. Under certain disease conditions, which are not fully understood, immune complexes may not be efficiently eliminated from the body. In these diseases, the immune complexes may accumulate and initiate complement-dependent injury in various organs and tissues. This activation of complement may begin a series of potentially destructive events in the host including anaphylatoxin production, cell lysis, leukocyte stimulation, and activation of macrophages and other cells.¹ When immune complexes become fixed to vessel walls or cell membranes, destruction of normal tissue can occur, as in some cases of glomerulonephritis.

Certain properties of CIC influence their potential pathogenicity. Of particular importance are: (1) nature, size and concentration of the antigen; (2) nature, size and concentration of the antibody; (3) rate of formation and clearance of the immune complexes.^{1,2}

Circulating immune complexes have been measured in a variety of conditions: for example, infections, autoimmune disorders, trauma, and neoplastic proliferative diseases. Current studies suggest that CIC determinations can be important in the evaluation of certain diseases and, sometimes, in monitoring efficiency of therapy. This is especially true in systemic lupus erythematosus (SLE) and some forms of rheumatoid arthritis (RA).^{3,4} The first disease state linked to the formation of immune complexes was serum sickness, described in the early 1900's by von Pirquet. Since that time elevated levels of CIC have been described in autoimmune diseases (SLE, SLE-related syndrome, RA), glomerulonephritis, neoplastic disease (Hodgkin's, leukemia), bacterial infections (subacute bacterial endocarditis, leprosy), parasitic infections (malaria, schistosomiasis) and viral infections (hepatitis, mononucleosis).

Over 40 assay techniques to detect or quantitate CIC have been described. Such tests as the Raji Cell assay, C1q deviation test, conglutinin test, fluid phase C1q binding procedures, rheumatoid factor assay, PEG precipitin test, and solid phase C1q assays have been described.¹⁵ Since the size and physicochemical properties of CIC vary markedly, none of these assays has been accepted as a standard. A collaborative study sponsored by the World Health Organization in 1978 determined that no single method was appropriate in all suspected disease states and recommended that at least two different assay techniques be performed to detect and measure CIC adequately.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

Fragments of the third complement component, C3, often become covalently bound to complement-activating immune complexes. Raji cells, which were derived from a continuous B lymphocyte culture cell line, bear CR2 complement receptors which bind the iC3b, C3d,g and C3d fragments of activated C3.^{6,7,8} The Raji Cell CIC assay is based upon the ability of the Raji cell CR2 receptors to bind immune complexes containing these C3 fragments.⁶ The Quidel CIC-Raji Cell Replacement Enzyme Immunoassay also measures CIC-containing C3 fragments by using an immobilized monoclonal antibody that specifically binds the iC3b, C3d,g and C3d activation fragments of C3 in a manner which is analogous to the Raji cell CR2 binding reaction.

In the first stage, standards and serum or plasma specimens diluted in Complement Specimen Diluent are added to microassay wells coated with monoclonal antibodies to human C3 fragments and incubated. During this incubation, immune complexes containing C3 activation fragments are captured by the solid phase antibody. After incubation, a wash cycle removes unbound serum or plasma proteins.

In the second stage, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse anti-human IgG is added to each test well and incubated. During this incubation, the conjugate binds to the immune complexes which are now bound to the microassay wells. A wash cycle removes unbound conjugate.

In the third stage, an enzyme substrate is added to each test well. The bound HRP-conjugated antibody reacts with the chromogenic substrate forming a green color. After incubation, a reagent is added to stop color development.

The standard and test specimen absorbances (A_{405} values) are measured spectrophotometrically. The intensity of the green color that forms is proportional to the amount of CIC binding to the solid phase. A standard curve is generated by plotting the A_{405} values obtained with each standard versus its indicated concentration. The concentration of immune complexes present in the test specimen is determined by reference to the standard curve. Results are expressed as micrograms of serum-treated heat-aggregated human gamma globulin (HAGG) equivalents per mL ($\mu\text{g Eq/mL}$). To confirm a positive CIC result, the specimen may be assayed after dilution in CIC-Raji Confirmation Diluent which contains blocking antibodies with specificities similar to the antibody immobilized on the microassay well.

REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED

The CIC-Raji Cell Replacement EIA kit contains the following:

A	CIC-Raji Standards	Parts A9513 – A9515	1 each, 2 mL
B	Each contains a known quantity of serum-treated heat-aggregated human gamma globulin (HAGG) in		
C	PBS, 2.5% stabilizers, 0.01% thimerosal.		
1	Microassay Plate	Part A9512	12 each
	96-well with retainer and holder consisting of eight-well strips coated with mouse anti-human C3 fragments in a resealable foil pouch.		
2	Stop Solution	Part A3673	6 mL
	Contains 250 mM oxalic acid.		
3	20X Wash Solution Concentrate	Part A3674	2 each, 50 mL
	When diluted, each contains phosphate buffered saline (PBS), 0.05% Tween-20™, and 0.01% thimerosal.		
4	Complement Specimen Diluent	Part A3670	50 mL
	Contains PBS, 2.5% stabilizers, 0.035% ProClin® 300.		
5	Substrate Diluent	Part A3672	25 mL
	Contains 0.1M citrate buffer and 0.05% H ₂ O ₂ .		
6	Substrate Concentrate	Part A3671	1.5 mL
	Contains 0.7% 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), diammonium salt.		

2

- | | | | |
|----------|---|-------------------|----------------------|
| 7 | CIC-Raji Conjugate | Part A9516 | 2 each, 3 mL |
| | Contains peroxidase-conjugated (mouse) anti-human IgG suspended in an HRP stabilizing buffer with preservative. | | |
| 8 | CIC-Raji Confirmation Diluent | Part A9517 | 2 each, 12 mL |
| | Contains PBS, 2.5% Stabilizers, anti-human C3 fragment antibody, 0.035% ProClin 300. | | |

Tween-20™ is a trademark of Atlas Chemical Industries, Inc.
ProClin® is a registered trademark of Rohm and Haas Company.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Timer (60 minute range)
- Calculator or other computational method to validate the assay
- Clean, unused microassay plates and/or test tubes and racks
- Container for wash buffer dilution
- Wash bottle or other immunoassay washing system
- Adjustable multichannel pipette (8 or 12 channels) or repeating micropipettes (optional)
- Clean pipettes, 1 mL, 5 mL, and 10 mL
- Micropipettes and pipette tips
- Plate reader capable of optical density A_{405} readings between 0.0 and 2.0
- Deionized or distilled water

WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. For *In Vitro* diagnostic use.
2. Follow Universal Precautions when handling contents of this kit and any patient samples.
3. Dispose of containers and unused contents in accordance with Federal, State and Local regulations.
4. Use the supplied reagents as an integral unit prior to the expiration date indicated on the package label.
5. Store assay reagents as indicated.
6. When adding or aspirating liquids from the microassay wells, do not scrape or touch the bottom of the wells.
7. Using incubation times and temperatures other than those indicated in the Procedure section may give erroneous results.
8. Do not allow microassay wells to dry once the assay has begun.
9. Do not use a microassay well for more than one test.
10. Use of multichannel pipettes or repeat pipettors is recommended to ensure timely delivery of reagents.
11. For accurate measurement of samples, add samples and standards precisely. Pipet carefully using only calibrated equipment.
12. This assay may be performed with any validated washing method.
13. Proper collection and storage of test specimens are essential for accurate results.
14. Avoid microbial or cross-contamination of specimens, reagents, or materials. Incorrect results may be obtained if contaminated.
15. Thimerosal is used as a preservative. Incidental contact with or ingestion of buffers or reagents containing thimerosal can lead to increased hypersensitivity reactions including irritation to the skin, eyes, or mouth. Seek medical attention if symptoms are experienced. Exposure to thimerosal may have potential mutagenic effects. Avoid contact with strong acids and bases.
16. ProClin® 300 is used as a preservative. Incidental contact with or ingestion of buffers or reagents containing ProClin can cause irritation to the skin, eyes or mouth. Use good laboratory practices to reduce exposure. Seek medical attention if symptoms are experienced.
17. The Substrate Concentrate is light sensitive. Avoid prolonged exposure to bright or direct light. Store reagents in the dark when not in use.
18. To avoid aerosol formation during washing, use an apparatus to aspirate the wash fluid into a bottle containing household bleach.
19. Heat-inactivated, hyperlipemic or contaminated specimens may give erroneous results.

3

STORAGE

Store unopened kit at 2–8°C. After the kit is opened, the 20X Wash Solution Concentrate may be stored at 2–30°C.

After selecting the reagents or materials to be used in the assay, return the unused reagents immediately to their appropriate storage temperatures. Bring reagents and materials to room temperature (15–30°C) before use.

INDICATIONS OF INSTABILITY OR DETERIORATION OF REAGENTS

The Substrate Concentrate may range in color from colorless to pale or dark green. This condition will not influence performance. However, the freshly prepared Substrate Solution should be colorless to pale green. A dark green color indicates that the prepared Substrate Solution has deteriorated, must be discarded, and new Substrate Solution prepared in clean glassware.

Cloudiness or discoloration of the diluted Wash Solution indicates a deterioration of this reagent. If this occurs, the solution should be discarded.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Handle and dispose of all specimens using Universal Precautions.

Serum or plasma specimens should be collected aseptically and prepared using standard techniques for clinical laboratory testing.¹⁰ Do not heat-inactivate the specimens. Any particulate matter should be cleared from the specimens by low speed centrifugation before testing.

The specimens may be stored on ice, approximately 0°C for up to 6 hours. If specimens are stored for longer periods, they should be frozen at -70°C or below (storage at -20°C may yield erroneous results).

REAGENT PREPARATION

Refer to Table 1 for the amounts of Substrate Solution and micro-assay strips required per number of tests. After removing the needed reagents and materials, return the unused items to their appropriate storage temperatures (see *STORAGE*). Bring all reagents and materials for the assay to room temperature (15–30°C) before use.

- Wash Solution.** Mix the 20X Wash Solution Concentrate by inverting the bottle several times. If the 20X Wash Solution Concentrate has been stored at 2–8°C, crystals may have formed. To dissolve the crystals, warm the bottle in a 37–50°C water bath until all crystals have dissolved and follow by mixing thoroughly. Prepare the Wash Solution by diluting the entire contents of one of the bottles of 20X Wash Solution Concentrate up to one liter with distilled or deionized water. Mix thoroughly. The Wash Solution is stable for 30 days when stored in a clean container at 2–8°C. If discoloration or cloudiness occurs, discard the reagent.
- Selecting the Microassay Strips.** Determine the number of microassay strips required for the assay by referring to Table 1. Remove the strip retainer from the assembled plate. Remove the unneeded strips and place them in the storage bag, reseal the bag and return it to storage at 2–8°C. Secure the strips to be used in the assay.
- Specimen Dilution**

Caution: Treat all specimens as if potentially infectious. Do not use heat-inactivated or contaminated specimens.

Determine the number (N) of specimens to be tested. Label test tubes #1 through #N and record on the provided data sheet which specimen corresponds to each tube.

Prepare a 1:50 dilution of each specimen using the Complement Specimen Diluent (e.g., 10 µL test specimen mixed with 490 µL Complement Specimen Diluent). Mix thoroughly, but avoid formation of foam and bubbles. Do not store or reuse diluted specimens.

- Adding Diluted Specimens to the Microtiter Wells.** Either of two methods can be used to add diluted specimens, standards, controls, and buffer, to the wells (see Step 5 of *ASSAY PROCEDURE*). For small assay runs where only a few specimens are being tested, the diluted specimens and other reagents can be added directly to their assigned wells with a micropipette (100 µL/well). For small or large runs, but especially larger runs, we recommend the use of a multichannel pipettor for adding specimens as follows. **(A multi-channel pipettor may be used to conveniently add the Conjugate, Substrate and Stop Solution, as well.)**

In order to load the standards, controls and diluted specimens into the microassay wells as rapidly as possible, a “replica plating” procedure can be employed. Instead of adding 100 µL of each standard, control or diluted specimen to the antibody-coated wells individually, 120–130 µL of each solution can be added to individual wells in a blank plate (not provided) corresponding to the final EIA pattern desired. After all the solutions to be tested have been added to the microassay wells in the blank plate, rapidly transfer 100 µL from each blank well to the antibody-coated wells using a multichannel micropipettor. To avoid the possibility of cross-contamination, pipette tips must be changed each time there is a change in the composition of the samples to be transferred.

- CIC-Raji Confirmation Dilution (optional).** If confirmation of positive results is desired, determine the number (N) of specimens to be confirmed. Label test tubes #1c through #Nc and record. Prepare a 1:50 dilution using the CIC-Raji Confirmation Diluent. A specimen diluted in CIC-Raji Confirmation Diluent must be run **concurrently** with the same dilution of specimen in the Complement Specimen Diluent.
- Preparation of Substrate Solution.** *Prepare just prior to use.* Determine the required volume of Substrate Solution from Table 1, below. Prepare the Substrate Solution by adding 50 µL of Substrate Concentrate to each mL of Substrate Diluent. Mix thoroughly.
- CIC Controls.** The CIC-RCR Positive and Negative Controls are available separately from Quidel (CIC-RCR Controls catalog #A014). They should be prepared in accordance with the directions in their package insert. See also *QUALITY CONTROL* section in this insert.

**TABLE 1
ASSAY REQUIREMENTS**

Wells ¹	8-Well Strips	Substrate Solution Required (mL)	Substrate Diluent (mL)	Substrate Concentrate (µL)
16	2	1.6	2.0	100
24	3	2.4	3.0	150
32	4	3.2	4.0	200
40	5	4.0	5.0	250
48	6	4.8	5.0	250
56	7	5.6	6.0	300
64	8	6.4	7.0	350
72	9	7.2	8.0	400
80	10	8.0	9.0	450
88	11	8.8	9.0	450
96	12	9.6	10.0	500

¹Determine the number of specimens to be tested and add eleven (11) wells for the three Standards, the Low and High Controls to be tested (in duplicate) and one blank well. It is recommended that duplicate standards and controls be tested in separate microassay strips when possible.

ASSAY PROCEDURE

Read entire product insert before beginning the assay.

See *REAGENT PREPARATION* and *WARNINGS AND PRECAUTIONS* before proceeding.

- Record the microassay well positions corresponding to the blank well(s), all test samples, standards, and controls as well as the indicated lot numbers from the vial labels. Label one corner of the Microassay Plate for orientation.
- Prepare the microassay strips as follows:
 - Rehydrate microassay wells by adding approximately 300 µL of Wash Solution to each well using a wash bottle or other filling device.
 - Incubate at room temperature (15–30°C) for 1–2 minutes.
 - Aspirate the contents from each well.
 - Invert the plate and tap firmly on absorbent paper twice to remove any remaining liquid. Do not allow the wells to dry.

3. Add 100 µL of Complement Specimen Diluent to the well(s) that will be used to blank the plate reader.
4. Add 100 µL of each CIC-Raji Standard (A, B, and C) to duplicate wells.
5. Add 100 µL of each diluted specimen to its assigned microassay well. See *REAGENT PREPARATION*, Step 4.
6. Incubate at room temperature (15–30°C) for 60 ± 1 minutes.
7. Wash the microassay wells as follows:
 - a. After the incubation of step 6 (and in step 9 below), remove the fluid from each well.
 - b. Add approximately 300 µL Wash Solution to each well using a wash bottle or other filling device.
 - c. Incubate the wells for 1 minute at room temperature (15–30°C).
 - d. Remove the fluid from each well.
 - e. Add approximately 300 µL Wash Solution to each well.
 - f. Remove the fluid from each well.
 - g. Repeat steps e-f three additional times.
 - h. After this fifth wash cycle, invert the plate and tap firmly on absorbent paper twice to remove any remaining fluid.
8. Using a multi-channel or repeating pipette, dispense 50 µL of the CIC-Raji Conjugate into each washed test well, including the blank well(s).
9. Incubate the microassay strips at room temperature (15–30°C) for 30 ± 1 minutes. **Prepare the Substrate Solution during this incubation (see REAGENT PREPARATION step 6).**
10. Wash the microassay wells after the 30-minute incubation of Step 9, as described above, step 7.
11. Immediately following the wash procedure using a multichannel or repeating pipette, dispense 100 µL of the freshly prepared Substrate Solution into each well, including the blank(s).
12. Incubate the microassay strips at room temperature (15–30°C) for 30 ± 1 minutes.
13. Using a multi-channel or repeating pipette, add 50 µL of the Stop Solution to each well to stop the enzymatic reaction. The Stop Solution should be added to the wells in the same order and at the same rate as was the Substrate Solution. Gently tap the plate to disperse the color development evenly.
14. Determine the absorbance reading at 405 nm (A₄₀₅ value) for each test well within one hour after the addition of the Stop Solution (step 13), making a blank correction in accordance with the spectrophotometric system in use.
15. Keep the strip holder and strip retainer for future use.
16. Dispose of the remaining diluted specimens, substrate, and the used microassay strips (see *WARNINGS AND PRECAUTIONS*, item 3). Keep the strip holder and strip retainer for future use.

RECOMMENDED CONFIRMATION METHOD

If independent confirmation of a positive result is required, or if a positive result is inconsistent with the clinical interpretation, the positive specimen may be reassayed using a confirmation test. A negative result cannot be confirmed. The confirmation method utilizes a specimen diluent (the CIC-Raji Confirmation Diluent) which contains anti-human C3 fragment antibodies. To confirm a positive result, an aliquot of the specimen must be diluted in the CIC-Raji Confirmation Diluent and a second aliquot diluted similarly in the Complement Specimen Diluent. Both samples are then assayed according to the usual Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA procedure. See *REAGENT PREPARATION*, and *INTERPRETATION OF RESULTS* sections for details.

QUALITY CONTROL

In order to comply with Good Laboratory Practice, it is recommended that positive and negative controls be included with each day's activity. Controls for the Quidel CIC-Raji Cell Replacement Assay are available from Quidel for this purpose (CIC-RCR Controls, catalog #A014), and should be used in accordance with their package insert. If the positive and/or negative control fail to perform as specified, please contact Quidel Technical Assistance as soon as possible.

In addition to controls, the Quidel CIC-Raji Cell Replacement Assay also provides a *RECOMMENDED CONFIRMATION METHOD* and *VALIDATION PARAMETERS*.

By utilizing the Controls, Standards with validation, and the confirmation method, you should achieve a reproducible and accurate result.

INTERPRETATION OF RESULTS

Calculation of Results

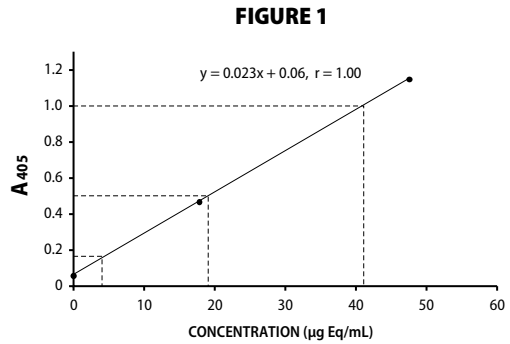
Calculations: The standard curve is generated using the blank-subtracted A₄₀₅ value of each CIC-Raji Standard on the y-axis versus the assigned micrograms of serum-treated, heat-aggregated gamma globulin equivalents/mL (µg Eq/mL) indicated on the vial label for each Standard on the x-axis. After linear regression, the generated standard curve must meet the validation requirements (see below). The sample concentrations are then calculated directly from the standard curve. Most computers and calculators are capable of performing these calculations.

Alternatively, the data may be graphed manually and the values (µg Eq/mL) of the test samples read directly from the best-fit line of the standard curve. An example of a typical standard curve is shown in Figure 1.

Confirmation Test Calculation: To confirm a positive result, the immune complex concentration [CIC] determined in the sample diluted in CIC-Raji Confirmation Diluent is divided by the immune complex concentration measured in the sample diluted in Complement Specimen Diluent to generate a ratio:

$$\text{ratio} = \frac{[\text{CIC}] \text{ in CIC-Raji Confirmation Diluent}}{[\text{CIC}] \text{ in Complement Specimen Diluent}}$$

Example of Standard Curve



Sample	A ₄₀₅	µg Eq/mL
Standard A	0.06	0
Standard B	0.46	18
Standard C	1.15	48
Specimen 1	0.15	3.9
Specimen 2	0.50	19.1
Specimen 3	1.00	40.9
r = 1.00	m = 0.023	b = 0.06

Validation

Determine the slope, intercept, and correlation coefficient of the derived best fit line. The values must be within the specified ranges to qualify the assay:

- correlation coefficient (r): > 0.95
- slope (m): 0.013 to 0.034
- y-intercept (b): (-)0.07 to (+)0.10

Most normal subjects demonstrate measurable levels of CIC. Since there is no accepted abnormal level of CIC, the user should establish in-house normal levels. As a guideline, levels of CIC based on the results obtained from the normal populations described in *EXPECTED VALUES* are as follows:

Normal Results: Values less than or equal to 15 µg Eq/mL are considered normal for levels of CIC.

Abnormal Results: Values greater than or equal to 20 µg Eq/mL are considered abnormal for levels of CIC. Specimens which have measured concentrations of CIC greater than CIC-Raji Standard C should be reported as greater than the assigned CIC-Raji Standard C concentration indicated on the vial label.

Equivocal Values: Values greater than 15 µg Eq/mL and less than 20 µg Eq/mL are equivocal. These specimens may be repeat-tested or a new sample may be drawn and tested, if indicated. If an equivocal specimen repeats as equivocal, the specimen is then considered significantly higher than normal and may be reported as abnormal.

Confirmation Results: If the ratio is less than 0.5, the positive CIC result is confirmed. In other words, greater than 50% reduction in the apparent CIC concentration confirms a positive result.

Occasionally, positive specimens may not confirm. Non-confirming specimens may be due to, among other reasons: (1) mishandled specimens (e.g., contaminated or heat-inactivated) or (2) specimens containing human IgG antibodies which bind to mouse IgG. Such specimens, however, are not necessarily negative for CIC. The material causing the apparent false positive result may mask concomitantly occurring CIC which, if they were present alone, would otherwise give a confirmable positive CIC result.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

This test measures immune complexes or aggregates of human IgG containing C3 activation fragments. Therefore conditions that promote aggregation of IgG or complement activation must be avoided during sample collection and processing.

EXPECTED VALUES

Fifty (50) selected sera were obtained from a reference laboratory which receives specimens from throughout the United States. These sera were tested in the Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA and in the reference laboratory's Raji Cell assay. There was a 92% agreement between the two assays for the measurement of the presence of CIC.

Sera obtained from sixty-two (62) SLE patients at two eastern U.S. clinics and from twenty-nine (29) RA patients at a southern U.S. rheumatology clinic were tested in the Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA. In addition, sera from twenty-six (26) normal, healthy subjects at the two SLE clinic sites and from twenty-five (25) clinically non-autoimmune patients reporting to the rheumatology clinic were tested. The mean concentrations of CIC, the standard deviations, and the frequency distribution for each population are presented in Figures 2, 3, and 4.

Fig. 2, CIC-RAJI CELL REPLACEMENT EIA Systemic Lupus Erythematosus Population

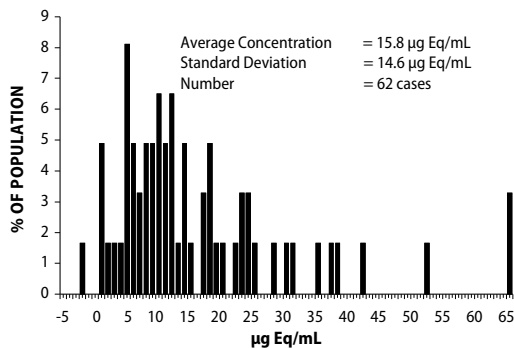


Fig. 3, CIC-RAJI CELL REPLACEMENT EIA Rheumatoid Arthritis Population

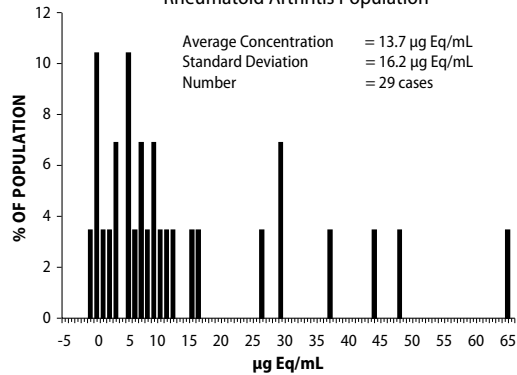
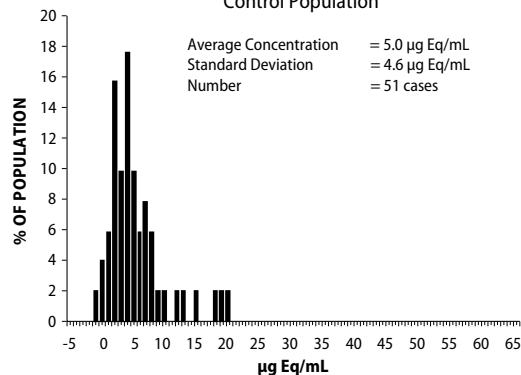


Fig. 4, CIC-RAJI CELL REPLACEMENT EIA Control Population



Within one SLE site and the RA site, the degree of disease activity was assigned independently of any CIC laboratory data. This assessment was made by the attending physician(s). To assure consistent reporting, one physician at each site later reviewed the patient records and assigned the disease activity. One RA patient was described as late stage "burnout." The CIC result for this patient was 1 µg Eq/mL. Since there were no other similar RA patients, this individual result is not included in Table 2. Table 2 shows the observed relationship between CIC measured by the Quidel CIC-Raji Cell Replacement Enzyme Immunoassay and the disease activity of the patients.

TABLE 2
CIC-RAJI CELL REPLACEMENT ASSAY RESULTS COMPARED TO DISEASE ACTIVITY

	% Abnormal ¹		
	Low Activity	Moderate Activity	High Activity
SLE	8% (1/12)	36% (4/11)	79% (11/14)
RA	0% (0/4)	19% (3/16)	50% (4/8)

¹ Inside the parentheses (after each % abnormal) is indicated the number of patients testing abnormal divided by the number of patients classified with the particular disease activity.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy

A World Health Organization (WHO) Immune Complex Standard, i.e., tetanus toxoid-anti-tetanus toxoid complexes pre-incubated in fresh normal human serum, was used to standardize the assay. To test the accuracy of the assay, five dilutions of the WHO Standard were tested in triplicate in nine runs in the Quidel kit. The assayed concentrations showed a correlation of 0.99 with the known values.

Reproducibility

Patient specimens and Kit Standards were tested in nine assay runs in two different kit lots. Each was tested in triplicate within each assay run. The average variation between each run for the specimens and Kit Standards is shown in Table 3, as interassay variation. The average variation within each run for the specimens and Kit Standards is shown in Table 3 as intraassay variation.

**TABLE 3
ASSAY REPRODUCIBILITY**

	Mean ($\mu\text{g Eq/mL}$)	Intraassay (% CV)	Interassay (% CV)
Specimen 1	56	5	9
2	13	9	23
Standard 1	4	8	30
2	11	7	15
3	23	5	9
4	32	4	6
5	40	5	6
6	48	4	5
7	59	3	4

Sensitivity

The Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA measures at least 4 $\mu\text{g Eq/mL}$ or greater of CIC analyte based on comparison to the WHO Standard.

Specificity

The fifty-one (51) control sera described in the *EXAMPLE VALUES* section were tested in the Quidel CIC-Raji Cell Replacement assay. Only three were positive (repeatedly greater than 15 $\mu\text{g Eq/mL}$), yielding a 94% specificity.

ASSISTANCE

To place an order or for technical assistance, please contact a Quidel Representative at 800-524-6318 or 408-616-4301, Monday through Friday, between 8:00 a.m. and 5:00 p.m., Pacific Time. Orders may also be placed by fax at 408-616-4310.

For services outside the U.S., please contact your local distributor.

KURZANLEITUNG

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

Vorbereitungen

1. Waschlösung ansetzen.
2. Proben verdünnen.

Testverfahren

3. Mikroassay-Vertiefungen rehydrieren.
4. 100 μl des Komplement-Probenverdünnungsmittels in die Blindvertiefung(en) geben.
5. Je 100 μl der Standardlösungen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen geben.
6. Bei Raumtemperatur (15–30 °C) für 60 Minuten inkubieren.
7. Die Mikroassay-Vertiefungen fünfmal waschen.
8. Je 50 μl des CIC-Raji-Konjugats in die Testvertiefungen geben.
9. Bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubieren (während dieser Inkubation die Substratlösung ansetzen).
10. Die Mikroassay-Vertiefungen fünfmal waschen.
11. Je 100 μl Substratlösung in die Testvertiefungen geben.
12. Bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubieren.
13. Je 50 μl Stopplösung in die Testvertiefungen geben.
14. Innerhalb von 60 Minuten die Extinktion bei 405 nm ablesen.

Berechnungen

15. Die Extinktion als Funktion der Standardlösungskonzentration auf dem beiliegenden Millimeterpapier auftragen oder zur Durchführung einer linearen Regression in einen Rechner eingeben.
16. Die Probenkonzentrationen direkt von der Eichgerade ablesen oder mit Hilfe der erforderlichen Funktion auf dem Rechner bestimmen.

VORGESEHENER VERWENDUNGSZWECK

Der Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA dient zur Bestimmung von Immunkomplexen mit C3-Aktivierungsfragmenten in Humanserum und Plasma.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Die Bedeutung zirkulierender Immunkomplexe (CIC) und ihre Rolle in zahlreichen Krankheiten ist bereits seit Jahren Gegenstand verschiedener Untersuchungen. Ihre Bildung stellt einen schützenden, kontinuierlich stattfindenden und gewöhnlich benignen Vorgang eines normal funktionierenden Immunsystems dar. CICs werden im normalen Wirtsorganismus durch eine Reihe komplexer, biochemischer, enzymatischer und zellulärer Vorgänge aus der Zirkulation entfernt. Für die effektive Entfernung vieler CICs ist die Aktivierung von Komplementfaktoren erforderlich. Die Komplementaktivierung bewirkt eine Ablagerung von C3-Fragmenten im Immunkomplex, der eine verstärkte Elimination durch die Phagozyten des Monozyten-Makrophagen-Systems folgt. Unter bestimmten Bedingungen, die noch nicht vollständig erforscht sind, läuft die Elimination der Immunkomplexe aus dem Körper nicht effizient ab. In derartigen Erkrankungen können sich die Immunkomplexe anreichern und an verschiedenen Organen und Geweben zu komplementabhängigen Schäden führen. Durch diese Komplementaktivierung kann eine Reihe potenziell destruktiver Vorgänge im Wirtsorganismus gestartet werden, so z. B. die Bildung von Anaphylatoxinen, Zellauflösung, Leukozytenstimulation sowie die Aktivierung von Makrophagen und anderen Zellen.¹ Bei der Bindung der Immunkomplexe an die Gefäßwände oder Zellmembrane kann eine Zerstörung des normalen Gewebes stattfinden, wie z. B. in einigen Fällen von Glomerulonephritis.

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

Zirkulierende Immunkomplexe wurden in einer Reihe von Erkrankungen nachgewiesen, so z. B. bei Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Traumata und neoplastischen, proliferativen Erkrankungen. In jüngst durchgeführten Studien wurde darauf hingewiesen, dass die Bestimmung zirkulierender Immunkomplexe bei der Bewertung bestimmter Erkrankungen und, unter bestimmten Umständen auch, bei der Überwachung der Therapiewirksamkeit eine wichtige Rolle spielen könnte. Dies trifft

besonders für systemischen Lupus erythematoses (SLE) und einige Formen rheumatoider Arthritis (RA) zu.^{3,4} Die erste Erkrankung, die mit der Bildung von Immunkomplexen in Zusammenhang gebracht wurde, war die Serumkrankheit; sie wurde Anfang des 20. Jahrhunderts von Pirquet beschrieben. Seither wurden von erhöhten CIC-Konzentrationen in Autoimmunerkrankheiten (SLE, SLE-Syndrom, RA), Glomerulonephritis, neoplastischen Krankheiten (Hodgkin-Krankheit, Leukämie), bakteriellen Erkrankungen (Endocarditis lenta, Lepra), Parasiteninfektionen (Malaria, Schistosomiasis) und Virusinfektionen (Hepatitis, Mononucleosis) berichtet.

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

FUNKTIONSPRINZIP

Fragmente des dritten Komplementfaktors C3 gehen häufig eine kovalente Bindung mit komplementaktivierenden Immunkomplexen ein. Raji-Zellen, die von einer kontinuierlichen B-Lymphozyten-Zelllinie stammen, verfügen über CR2-Komplementrezeptoren, die mit den iC3b-, C3d,g- und C3d-Fragmenten von aktiviertem C3 Bindungen eingehen.^{6,7,8} Der Raji-Zellen-CIC-Test beruht auf der Fähigkeit der CR2-Rezeptoren von Raji-Zellen, Immunkomplexe zu binden, die diese C3-Fragmente enthalten.⁶ Mit dem Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA können durch die Verwendung eines immobilisierten monoklonalen Antikörpers zudem CIC-haltige C3-Fragmente bestimmt werden, die — wie bei der CR2-Bindung von Raji-Zellen — eine spezifische Bindungsaffinität für iC3b-, C3d,g- und C3d-Aktivierungsfragmente von C3 haben.

In der ersten Phase werden Standardlösungen sowie Serum- und Plasmaprobe, die mit Komplement-Probenverdünnungsmittel verdünnt wurden, in die — mit monoklonalen Antikörpern gegen humane C3-Fragmente beschichteten — Mikroassay-Vertiefungen gegeben und inkubiert. Während dieser Inkubation werden Immunkomplexe, die C3-Aktivierungsfragmente enthalten, vom Festphasen-Antikörper erfasst. Nach der Inkubation werden ungebundene Serum- oder Plasmaproteine im Waschschrift entfernt.

In der zweiten Phase wird an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiertes antihumanes IgG von Mäusen in die verschiedenen Testvertiefungen gegeben und inkubiert. Während dieser Inkubation geht das Konjugat mit den bereits an die Mikroassay-Vertiefungen gebundenen Immunkomplexe eine Bindung ein. Ungebundenes Konjugat wird im Waschschrift entfernt.

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

Die Extinktionswerte (E_{405} -Werte) werden spektrophotometrisch bestimmt. Die Intensität der grünen Färbung ist proportional zur Menge des an die feste Phase gebundenen CIC. Es wird eine Eichgerade erstellt, indem die für die verschiedenen Standardlösungen erhaltenen E_{405} -Werte gegen die Konzentration aufgetragen werden. Die Konzentration der in der Probe vorliegenden Immunkomplexe wird dann anhand dieser Eichgerade ermittelt. Die Ergebnisse werden als Äquivalente von serumbehandeltem, hitzeaggregiertem Gammaglobulin (HAGG) humanen Ursprungs in Mikrogramm pro Milliliter ($\mu\text{g Äq/ml}$) angegeben. Zum Bestätigen eines positiven CIC-Ergebnisses kann die Probe erneut getestet werden. Dazu wird sie mit einem CIC-Raji-Kontrollverdünnungsmittel verdünnt, das blockierende Antikörper enthält, deren Spezifität der des in den Mikroassay-Vertiefungen immobilisierten Antikörpers entspricht.

REAGENZEN UND MITGELIEFERTER MATERIALIEN

Der CIC-Raji Cell Replacement EIA enthält folgende Komponenten:

- A CIC-Raji-Standardlösungen Artikel nr. A9513–A9515 je 1, 2 ml**
B Jede Standardlösung enthält eine bekannte Menge an humanem, serumbehandeltem HAGG in
C phosphatgepufferter Kochsalzlösung, 2,5 % Stabilisatoren und 0,01 % Thimerosal.

- 1 Mikroassay-Platte Artikelnr. A9512 je 12**
 Platte mit 96 Vertiefungen, einschließlich Feststelleinrichtung und Halterung. Setzt sich aus Teststreifen mit jeweils 8 Vertiefungen zusammen, die mit antihumanen C3-Fragmenten von Mäusen beschichtet sind und sich in einem wiederverschließbaren Kunststoffbeutel befinden.
- 2 Stopplösung Artikel Nr. A3673 6 ml**
 Enthält 250 mM Oxalsäure.
- 3 20fach konzentrierte Waschlösung Artikelnr. A3674 je 2, 50 ml**
 Enthält im verdünnten Zustand jeweils phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 0,05 % Tween-20TM und 0,01 % Thimerosal
- 4 Komplement-Probenverdünnungsmittel Artikelnr. A3670 50 ml**
 Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 2,5 % Stabilisatoren und 0,035 % ProClin[®] 300.
- 5 Substratverdünnung Artikelnr. A3672 25 ml**
 Enthält 0,1 M Zitratpuffer und 0,05 % H₂O₂.
- 6 Konzentriertes Substrat Artikelnr. A3671 1,5 ml**
 Enthält 0,7 % 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), Diammoniumsulfat.
- 7 CIC-Raji-Konjugat Artikelnr. A9516 je 2, 3 ml**
 Enthält an Peroxidase konjugiertes, antihumanes IgG (Maus), suspendiert in einem stabilisierenden HRP-Puffer mit Konservierungsmittel.
- 8 CIC-Raji-Kontrollverdünnungsmittel Artikelnr. A9517 je 2, 12 ml**
 Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 2,5 % Stabilisatoren, antihumane Antikörper (C3-Fragmente) und 0,035 % ProClin[®] 300.

Tween-20TM ist ein Warenzeichen von Atlas Chemical Industries, 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 Waschlösungsverdünnung
 Waschflasche oder anderes für Immunassays geeignetes Waschsystm
 Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanäle) Mehrfachmikropipetten (optional)
 Saubere Pipetten, 1 ml, 5 ml und 10 ml
 Mikropipetten und Pipettenspitzen
 Plattenlesegerät für Extinktionsmessungen (E_{405}) über den Bereich von 0,0 bis 2,0
 Vollentsalztes oder destilliertes Wasser

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Zur *In-vitro*-Diagnostik.
- Beim Arbeiten mit diesem Kit und den Proben allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit und örtlich geltender Bestimmungen entsorgen.
- Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Die Reagenzien des Assays wie angegeben lagern.
- Beim Hinzufügen oder Ansaugen von Flüssigkeiten zu bzw. von den Mikroassay-Vertiefungen nicht den Boden der Vertiefungen ankratzen oder berühren.
- Durch die Verwendung von Inkubationszeiten und -temperaturen, die von den unter „Testverfahren“ gegebenen Werten abweichen, können falsche Ergebnisse erhalten werden.
- Die Mikroassay-Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
- Die Mikroassay-Vertiefungen jeweils nur für eine Bestimmung verwenden.

10. Für ein zügiges und effizientes Dosieren von Flüssigkeiten wird der Gebrauch von Mehrkanal- oder Mehrfachpipetten empfohlen.
11. Zum Gewährleisten genauer Messungen bei der Zugabe der Proben und Standardlösungen genau arbeiten. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen und nur kalibrierte Geräte verwenden.
12. Für dieses Assay kann eine beliebige anerkannte Waschmethode eingesetzt werden.
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

Ungeöffnete Kits bei 2–8 °C aufbewahren. Nach dem Öffnen des Kits kann die 20fach konzentrierte Waschlösung 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.

Serum- und Plasmaproben sollten unter keimfreien Bedingungen entnommen und gemäß Standardverfahren für die klinische Laborpraxis getestet werden.¹⁰ Die Proben nicht hitzeinaktivieren. Schwebstoffteilchen sollten vor dem Testen durch Zentrifugieren bei niedrigen Drehzahlen von den Proben entfernt werden.

Die Proben können für bis zu 6 Stunden bei ungefähr 0 °C auf Eis gelagert werden. Für die Aufbewahrung über längere Zeiträume sollten die Proben bei mindestens -70 °C eingefroren werden (die Lagerung bei -20 °C kann zu falschen Ergebnissen führen).

VORBEREITUNG VON REAGENZIEN

Die Mengen an Substratlösung und Mikroassay-Teststreifen, die für eine bestimmte Anzahl von Bestimmungen erforderlich sind, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Nach der Entnahme der erforderlichen Reagenzien und Materialien die nicht mehr benötigten Komponenten wieder auf die erforderliche Lagertemperatur bringen (siehe *LAGERUNG*). Alle Reagenzien und Materialien vor dem Test auf Raumtemperatur (15–30 °C) bringen.

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 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 2–8 °C für 30 Tage haltbar. Das Reagenz beim Auftreten von Verfärbungen oder Trübungen entsorgen.
2. **Entnehmen der Mikroassay-Teststreifen.** Die Anzahl der erforderlichen Mikroassay-Teststreifen anhand von Tabelle 1 ermitteln. Die Teststreifen-Feststelleinrichtung von der Platte entfernen. Die nicht benötigten Teststreifen entnehmen und in den Beutel legen. Den Beutel wieder verschließen und bei 2–8 °C aufbewahren. Die für den Test zu verwendenden Teststreifen befestigen.

3. Probenverdünnung

Vorsicht: Alle Proben als potenziell infektiöses Material behandeln. Die Proben nicht hitzeinaktivieren oder kontaminieren.

Die Anzahl (N) der zu testenden Proben bestimmen. Die Teströhrchen 1 bis N beschriften und auf dem beiliegenden Datenblatt die Daten jedes Teströhrchens eintragen.

Alle Proben mit dem Komplement-Probenverdünnungsmittel im Verhältnis 1:50 verdünnen (z. B. 10 µl Probe auf 490 µl Komplement-Probenverdünnungsmittel). Gründlich mischen, dabei jedoch die Bildung von Schaum und Blasen vermeiden. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden.

4. **Hinzugeben der verdünnten Proben in die Mikrotiter-Vertiefungen.** Zum Hinzugeben der verdünnten Proben, Standardlösungen, Kontrollen und Pufferlösungen in die Vertiefungen stehen zwei Methoden zur Verfügung (siehe Schritt 5 unter *TESTVERFAHREN*). Bei kleinen Testdurchläufen, die aus einer geringen Anzahl von Proben bestehen, können die verdünnten Proben und andere Reagenzien mit einer Mikropipette (100 µl/Vertiefung) direkt in die vorgesehenen Vertiefungen gegeben werden. Für kleine und umfangreiche Testdurchläufe, besonders jedoch für letzteren Fall, sollten zum Hinzugeben der Proben wie folgt Mehrkanalpipetten verwendet werden. **(Auch für die Zugabe von Konjugat, Substrat und Stopplösung kann eine Mehrkanalpipette verwendet werden.)**

Um die Aufgabe von Standardlösungen, Kontrollen und verdünnten Proben in die Mikroassay-Vertiefungen so schnell wie möglich zu gestalten, kann ein „Doppelplattenverfahren“ eingesetzt werden. Anstelle der Zugabe von jeweils 100 µl Standardlösung, Kontrolle und verdünnter Probe in die verschiedenen, mit Antikörper beschichteten Vertiefungen werden dabei 120–130 µl jeder Lösung in der gewünschten EIA-Anordnung in die verschiedenen Vertiefungen einer inaktiven Platte (nicht im Lieferumfang enthalten) gegeben. Nachdem alle zu testenden Lösungen in die Vertiefungen der inaktiven Mikroassay-Platte gegeben wurden, werden nun mit einer Mehrkanal-Mikropipette von jeder Vertiefung der inaktiven Platte 100 µl in die Vertiefungen der aktiven — d.h. mit Antikörper beschichteten Platte — überführt. Um das Risiko von Kreuzkontaminationen möglichst gering zu halten, müssen die Pipettenspitzen jedes Mal, wenn sich die Zusammensetzung der zu überführenden Proben ändert, ausgewechselt werden.

5. **CIC-Raji-Kontrollverdünnungsmittel (optional).** Sollen positive Ergebnisse bestätigt werden, die Anzahl (N) der zu bestätigenden Proben bestimmen. Die Teströhrchen mit 1b bis 1b beschriften und schriftlich festhalten. Mit dem CIC-Raji-Kontrollverdünnungsmittel eine Verdünnung im Verhältnis 1:50 erstellen. Eine mit CIC-Raji-Kontrollverdünnungsmittel verdünnte Probe muss **gleichzeitig** mit der gleichen Verdünnung der Probe in Komplement-Probenverdünnungsmittel getestet werden.
6. **Vorbereiten der Substratlösung. Unmittelbar vor dem Gebrauch vorbereiten.** Das erforderliche Volumen an Substratlösung anhand von Tabelle 1 (siehe unten) bestimmen. Die Substratlösung vorbereiten, indem für jeden ml der Substratverdünnung 50 µl konzentriertes Substrat hinzugegeben wird. Gründlich mischen.
7. **CIC-Kontrollen.** Die negativen und positiven CIC-RCR-Kontrollen sind separat von Quidel erhältlich (Katalog-Nr. A014). Sie sollten gemäß den auf der zugehörigen Packungsbeilage gegebenen Anleitungen vorbereitet werden. Weitere Informationen hierzu unter *QUALITÄTSKONTROLLE* auf dieser Packungsbeilage.

**TABELLE 1
TESTANFORDERUNGEN**

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

¹ Die Anzahl der zu testenden Proben bestimmen und elf (11) Vertiefungen für die drei Standardlösungen, die zu testenden niedrigen und hohen Kontrollen (in Duplikaten) sowie eine Blindvertiefung hinzufügen. Duplizierte Standardlösungen und Kontrollen sollten sofern möglich auf separaten Mikroassay-Teststreifen getestet werden.

TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

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

- Die Positionen der Blindvertiefungen, aller Proben, Standardlösungen und Kontrollen sowie die auf den Flaschenetiketten angegebenen Chargennummern schriftlich festhalten. Die Ausrichtung der Mikroassay-Platte durch die Markierung einer Plattenecke festhalten.
- Die Mikroassay-Teststreifen wie folgt vorbereiten:
 - Die Mikroassay-Vertiefungen rehydrieren, indem mit einer Waschflasche oder einer geeigneten Füllereinrichtung in jede Vertiefung 300 µl Waschlösung gegeben wird.
 - Bei Raumtemperatur (15–30 °C) für 1–2 Minuten inkubieren.
 - Den Inhalt der verschiedenen Vertiefungen absaugen.
 - Die Platte umdrehen und zweimal vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen. Die Vertiefungen nicht austrocknen lassen.
- 100 µl des Komplement-Probenverdünnungsmittels in diejenige(n) Vertiefung(en) geben, die zur Bestimmung des Nullwertes des Plattenlesegeräts verwendet werden sollen (die sog. Blindvertiefungen).
- Je 100 µl der CIC-Raji-Standardlösungen (A, B und C) in die Duplikatvertiefungen geben.
- Je 100 µl der verdünnten Proben in die entsprechenden Mikroassay-Vertiefungen geben. Siehe hierzu auch Schritt 4 unter *VORBEREITUNG VON REAGENZIEN*.
- Bei Raumtemperatur (15–30 °C) für 60 ± 1 Minuten inkubieren.
- Die Mikroassay-Vertiefungen wie folgt waschen:
 - Nach der Inkubation von Schritt 6 (und Schritt 9 — siehe unten) die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - Mit einer Waschflasche oder einer geeigneten Füllereinrichtung ungefähr 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - Die Vertiefungen bei Raumtemperatur (15–30 °C) für 1 Minute inkubieren.
 - Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - Ungefähr 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - Die Schritte e–f dreimal wiederholen.

- Nach diesem fünften Waschschrift die Platte umdrehen und zweimal vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
- Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette jeweils 50 µl des CIC-Raji-Konjugats in die gewaschenen Testvertiefungen und die Blindvertiefungen geben.
 - Die Mikroassay-Teststreifen bei Raumtemperatur (15–30 °C) für 30 ± 1 Minuten inkubieren.
Während dieser Inkubation die Substratlösung vorbereiten (siehe Schritt 6 unter VORBEREITUNG VON REAGENZIEN).
 - Die Mikroassay-Vertiefungen nach der 30 Minuten dauernden Inkubation von Schritt 9 wie oben beschrieben (Schritt 7) waschen.
 - Unmittelbar nach dem Waschschrift mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette je 100 µl der frisch angesetzten Substratlösung in die Vertiefungen und Blindvertiefung(en) geben.
 - Die Mikroassay-Teststreifen bei Raumtemperatur (15–30 °C) für 30 ± 1 Minuten inkubieren.
 - Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette je 50 µl der Stopplösung in die Vertiefungen 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 bei der Zugabe der Substratlösung. Die Platte vorsichtig antippen, damit sich die Farbentwicklung gleichmäßig verteilt.
 - Innerhalb von einer Stunde nach der Zugabe der Stopplösung (Schritt 13) die Extinktion für jede Testvertiefung bei 405 nm bestimmen (E_{405} -Wert) und je nach verwendetem Spektrophotometer eine Blindwertkorrektur vornehmen.
 - Den Halter und die Feststelleinrichtung für Teststreifen für zukünftige Bestimmungen aufbewahren.
 - Die verbleibenden verdünnten Proben, Substrate und benutzten Mikroassay-Teststreifen entsorgen (siehe Schritt 3 unter *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*). Den Halter und die Feststelleinrichtung für Teststreifen für zukünftige Bestimmungen aufbewahren.

EMPFOHLENES BESTÄTIGUNGSVERFAHREN

Ist eine unabhängige Bestätigung eines positiven Testergebnisses erwünscht oder widerspricht ein positives Testergebnis den klinischen Daten, kann die positive Probe in einem bestätigenden Test erneut getestet werden. Negative Testergebnisse können nicht bestätigt werden. Für das Bestätigungsverfahren wird ein Probenverdünnungsmittel (das CIC-Raji-Kontrollverdünnungsmittel) verwendet, das antihumane Antikörper (C3-Fragmente) enthält. Zum Bestätigen eines positiven Testergebnisses muss ein aliquoter Teil der Probe mit CIC-Raji-Kontrollverdünnungsmittel und ein zweiter aliquoter Teil auf ähnlich Weise wie mit dem Komplement-Probenverdünnungsmittel verdünnt werden. Beide Proben werden dann wie gewohnt mit dem Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA getestet. Hierzu auch die unter *VORBEREITUNG VON REAGENZIEN* und *AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE* gegebenen Informationen einsehen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Um die Anforderungen guter Laborpraxis zu erfüllen, sollten jeden Tag positive und negative Kontrollen analysiert werden. Zu diesem Zweck bietet Quidel für den Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA Kontrollen an (CIC-RCR Controls, Katalognr. **A014**), die gemäß den auf der zugehörigen Packungsbeilage gegebenen Anleitungen eingesetzt werden sollten. Sollten die positiven und/oder negativen Kontrollen nicht ihren vorgesehenen Verwendungszweck erfüllen, bitte möglichst umgehend den technischen Service von Quidel verständigen.

Zusätzlich zu den Kontrollen umfasst der Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA auch ein *EMPFOHLENES BESTÄTIGUNGSVERFAHREN* und *VALIDIERUNGSPARAMETER*.

Bei Verwendung der Kontrollen, Standardlösungen (einschließlich Validierung) und des Bestätigungsverfahrens sollten reproduzierbare und genaue Ergebnisse erhalten werden.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Berechnung der Ergebnisse

Berechnungen: Die Eichgerade wird mit den Blindwert-korrigierten E_{405} -Werten der verschiedenen CIC-Raji-Standardlösungen auf der y-Achse und den entsprechenden — auf den Etiketten der Standardflaschen angegebenen — Äquivalenten des serumbehandelten, hitzeaggregierten Gammaglobulins in µg Äq/ml auf der x-Achse erstellt. Nach der Durchführung der linearen Regression muss die erstellte Eichgerade den Validierungsanforderungen (siehe unten) gerecht werden. Die Probenkonzentrationen werden nun direkt mit der Eichgerade berechnet. Diese Berechnungen werden von den meisten Rechnern und Taschenrechnern unterstützt.

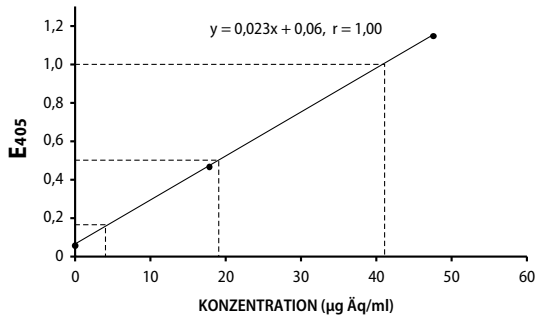
Die Daten können auch ohne Rechnerunterstützung, d.h. zeichnerisch, in ein Diagramm eingetragen werden. Die Werte der Proben ($\mu\text{g } \ddot{\text{A}}\text{q/ml}$) werden dann von der durch die Punkte gelegten Gerade abgelesen. Ein Beispiel einer typischen Eichgerade ist in Abb. 1 dargestellt.

Bestätigen der Testberechnungen: Zum Bestätigen eines positiven Testergebnisses wird die Konzentration der Immunkomplexe (CIC), die in der mit CIC-Raji-Kontrollverdünnungsmittel verdünnten Probe bestimmt wurde, durch die Immunkomplexkonzentration geteilt, die in der mit Komplement-Probenverdünnungsmittel verdünnten Probe gemessen wurde. Auf diese Weise wird folgendes Verhältnis erhalten:

$$\text{ratio} = \frac{[\text{CIC}] \text{ in CIC-Raji Confirmation Diluent}}{[\text{CIC}] \text{ in Complement Specimen Diluent}}$$

Beispiel einer Eichgerade

Abb. 1



Probe	E_{405}	$\mu\text{g } \ddot{\text{A}}\text{q/ml}$
Standard A	0,06	0
Standard B	0,46	18
Standard C	1,15	48
Probe 1	0,15	3,9
Probe 2	0,50	19,1
Probe 3	1,00	40,9
$r = 1,00$	$m = 0,023$	$b = 0,06$

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) 0,013 bis 0,034
- y-Schnittpunkt (b) (-)0,07 bis (+)0,10

Bei den meisten Probanden treten messbare Konzentrationen von CIC auf. Da keine allgemein anerkannten Grenzwerte für anomale CIC-Konzentrationen existieren, sind diese vom Anwender selbst festzulegen. Die im Folgenden aufgeführten CIC-Konzentrationen, die von den unter ERWARTETE WERTE beschriebenen normalen Populationen stammen, sollen als Richtlinie gelten:

Normale Ergebnisse: Werte $\leq 15 \mu\text{g } \ddot{\text{A}}\text{q/ml}$ werden als normale CIC-Konzentrationen betrachtet.

Anomale Ergebnisse: Werte $\geq 20 \mu\text{g } \ddot{\text{A}}\text{q/ml}$ werden als anomale CIC-Konzentrationen betrachtet. Bei Proben mit einer gemessenen CIC-Konzentration, die über der von CIC-Raji-Standardlösung C liegt, sollten die Probenergebnisse als Werte angegeben werden, die über der auf der Flasche von CIC-Raji-Standardlösung C angegebenen Konzentration liegen.

Nicht eindeutige Werte: Werte über $15 \mu\text{g } \ddot{\text{A}}\text{q/ml}$ und unter $20 \mu\text{g } \ddot{\text{A}}\text{q/ml}$ gelten nicht als eindeutige Ergebnisse. Diese Proben können erneut getestet werden, oder — wenn dies angezeigt ist — eine neue Probe kann entnommen und getestet werden. Wird für eine nicht eindeutige Probe wiederholt ein nicht eindeutiges Ergebnis erhalten, wird sie als signifikant höher als normal betrachtet und kann als anomal angegeben werden.

Bestätigung der Ergebnisse: Bei einem Verhältnis unter 0,5 gilt das positive CIC-Ergebnis als bestätigt. Eine Reduktion der scheinbaren CIC-Konzentration um über 50 % kann also als Bestätigung für ein positives Ergebnis angesehen werden.

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

GRENZEN DER METHODE

Mit diesem Test können Immunkomplexe oder aggregiertes humanes IgG bestimmt werden, die bzw. das C3-Aktivierungsfragmente enthält. Bedingungen, die eine IgG-Aggregation oder Komplementaktivierung fördern, müssen daher während der Entnahme und Bearbeitung der Proben vermieden werden.

ERWARTETE WERTE

Von einem Referenzlabor, das seine Proben aus den USA bezieht, wurden fünfzig (50) Seren ausgewählt. Diese Seren wurden mit dem kompetitiven Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA und dem Raji-Zellen-Testverfahren des Referenzlabors getestet. Für den Nachweis von CIC wurde zwischen den beiden Testverfahren eine Übereinstimmung von 92 % gefunden.

Analysiert wurden mit dem Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA Seren von zweiundsechzig (62) SLE-Patienten von zwei im Osten der USA gelegenen Kliniken und von neunundzwanzig (29) RA-Patienten von einer Rheumaklinik im Süden der USA. In die Tests eingeschlossen waren darüber hinaus Seren von sechsundzwanzig (26) gesunden Probanden der beiden SLE-Kliniken und von fünfundzwanzig (25) nicht autoimmun Patienten, die an der Rheumaklinik behandelt wurden. Die mittleren CIC-Konzentrationen, Standardabweichungen und das Histogramm für die verschiedenen Populationen sind in Abb. 2, 3 und 4 veranschaulicht.

Abb. 2, CIC-RAJI CELL REPLACEMENT EIA
Population mit systemischem Lupus erythematodes

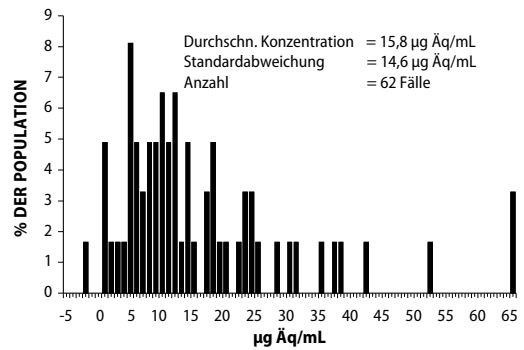


Abb. 3, CIC-RAJI CELL REPLACEMENT EIA
RA-Population

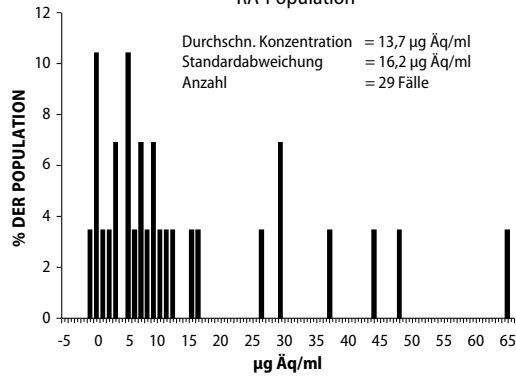
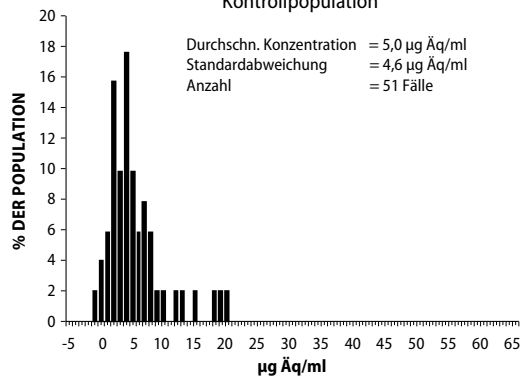


Abb. 4, CIC-RAJI CELL REPLACEMENT EIA
Kontrollpopulation



An einer der SLE-Kliniken und an der RA-Klinik wurde die Krankheitsaktivität zudem unabhängig von den CIC-Laborwerten bewertet. Die Bewertung wurde von dem jeweiligen behandelnden Arzt vorgenommen. Um bei der Berichterstellung möglichst einheitlich vorzugehen, wurde die Krankheitsaktivität anschließend pro Klinik von einem Arzt nach Durchsicht der entsprechenden Krankenakte bewertet. Ein RA-Patient wurde als Ausreißer im Endstadium bezeichnet. Das CIC-Ergebnis betrug für diesen Patienten 1 µg Äq/ml. Da es keine anderen RA-Patienten mit vergleichbaren Eigenschaften gab, wurde dieses Ergebnis in Tabelle 2 nicht berücksichtigt. Die mit dem Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA gemessenen CIC-Konzentrationen und die Krankheitsaktivität der Patienten sind Tabelle 2 gegenübergestellt.

TABELLE 2
ERGEBNISSE DES CIC-RAJI CELL REPLACEMENT EIA UND KRANKHEITSAKTIVITÄT

	% Anomal ¹		
	Geringe Aktivität	Moderate Aktivität	Hohe Aktivität
SLE	8 % (1/12)	36 % (4/11)	79 % (11/14)
RA	0 % (0/4)	19 % (3/16)	50 % (4/8)

¹ Die in Klammern angegebenen Zahlen (nach der anomalen Prozentangabe) stehen für die Anzahl der Patienten, für die anomale Ergebnisse gefunden wurden, geteilt durch die Anzahl der Patienten mit der jeweiligen Krankheitsaktivität.

LEISTUNGSDATEN

Genauigkeit

Für die Standardisierung des Tests wurde ein Immunkomplexstandard der Weltgesundheitsorganisation (WHO) verwendet. Er bestand aus Tetanustoxoid-Antitetanustoxoid-Komplexen, präinkubiert in frischem Humanserum. Zum Bestimmen der Testgenauigkeit wurden mit dem Quidel Kit in neun Durchläufen fünf Verdünnungen des WHO-Standards als Triplikate gemessen.

Zwischen den gemessenen und den bekannten Werten bestand eine Korrelation von 0,99.

Reproduzierbarkeit

Die Proben der Patienten und die Standardlösungen des Quidel Kits wurden von zwei unterschiedlichen Kit-Chargen in neun Testdurchläufen bestimmt. Die Proben wurden innerhalb der jeweiligen Testdurchläufe als Triplikate getestet. Die als Interassay-Variation bezeichnete mittlere Variation zwischen den Serien ist für die Proben und die Kit-Standardlösungen in Tabelle 3 dargestellt. Die in dieser Tabelle dargestellte Intraassay-Variation bezeichnet für die Proben und die Kit-Standardlösungen die mittlere Variation innerhalb der jeweiligen Serie.

TABELLE 3
REPRODUZIERBARKEIT DES TESTS

	Mittelwert (µg Äq/ml)	Intraassay (% VK)	Interassay (% VK)
Probe 1	56	5	9
2	13	9	23
Standard 1	4	8	30
2	11	7	15
3	23	5	9
4	32	4	6
5	40	5	6
6	48	4	5
7	59	3	4

Sensitivität

Auf dem Vergleich mit dem WHO-Standard beruhend können mit dem Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA Konzentrationen von mindestens 4 µg Äq/ml gemessen werden.

Spezifität

Die unter ERWARTETE ERGEBNISSE beschriebenen einundfünfzig (51) Kontrollseren wurden mit dem Quidel CIC-Raji Cell Replacement EIA getestet. Nur drei ergaben ein positives Ergebnis (wiederholt über 15 µg Äq/ml) und zeigten eine Spezifität von 94 %.

UNTERSTÜTZUNG

Zum Aufgeben einer Bestellung oder für technische Unterstützung wenden Sie sich unter +1 408 616 4301, Montags bis Freitags zwischen 8:00 und 17:00 Uhr (PST) an eine Quidel Vertretung. Bestellungen können unter +1 408 616 4310 auch per Fax gesendet werden.

Informationen zum Serviceangebot außerhalb der USA erhalten Sie von Ihrer Vertretung vor Ort.

GUIDA VELOCE PER LE FASI DEL SAGGIO

Prima di iniziare il saggio, leggere completamente l'insero fornito con il prodotto.

Preparazioni preliminari

1. Preparare la soluzione di lavaggio.
2. Diluire i campioni da esaminare.

Procedura del saggio

3. Reidratare i pozzetti per microsaggio.
4. Aggiungere 100 µl di diluente per campioni di complemento nei pozzetti vuoti.
5. Aggiungere 100 µl sia di standard che di campione di test nei pozzetti corrispondenti.
6. Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (15–30 °C).
7. Lavare i pozzetti per microsaggio per cinque volte.
8. Aggiungere 50 µl di coniugato CIC-Raji in ciascun pozzetto di test.
9. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente. (Preparare la soluzione per substrato durante questo periodo di incubazione).
10. Lavare i pozzetti per microsaggio per cinque volte.
11. Aggiungere a ciascun pozzetto di test 100 µl di soluzione per substrato.
12. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
13. Aggiungere a ciascun pozzetto 50 µl di soluzione bloccante.
14. Misurare l'assorbanza a 405 nm entro 60 minuti.

Calcoli

15. Tracciare l'assorbanza in contrapposizione alla concentrazione degli standard sulla carta millimetrata fornita oppure utilizzare una calcolatrice per l'analisi di regressione lineare.
16. Leggere le concentrazioni dei campioni del test direttamente dal grafico oppure eseguire le funzioni necessarie sulla calcolatrice per ottenere le concentrazioni dei campioni.

FINALITÀ D'USO

Il saggio immunoenzimatico Quidel CIC-Raji Cell Replacement (a sostituzione di cellule) misura gli immunocomplessi contenenti frammenti di attivazione C3 nel siero e plasma umani.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Per diversi anni sono state condotte ricerche sull'importanza degli immunocomplessi circolanti (CIC) e della loro correlazione con diverse malattie. La formazione di immunocomplessi costituisce un processo protettivo, in corso e solitamente benigno di un sistema immunitario normale. I CIC vengono eliminati dalla circolazione nell'ospite normale tramite numerosi processi biochimici, enzimatici e cellulari. La clearance effettiva di numerosi CIC richiede l'attivazione del complemento. L'attivazione del complemento produce il deposito del frammento C3 all'interno dell'immunocomplesso, seguito da una maggiore eliminazione del sistema reticolo-endoteliale da parte delle cellule fagocitiche. In presenza di determinate malattie, non completamente note, gli immunocomplessi possono non essere eliminati in modo efficace dal corpo. In questi casi, gli immunocomplessi possono accumularsi e dare inizio a lesioni dipendenti dal complemento in vari organi e tessuti. Questa attivazione del complemento può dare inizio a una serie di eventi potenzialmente distruttivi nell'ospite, tra cui la produzione di anafilossina, lisi di cellule, stimolazione leucocitaria ed attivazione di macrofagi ed altre cellule.¹ Quando gli immunocomplessi si fissano alle pareti dei vasi o alle membrane cellulari, può verificarsi la distruzione del tessuto normale, come avviene in alcuni casi di glomerulonefrite.

Alcune proprietà del CIC influenzano la potenziale patogenicità. Una particolare importanza va riconosciuta ai seguenti elementi: (1) natura, dimensione e concentrazione dell'antigene; (2) natura, dimensione e concentrazione dell'anticorpo; (3) tasso di formazione e clearance degli immunocomplessi.^{1,2}

Gli immunocomplessi circolanti sono stati misurati in diverse condizioni: ad esempio, infezioni, malattie autoimmuni, traumi e malattie con proliferazione neoplastica. Studi correnti evidenziano l'importanza della determinazione del CIC nella valutazione di alcune malattie e, in certi casi, nel controllo dell'efficacia di una terapia. Ciò è particolarmente vero in caso di lupus eritematoso sistemico (SLE) ed in alcune forme di artrite reumatoide (RA).^{3,4} La prima fase della malattia associata alla formazione di immunocomplessi era la malattia da siero, descritta agli inizi del 1900 da von Pirquet. A partire da quel periodo, livelli elevati di

CIC sono stati descritti nelle malattie autoimmuni (SLE, sindrome correlata a SLE, RA), glomerulonefrite, malattie neoplastiche (morbo di Hodgkin, leucemia), infezioni batteriche (endocardite batterica subacuta, lebbra), infezioni parassitarie (malaria, schistosomiasi) e infezioni virali (epatite, mononucleosi).

Sono state descritte oltre 40 tecniche di saggio per la determinazione o la quantizzazione dei CIC. Sono stati descritti test quali il saggio Raji Cell, il test di deviazione C1q, il test di agglutinina eritrocitaria, le procedure di legame di C1q nella fase liquida, il saggio del fattore reumatoide, il test di precipitina PEG e saggi C1q nella fase liquida.^{1,5} Dal momento che la dimensione e le proprietà fisicochimiche del CIC variano in modo significativo, nessuno di questi saggi è stato accettato come standard. Nel 1978 uno studio d'équipe sponsorizzato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) determinò che non vi era alcun singolo metodo adatto a tutte le fasi sospette della malattia e consigliava di eseguire almeno due diverse tecniche di saggio, al fine di rilevare e misurare i CIC in modo adeguato.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

I frammenti del terzo componente del complemento, C3, spesso si legano in modo covalente agli immunocomplessi di attivazione del complemento. Le cellule Raji, derivate da una linea di cellule di coltura di linfociti B continua, producono recettori di complemento CR2 che si legano ai frammenti iC3b, C3d,g e C3d del C3 attivato.^{6,7,8} Il saggio Raji Cell CIC si basa sulla capacità dei recettori CR2 delle cellule Raji di legarsi agli immunocomplessi contenenti tali frammenti C3.⁹ Il saggio immunoenzimatico Quidel CIC-Raji Cell Replacement misura anche i frammenti C3 contenenti CIC utilizzando un anticorpo monoclonale immobilizzato che si lega specificamente ai frammenti di attivazione iC3b, C3d,g e C3d di C3 in modo analogo alla reazione di legame CR2 della cellula Raji.

Nella prima fase, gli standard ed i campioni di siero e di plasma diluiti nel diluente per campioni di complemento vengono aggiunti nei pozzetti per microsaggio rivestiti con anticorpi monoclonali ai frammenti C3 umani e incubati. Durante questa incubazione, gli immunocomplessi contenenti i frammenti di attivazione C3 vengono catturati dall'anticorpo in fase solida. Dopo l'incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove le proteine di siero o di plasma non legate.

Nella seconda fase, l'IgG anti-umana di topo, coniugata con perossidasi estratto da radice di rafano (HRP) viene aggiunta in ogni pozzetto di test ed incubata. Durante questa incubazione, il coniugato si lega agli immunocomplessi che ora sono legati ai pozzetti per microsaggio. Il coniugato non legato viene rimosso con un ciclo di lavaggio.

Nella terza fase, ad ogni pozzetto viene aggiunto un substrato enzimatico. L'anticorpo coniugato con perossidasi estratto da radice di rafano legato reagisce con il substrato cromogeno formando un colore verde. Dopo l'incubazione, viene aggiunto un reagente per interrompere lo sviluppo del colore.

Le assorbanze standard e del campione esaminato (valori A_{405}) vengono misurate in modo spettrofotometrico. L'intensità del colore verde che si forma è proporzionale alla quantità di CIC che si lega alla fase solida. Tracciando i valori A_{405} ottenuti con ogni standard rispetto alla concentrazione indicata si ottiene una curva standard. La concentrazione degli immunocomplessi presenti nel campione in esame viene determinata facendo riferimento alla curva standard. I risultati sono espressi in microgrammi di equivalenti di gamma globuline umane aggregate a caldo (HAGG), trattate con siero, per ml ($\mu\text{g Eq/ml}$). Per confermare un risultato CIC positivo, il campione può essere testato dopo la diluizione nel CIC-Raji Confirmation Diluent (diluente di conferma) contenente anticorpi bloccanti con specificità simili all'anticorpo immobilizzato nel pozzetto del microsaggio.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Il kit per saggio immunoenzimatico CIC-Raji Cell Replacement contiene quanto segue:

- | | | |
|--|---------------------------|-----------------------|
| A Standard CIC-Raji | Codici A9513–A9515 | 3 fiale x 2 ml |
| B Ognuno di essi contiene una quantità nota di gamma globuline umane aggregate a caldo (HAGG), | | |
| C trattate con siero in PBS (soluzione salina tamponata con fosfato), il 2,5 % di stabilizzatori e lo 0,01 % di timerosal. | | |
| 1 Piastra per microsaggio | Codice A9512 | 12 pezzi |
| Per 96 pozzetti, con fissatore e supporto contenente strisce da otto pozzetti rivestiti con frammenti C3 anti-umani di topo in una busta protettiva risigillabile. | | |
| 2 Soluzione bloccante | Codice A3673 | 6 ml |
| Contiene 250 mM di acido ossalico. | | |
| 3 Soluzione di lavaggio concentrata 20X | Codice A3674 | 2 x 50 ml |
| Dopo la diluizione, ogni liquido ottenuto contiene soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), lo 0,05 % di Tween-20™ e lo 0,01 % di timerosal. | | |

24

- | | | |
|--|---------------------|------------------|
| 4 Diluente per campioni di complemento | Codice A3670 | 50 ml |
| Contiene PBS, il 2,5 % di stabilizzatori e lo 0,035 % di ProClin® 300. | | |
| 5 Diluente per substrato | Codice A3672 | 25 ml |
| Contiene 0,1 M di tampone citrato e lo 0,05 % di H ₂ O ₂ . | | |
| 6 Concentrato per substrato | Codice A3671 | 1,5 ml |
| Contiene lo 0,7 % di 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-acido sulfonico), sale di diammonio. | | |
| 7 Coniugato CIC-Raji | Codice A9516 | 2 x 3 ml |
| Contiene IgG anti-umane (topo) coniugate con perossidasi, sospese in un tampone stabilizzante di perossidasi estratto da radice di rafano con conservante. | | |
| 8 CIC-Raji Confirmation Diluent | Codice A9517 | 2 x 12 ml |
| Contiene PBS, il 2,5 % di stabilizzatori, anticorpo di frammento C3 anti-umano e lo 0,035 % di ProClin 300. | | |

Tween-20™ è un marchio di fabbrica di Atlas Chemical Industries, Inc.
ProClin® è un marchio registrato di Rohm and Haas Company.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Timer (60 minuti)

Calcolatrice o altro metodo di calcolo per la convalida del saggio

Piastre per microsaggio pulite e non utilizzate e/o provette e cestelli

Contenitore per la diluizione del tampone di lavaggio

Flacone di lavaggio o altro sistema di lavaggio per saggio immunologico

Pipetta multicanale regolabile (8 o 12 canali) o micropipette a ripetizione (opzionale)

Pipette pulite, 1 ml, 5 ml e 10 ml

Micropipette e punte per pipette

Lettore per piastra in grado di effettuare letture alla densità ottica di A_{405} tra 0,0 e 2,0

Acqua deionizzata o distillata

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico *In Vitro*.
2. Seguire le precauzioni generali durante la manipolazione del contenuto di questo kit e di qualunque campione paziente.
3. Smettere i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con le normative federali, statali e locali.
4. Usare i reagenti forniti come un'unità integrale prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.
5. Conservare i reagenti del saggio come indicato.
6. Quando si aggiungono o si aspirano i liquidi dai pozzetti per microsaggio, non raschiare né toccare il fondo dei pozzetti.
7. L'impostazione di tempi e temperature di incubazione diversi da quelli indicati nella sezione relativa alle procedure può fornire risultati errati.
8. Dopo l'inizio del saggio, evitare che i pozzetti per microsaggio si asciughino.
9. Non utilizzare un pozzetto per microsaggio per più di un test.
10. Si consiglia l'uso di pipette multicanale o di pipettatori a ripetizione per garantire la fornitura veloce dei reagenti.
11. Per una misurazione accurata dei campioni, aggiungere accuratamente i campioni e gli standard. Pipettare attentamente, usando esclusivamente apparecchiature calibrate.
12. Questo saggio può essere eseguito con qualunque metodo di lavaggio convalidato.
13. L'adeguata raccolta e conservazione dei campioni per il test sono essenziali per ottenere risultati accurati.
14. Evitare la contaminazione microbica o crociata di campioni, reagenti o materiali. In caso di contaminazione si possono ottenere risultati errati.

15. Come conservante viene utilizzato il timerosal. Il contatto o l'ingestione accidentale di tamponi o reagenti contenenti timerosal può provocare maggiori reazioni di ipersensibilità, tra cui irritazioni alla cute, agli occhi o alla bocca. In presenza di tali sintomi, consultare un medico. L'esposizione al timerosal può comportare potenziali effetti mutageni. Evitare il contatto con potenti acidi e basi.
16. Come conservante viene utilizzato ProClin® 300. Il contatto o l'ingestione accidentale di tamponi o reagenti contenenti ProClin può causare irritazioni alla cute, agli occhi o alla bocca. Adottare una buona pratica di laboratorio per ridurre l'esposizione. In presenza di sintomi, consultare un medico.
17. Il concentrato per substrato è sensibile alla luce. Evitare l'esposizione prolungata alla luce diretta. Quando non sono in uso, conservare i reagenti in un luogo buio.
18. Per evitare la formazione di aerosol durante il lavaggio, utilizzare un'apparecchiatura per aspirare il liquido di lavaggio in un flacone contenente candeggina per uso domestico.
19. Campioni inattivati a caldo, iperlipemici o contaminati possono fornire risultati errati.

CONSERVAZIONE

I kit chiusi devono essere conservati a 2–8 °C. Dopo l'apertura del kit, la soluzione di lavaggio concentrata 20X può essere conservata a 2–30 °C.

Dopo avere scelto i reagenti o i materiali da usare nel saggio, riportare immediatamente i reagenti inutilizzati alle rispettive temperature di conservazione. Prima dell'uso portare i reagenti ed i materiali a temperatura ambiente (15–30 °C).

INDICAZIONE DI INSTABILITÀ O DETERIORAMENTO DEI REAGENTI

Il concentrato per substrato può subire una variazione di colore che va dalla mancanza di colore a verde pallido o scuro. Questa condizione non influenza le prestazioni. Tuttavia, la soluzione per substrato appena preparata deve essere incolore oppure tendere al verde pallido. Un colore verde scuro indica che la soluzione per substrato preparata ha subito un deterioramento, pertanto è necessario eliminarla e preparare una nuova soluzione per substrato in un contenitore in vetro pulito.

L'intorbidamento o l'alterazione del colore della soluzione di lavaggio diluita indica un deterioramento del reagente. Se ciò accade, gettare la soluzione.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Manipolare e smaltire tutti i campioni seguendo le precauzioni generali.

I campioni di siero o plasma devono essere prelevati in modo sterile e preparati secondo tecniche standard per l'esame in laboratorio.¹⁰ Non inattivare i campioni a caldo. Eliminare qualunque particolare dai campioni eseguendo una centrifuga a bassa velocità prima di effettuare il test.

I campioni possono essere conservati nel ghiaccio, a circa 0 °C fino a 6 ore. Se è necessario conservare i campioni per un periodo maggiore, li si dovrà congelare ad una temperatura di -70 °C o inferiore (la conservazione a -20 °C può produrre risultati errati).

PREPARAZIONE DEL REAGENTE

Consultare la Tabella 1 per ottenere informazioni sulla quantità di soluzione per substrato e strisce per microscaggio necessarie in base al numero di test. Dopo avere prelevato i reagenti ed i materiali necessari, riportare gli elementi inutilizzati alle rispettive temperature di conservazione (fare riferimento alla sezione *CONSERVAZIONE*). Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i materiali per il saggio a temperatura ambiente (15–30 °C).

1. **Soluzione di lavaggio.** Miscelare la soluzione di lavaggio concentrata 20X capovolgendo il flacone diverse volte. Se la soluzione di lavaggio concentrata 20X è stata conservata a 2–8 °C, possono essersi formati dei cristalli. Per dissolvere i cristalli, scaldare il flacone a bagnomaria ad una temperatura di 37–50 °C fino allo scioglimento di tutti i cristalli, quindi miscelare completamente. Preparare la soluzione di lavaggio diluendo l'intero contenuto di un flacone di soluzione di lavaggio concentrata 20X fino a raggiungere un totale di un litro, con acqua distillata o deionizzata. Miscelare completamente. La soluzione di lavaggio è stabile per 30 giorni se conservata in un contenitore pulito a 2–8 °C. In caso di alterazione del colore o di intorbidamento, gettare il reagente.
2. **Selezione delle strisce per microscaggio.** Stabilire il numero di strisce per microscaggio necessarie per il saggio facendo riferimento alla Tabella 1. Togliere il fissatore di strisce dalla piastra montata. Togliere le strisce non necessarie e riporle nel contenitore di conservazione, risigillare il contenitore e riportarlo ad una temperatura di 2–8 °C. Fissare le strisce da usare nel saggio.

3. Diluizione dei campioni

Attenzione: tutti i campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infetto. Non utilizzare campioni inattivati a caldo o contaminati.

Determinare il numero (N) di campioni da esaminare. Etichettare le provette da 1 a N e registrare sulla scheda fornita la corrispondenza tra i campioni e le provette.

Preparare una diluizione di 1:50 di ogni campione usando il diluente per campioni di complemento (es. 10 µl di campione di test miscelato con 490 µl di diluente dei campioni per complemento). Miscelare completamente evitando la formazione di schiuma e bolle. Non conservare né riutilizzare i campioni diluiti.

4. **Aggiunta di campioni diluiti ai pozzetti di microtitolazione:** Per aggiungere dei campioni diluiti, degli standard, dei campioni di controllo e dei tamponi ai pozzetti è possibile utilizzare uno dei due metodi (fare riferimento alla fase 5 della sezione *PROCEDURA DEL SAGGIO*). In caso di piccole corse, in cui vengono esaminati solo pochi campioni, è possibile aggiungere i campioni diluiti e gli altri reagenti direttamente ai pozzetti assegnati tramite l'uso di una micropipetta (100 µl/pozzetto). In caso di corse piccole o grandi, ma soprattutto per corse di maggiori dimensioni, è opportuno utilizzare un pipettatore multicanale per l'aggiunta dei campioni come indicato di seguito. **(Il pipettatore multicanale può essere utilizzato anche per aggiungere comodamente il coniugato, il substrato e la soluzione bloccante).**

Al fine di caricare gli standard, i campioni di controllo e i campioni diluiti nei pozzetti per microscaggio nel modo più rapido consentito, è possibile adottare una procedura chiamata "replicazione delle piastre". Invece di aggiungere 100 µl di ogni standard, campione di controllo o diluito nei singoli pozzetti rivestiti con anticorpo, è possibile aggiungere 120–130 µl di ogni soluzione ai singoli pozzetti in una piastra vuota (non fornita) in base al tipo saggio immunoenzimatico finale desiderato. Dopo avere aggiunto tutte le soluzioni da esaminare nei pozzetti per microscaggio nella piastra vuota, trasferire rapidamente 100 µl da ogni pozzetto vuoto ai pozzetti rivestiti con anticorpo usando un micropipettatore multicanale. Per eliminare la possibilità di contaminazione crociata, è necessario sostituire le punte delle pipette ogni volta che cambia la composizione dei campioni da trasferire.

5. **CIC-Raji Confirmation Diluent (opzionale).** Se si desidera la conferma dei risultati positivi, determinare il numero (N) di campioni da confermare. Etichettare le provette da 1c a Nc e registrare. Preparare una diluizione di 1:50 usando il diluente per conferma CIC-Raji. Un campione diluito con diluente di conferma CIC-Raji deve essere esaminato **contemporaneamente** alla stessa diluizione del campione nel diluente per campioni di complemento.
6. **Preparazione della soluzione per substrato.** Preparare appena prima dell'uso. Determinare il volume necessario di soluzione per substrato conformemente alla Tabella 1 fornita di seguito. Preparare la soluzione per substrato aggiungendo 50 µl di concentrato per substrato ad ogni ml di diluente per substrato. Miscelare completamente.
7. **Controlli CIC.** I controlli positivi e negativi CIC-RCR sono disponibili separatamente presso Quidel (Controlli CIC-RCR codice A014). Essi devono essere preparati conformemente alle istruzioni contenute nei relativi inserti. Fare riferimento anche alla sezione *CONTROLLO DI QUALITÀ* contenuta in questo inserto.

TABELLA 1
REQUISITI DEL SAGGIO

Pozzetti ¹	Strisce da 8 pozzetti	Soluzione per substrato necessaria (ml)	Diluente per substrato (ml)	Concentrato per substrato (µl)
16	2	1,6	2,0	100
24	3	2,4	3,0	150
32	4	3,2	4,0	200
40	5	4,0	5,0	250
48	6	4,8	5,0	250
56	7	5,6	6,0	300
64	8	6,4	7,0	350
72	9	7,2	8,0	400
80	10	8,0	9,0	450
88	11	8,8	9,0	450
96	12	9,6	10,0	500

¹ Determinare il numero di campioni da esaminare ed aggiungere undici (11) pozzetti per i tre standard, nonché per i controlli inferiore e superiore da esaminare (tutti in duplicato) ed un pozzetto vuoto. Se possibile, si consiglia di esaminare gli standard ed i controlli in duplicato in strisce per microscaggio separate.

PROCEDURA DEL SAGGIO

Prima di iniziare il saggio, leggere completamente l'inserto fornito con il prodotto.

Prima di procedere, fare riferimento alle sezioni *PREPARAZIONE DEL REAGENTE E AVVERTENZE E PRECAUZIONI*.

1. Registrare le posizioni dei pozzetti per microsaggio corrispondenti ai pozzetti vuoti, tutti i campioni per test, gli standard ed i controlli nonché i numeri di lotto indicati sulle etichette delle fiale. Etichettare un angolo della piastra per microsaggio al fine di stabilirne l'orientamento.
2. Preparare le strisce per microsaggio come indicato di seguito:
 - a. Reidratare i pozzetti per microsaggio aggiungendo circa 300 µl di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto usando un flacone di lavaggio o un altro dispositivo di riempimento.
 - b. Incubare a temperatura ambiente (15–30 °C) per 1–2 minuti.
 - c. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto.
 - d. Capovolgere la piastra e picchiettare energicamente due volte sulla carta assorbente per eliminare eventuali residui di liquido. Evitare che i pozzetti si asciughino.
3. Aggiungere 100 µl di diluente per campioni di complemento nei pozzetti che verranno usati per confronto con il vuoto del lettore delle piastre.
4. Aggiungere 100 µl di ciascuno standard CIC-Raji (A, B e C) nei pozzetti duplicati.
5. Aggiungere 100 µl di ciascun campione diluito nel pozzetto per microsaggio assegnato. Fare riferimento alla fase 4 della sezione *PREPARAZIONE DEL REAGENTE*.
6. Incubare a temperatura ambiente (15–30 °C) per 60 ± 1 minuti.
7. Lavare i pozzetti per microsaggio come indicato di seguito:
 - a. Dopo l'incubazione descritta alla fase 6 (e nella seguente fase 9), rimuovere il liquido da ogni pozzetto.
 - b. Aggiungere circa 300 µl di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto usando un flacone di lavaggio o un altro dispositivo di riempimento.
 - c. Incubare i pozzetti per 1 minuto a temperatura ambiente (15–30 °C).
 - d. Rimuovere il liquido da ogni pozzetto.
 - e. Aggiungere a ciascun pozzetto 300 µl di soluzione di lavaggio.
 - f. Rimuovere il liquido da ogni pozzetto.
 - g. Ripetere le fasi e–f per altre tre volte.
 - h. Dopo il quinto ciclo di lavaggio, capovolgere la piastra e picchiettare energicamente due volte sulla carta assorbente per eliminare eventuali residui di liquido.
8. Utilizzando una pipetta multicanale o a ripetizione, dispensare 50 µl di coniugato CIC-Raji in ogni pozzetto di test lavato, compresi i pozzetti vuoti.
9. Incubare le strisce per microsaggio a temperatura ambiente (15–30 °C) per 30 ± 1 minuti. **Durante questo periodo di incubazione, preparare la soluzione per substrato (fare riferimento alla fase 6 della sezione *PREPARAZIONE DEL REAGENTE*).**
10. Trascorso il periodo di incubazione di 30 minuti descritto alla fase 9, lavare i pozzetti per microsaggio come descritto alla fase 7.
11. Immediatamente dopo il lavaggio, usare una pipetta multicanale o a ripetizione per dispensare 100 µl della soluzione per substrato appena preparata in ciascun pozzetto, compresi quelli vuoti.
12. Incubare le strisce per microsaggio a temperatura ambiente (15–30 °C) per 30 ± 1 minuti.
13. Utilizzando una pipetta multicanale o a ripetizione, aggiungere in ciascun pozzetto 50 µl di soluzione bloccante per arrestare la reazione enzimatica. La soluzione bloccante deve essere aggiunta nei pozzetti secondo lo stesso ordine e lo stesso tasso della soluzione per substrato. Picchiettare delicatamente sulla piastra per spargere lo sviluppo del colore in modo uniforme.

14. Determinare la lettura dell'assorbanza a 405 nm (valore A_{405}) per ogni pozzetto di test entro un'ora dall'aggiunta della soluzione bloccante (fase 13), effettuando una correzione in base ai vuoti, conformemente al sistema spettrofotometrico in uso.
15. Conservare il supporto e il fissatore per strisce per uso futuro.
16. Smaltire i residui di campioni diluiti, di substrato e le strisce per microsaggio usate (fare riferimento alla fase 3 della sezione *AVVERTENZE E PRECAUZIONI*). Conservare il supporto e il fissatore per strisce per uso futuro.

METODO DI CONFERMA CONSIGLIATO

Se è necessaria una conferma indipendente di un risultato positivo, o se un risultato positivo non è coerente con l'interpretazione clinica, il campione positivo può essere nuovamente esaminato utilizzando un test di conferma. Non è possibile confermare un risultato negativo. Il metodo di conferma utilizza un diluente per campioni (CIC-Raji Confirmation Diluent) contenente anticorpi di frammenti C3 anti-umani. Per confermare un risultato positivo, è necessario diluire un'aliquota del campione nel CIC-Raji Confirmation Diluent e, allo stesso modo, diluire una seconda aliquota nel diluente per campioni di complemento. Entrambi i campioni vengono esaminati conformemente al normale saggio immunoenzimatico Quidel CIC-Raji Cell Replacement. Per ulteriori informazioni, fare riferimento alle sezioni *PREPARAZIONE DEL REAGENTE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI*.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Conformemente ad una buona pratica di laboratorio, è opportuno includere i controlli positivi e negativi nell'attività giornaliera. A tale scopo, i controlli per il saggio Quidel CIC-Raji Cell Replacement sono disponibili presso Quidel (controlli CIC-RCR, codice **A014**) e devono essere utilizzati conformemente ai rispettivi inserti. Se i controlli positivi e/o negativi non funzionano come previsto, contattare immediatamente il servizio di assistenza tecnica Quidel.

Oltre ai controlli, il saggio Quidel CIC-Raji Cell Replacement fornisce anche un *METODO DI CONFERMA CONSIGLIATO* ed i parametri di *CONVALIDA*.

Utilizzando i controlli, gli standard con convalida ed il metodo di conferma, si dovrebbe ottenere un risultato riproducibile e accurato.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolo dei risultati

Calcoli: La curva standard viene generata usando il valore A_{405} da cui è stato sottratto quello vuoto di ogni standard CIC-Raji sull'asse y rispetto ai microgrammi assegnati di equivalenti di gamma globuline trattate con siero, aggregate a caldo/ml (µg Eq/ml) indicati sull'etichetta della fiala per ogni standard sull'asse x. Al termine della regressione lineare, la curva standard generata deve soddisfare i requisiti di convalida (vedere di seguito). Le concentrazioni di campione vengono quindi calcolate direttamente dalla curva standard. La maggior parte dei computer e delle calcolatrici è in grado di eseguire tali calcoli.

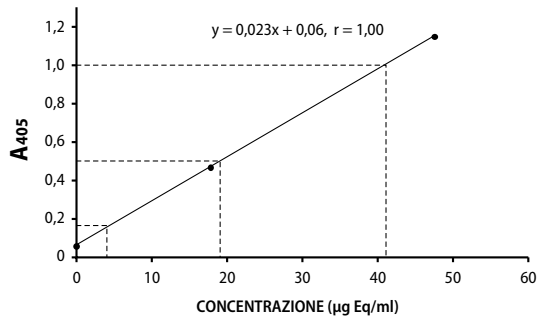
In alternativa, i dati possono essere tracciati manualmente ed i valori (µg Eq/ml) dei campioni di test possono essere letti direttamente dalla linea best-fit della curva standard. Un esempio di curva standard tipica è mostrato in Figura 1.

Calcolo del test di conferma: Per confermare un risultato positivo, la concentrazione di immunocomplesso [CIC] determinata nel campione diluito nel diluente di conferma CIC-Raji viene divisa per la concentrazione dell'immunocomplesso misurata nel campione diluito nel diluente per campioni di complemento in modo da ottenere il seguente rapporto:

$$\text{rapp.} = \frac{[\text{CIC}] \text{ in diluente di conferma CIC-Raji}}{[\text{CIC}] \text{ in diluente per camp. di complem.}}$$

Esempio di curva standard

FIGURA 1



Campione	A ₄₀₅	µg Eq/ml
Standard A	0,06	0
Standard B	0,46	18
Standard C	1,15	48
Campione 1	0,15	3,9
Campione 2	0,50	19,1
Campione 3	1,00	40,9
r = 1,00	m = 0,023	b = 0,06

Convalida

Determinare la pendenza, l'intersezione e il coefficiente di correlazione della linea best-fit derivata. I valori devono essere compresi negli intervalli specificati per qualificare il saggio:

Coefficiente di correlazione (r):	> 0,95
Pendenza (m):	da 0,013 a 0,034
Intersezione y (b):	da (-)0,07 a (+)0,10

Soggetti più normali mostrano livelli misurabili di CIC. Poiché non esiste alcun livello anormale accettato di CIC, l'utente deve definire internamente i livelli normali. Come direttiva, di seguito sono indicati i livelli di CIC basati sui risultati ottenuti dalle normali popolazioni descritte nella sezione **RISULTATI ATTESI**:

Risultati normali: I valori inferiori o uguali a 15 µg Eq/ml vengono considerati normali per i livelli di CIC.

Risultati anormali: I valori maggiori o uguali a 20 µg Eq/ml vengono considerati anormali per i livelli di CIC. I campioni le cui concentrazioni di CIC misurate sono maggiori dello Standard C CIC-Raji devono essere considerati maggiori della concentrazione Standard C CIC-Raji assegnata indicata sull'etichetta della fiala.

Valori equivoci: i valori maggiori di 15 µg Eq/ml e inferiori a 20 µg Eq/ml sono equivoci. Se necessario, esaminare nuovamente questi campioni oppure prelevare un nuovo campione e sottoporlo a test. Se un campione equivoco fornisce nuovamente valori equivoci, il campione è da considerarsi significativamente superiore al normale e può essere considerato anormale.

Risultati di conferma: se il rapporto è inferiore a 0,5, il risultato CIC positivo è confermato. In altri termini, una riduzione maggiore del 50 % nella concentrazione CIC apparente conferma un risultato positivo.

Talvolta i campioni positivi potranno non essere confermati. La mancata conferma dei campioni può dipendere dai seguenti motivi: (1) campioni trattati erroneamente (es. contaminati o inattivati a caldo) oppure (2) campioni contenenti anticorpi IgG umani che si legano a IgG di topo. Tali campioni non sono tuttavia necessariamente negativi per il CIC. Il materiale che causa il risultato falso positivo apparente può mascherare dei CIC concomitanti che, se presenti da soli, fornirebbero un risultato CIC positivo confermabile.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Questo test misura gli immunocomplessi o gli aggregati di IgG umani contenenti frammenti di attivazione C3. È pertanto necessario evitare il verificarsi delle condizioni che promuovono l'aggregazione di IgG o l'attivazione del complemento durante il prelievo e l'elaborazione dei campioni.

RISULTATI ATTESI

Cinquanta (50) sieri selezionati sono stati ottenuti da un laboratorio di riferimento che riceve campioni da tutti gli Stati Uniti. Tali sieri sono stati esaminati tramite saggio immunoenzimatico Quidel CIC-Raji Cell Replacement e tramite saggio Raji Cell del laboratorio di riferimento. Si è ottenuta una concordanza del 92 % tra i due saggi per la misurazione della presenza di CIC.

I sieri ottenuti da sessantadue (62) pazienti affetti da SLE presso due cliniche nell'est degli Stati Uniti e da ventinove (29) pazienti affetti da RA presso una clinica reumatologica nel sud degli Stati Uniti sono stati esaminati tramite saggio immunoenzimatico Quidel CIC-Raji Cell Replacement. Inoltre, sono stati esaminati i sieri provenienti da ventisei (26) soggetti normali sani presso i due siti SLE e da venticinque (25) pazienti clinicamente non autoimmuni con riferimento alla clinica reumatologica. Le Figure 2, 3 e 4 mostrano le concentrazioni medie di CIC, le deviazioni standard e la distribuzione di frequenza per ogni popolazione.

Fig. 2, SAGGIO IMM. CIC-RAJI CELL REPLACEMENT
Popolazione affetta da lupus eritematoso sistemico

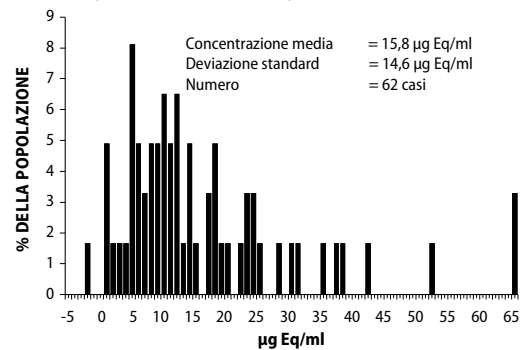


Fig. 3, SAGGIO IMM. CIC-RAJI CELL REPLACEMENT
Popolazione affetta da artrite reumatoide

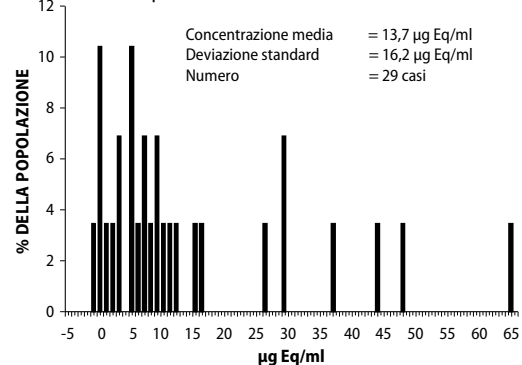
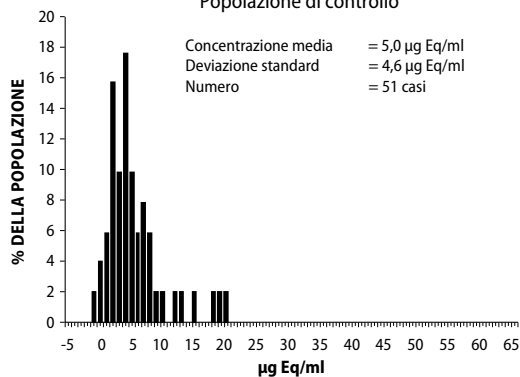


Fig. 4, SAGGIO IMM. CIC-RAJI CELL REPLACEMENT
Popolazione di controllo



All'interno di un sito SLE e del sito RA, il grado di attività della malattia è stato assegnato indipendentemente da qualunque dato di laboratorio CIC. Questa valutazione è stata effettuata da un medico. Al fine di garantire una refertazione coerente, presso ogni sito un medico ha successivamente revisionato i dati sul paziente ed assegnato l'attività della malattia. Un paziente affetto da RA è stato descritto come "esaurito" all'ultimo stadio. Il risultato CIC di questo paziente era di 1 µg Eq/ml. Poiché non vi erano altri pazienti simili affetti da RA, questo risultato individuale non è stato inserito nella Tabella 2. La Tabella 2 mostra il rapporto osservato tra il CIC misurato tramite saggio immunoenzimatico Quidel CIC-Raji Cell Replacement e l'attività della malattia dei pazienti.

TABELLA 2
RISULTATI DEL SAGGIO CIC-RAJI CELL REPLACEMENT CONFRONTATI
CON L'ATTIVITÀ DELLA MALATTIA

	% Anormale ¹		
	Attività bassa	Attività moderata	Attività elevata
SLE	8 % (1/12)	36 % (4/11)	79 % (11/14)
RA	0 % (0/4)	19 % (3/16)	50 % (4/8)

¹ All'interno delle parentesi (dopo ogni % anormale) viene indicato il numero di pazienti con test anormale diviso per il numero di pazienti classificati in base alla particolare attività della malattia.

CARATTERISTICHE DEL METODO

Precisione

Per la standardizzazione del saggio è stato usato uno standard per immunocomplesso fornito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), cioè complessi tossoide tetanico e tossoide anti-tetanico pre-incubati in siero umano normale appena preparato. Per testare l'accuratezza del saggio sono state esaminate cinque diluizioni dello standard OMS in triplicato, in nove corse tramite il kit Quidel.

Le concentrazioni esaminate hanno mostrato una correlazione pari a 0,99 con i valori noti.

Riproducibilità

I campioni dei pazienti e gli standard per kit sono stati sottoposti a nove corse in due diversi lotti di kit. Ognuno di essi è stato testato in triplice copia durante ciascuna corsa. La variazione media tra ciascuna corsa per i campioni e gli standard per kit viene mostrata nella Tabella 3 come variazione tra un saggio e l'altro. La variazione media all'interno di ciascuna corsa per i campioni e gli standard per kit viene mostrata nella Tabella 3 come variazione all'interno dello stesso saggio.

TABELLA 3
RIPRODUCIBILITÀ DEL SAGGIO

	Media (µg Eq/ml)	Intra-analisi (% CV)	Intra-analisi (% CV)
Campione 1	56	5	9
2	13	9	23
Standard 1	4	8	30
2	11	7	15
3	23	5	9
4	32	4	6
5	40	5	6
6	48	4	5
7	59	3	4

Sensibilità

Il saggio immunoenzimatico Quidel CIC-Raji Cell Replacement misura almeno 4 µg Eq/ml o un valore maggiore di analite CIC basato sul confronto con lo standard OMS.

Specificità

I cinquantuno (51) sieri di controllo descritti nella sezione *RISULTATI DEL CAMPIONE* sono stati esaminati tramite il saggio Quidel CIC-Raji Cell Replacement. Solo tre erano positivi (ripetutamente maggiori di 15 µg Eq/ml), producendo una specificità del 94 %.

ASSISTENZA

Per emettere un ordine oppure per ricevere assistenza tecnica, contattare un funzionario Quidel al numero verde +1 408-616-4301, dal lunedì al venerdì, dalle 8:00 alle 17:00, ora degli stati del Pacifico. È possibile trasmettere gli ordini anche per fax al numero +1 408-616-4310.

Per servizi al di fuori degli Stati Uniti, contattare il distributore locale.

RÉCAPITULATIF DES ÉTAPES DE L'ESSAI

Lire la notice produit dans son intégralité avant de commencer l'essai.

Préparations préliminaires

1. Préparer la solution de lavage.
2. Diluer les échantillons à analyser.

Procédé de l'essai

3. Réhydrater les puits de micro-essai.
4. Ajouter 100 µl de diluant de l'échantillon de complément dans le(s) puits vide(s).
5. Ajouter 100 µl de chaque échantillon étalon et à analyser dans les puits appropriés.
6. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante (15–30 °C).
7. Laver 5 fois les puits de micro-essai.
8. Ajouter 50 µl de conjugué de CIC-Raji dans chacun des puits de test.
9. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante. (Préparer la solution de substrat pendant l'incubation).
10. Laver 5 fois les puits de micro-essai.
11. Ajouter 100 µl de solution de substrat dans chaque puits de test.
12. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
13. Ajouter 50 µl de solution d'arrêt dans chaque puits de test.
14. Mesurer l'absorbance à 405 nm en 60 minutes.

Calculs

15. Incrire les indicateurs d'absorbance et de concentration des échantillons étalon sur le papier millimétré fourni, ou entrer ces données dans un calculateur pour procéder à l'analyse par régression linéaire.
16. Lire les concentrations de l'échantillon à analyser directement sur le graphique ou exécuter la manipulation requise avec le calculateur pour obtenir les concentrations de l'échantillon.

APPLICATION

L'essai immunoenzymatique de remplacement des cellules CIC-Raji de Quidel porte sur la quantification des complexes immuns contenant des fragments d'activation du C3 dans le sérum et le plasma humains.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

L'importance des complexes immuns circulants (CIC) et leur lien avec diverses maladies font l'objet de recherches depuis plusieurs années. La formation de complexes immuns est un processus de protection continu, généralement bénin, effectué par un système immunitaire fonctionnant normalement. Dans un hôte normal, les CIC sont retirés de la circulation sous les effets de plusieurs processus biochimiques, enzymatiques et cellulaires complexes. La clairance effective de nombreux CIC requiert l'activation du complément. L'activation du complément entraîne un dépôt des fragments du C3 dans le complexe immunitaire suivi par une élimination accrue par les phagocytes du système réticuloendothélial. Dans le cas de certaines maladies, qui ne sont pas complètement comprises, les complexes immuns peuvent ne pas être éliminés efficacement de l'organisme. Dans ces maladies, les complexes immuns peuvent s'accumuler et provoquer des lésions de certains organes et tissus liés au complément. Cette activation du complément peut entraîner une série d'événements potentiellement destructeurs au niveau de l'hôte, notamment la production d'anaphylatoxine, la lyse de cellules, la stimulation de leucocytes, et l'activation de macrophages et d'autres cellules.¹ Lorsque les complexes immuns viennent se fixer sur les parois vasculaires ou les membranes cellulaires, une destruction de tissu sain peut se produire, comme dans certains cas de glomérulonéphrite.

Certaines caractéristiques des CIC influent sur leur pathogénicité potentielle. Les éléments les plus importants sont : (1) la nature, la taille et la concentration de l'antigène ; (2) la nature, la taille et la concentration de l'anticorps ; et (3) le taux de formation et de clairance des complexes immuns.^{1,2}

Les complexes immuns circulants ont été mesurés dans différentes conditions : infections, troubles auto-immuns, traumatismes, et maladies néoplasiques prolifératives, par exemple. Les études actuelles suggèrent que la détermination des CIC peut être importante dans l'évaluation de certaines maladies et, parfois, dans le contrôle de l'efficacité du traitement. C'est particulièrement vrai dans les cas de lupus érythémateux disséminé (LED) et pour certaines formes d'arthrite rhumatoïde.^{3,4} Le premier stade de la maladie lié à la formation de complexes immuns est une atteinte sévère, décrite au début du XXe siècle par von Pirquet.

Depuis cette époque, des taux élevés de CIC ont été constatés dans les cas de maladies auto-immunes (lupus érythémateux disséminé, syndrome lié au lupus érythémateux disséminé, arthrite rhumatoïde), glomérulonéphrite, maladies néoplasiques (maladie de Hodgkin, leucémie), infections bactériennes (endocardite bactérienne subaiguë, lèpre), infections parasitaires (paludisme, bilharziose) et infections virales (hépatite, mononucléose).

Plus de 40 techniques d'analyse de détection ou de quantification des CIC ont été mises au point. Ces tests, qui comprennent notamment le test utilisant les cellules Raji, le test d'écart du C1q, le test de la conglutinine, les procédés de fixation du C1q en phase fluide, le test du facteur rhumatoïde, le test de la précipitine du PEG, et les essais du C1q en phase solide ont été décrits.^{1,5} Étant donné que la taille et les propriétés physicochimiques des CIC varient considérablement, aucun de ces essais n'a été accepté comme norme. Une étude collaborative menée sous l'égide de l'Organisation mondiale de la Santé en 1978 a montré qu'aucune de ces méthodes n'était adaptée à tous les stades de la maladie suspectée, et a recommandé de recourir à au moins deux méthodes d'essais différentes pour détecter et quantifier les CIC.

PRINCIPE DU PROCÉDÉ

Les fragments du troisième composant du complément, C3, se lient souvent de manière covalente aux complexes immuns activant le complément. Les cellules Raji, issues d'une lignée de cellules en culture continue de lymphocytes B, portent des récepteurs du complément CR2 qui se lient aux fragments iC3b, C3d,g et C3d du C3 activé.^{6,7,8} L'essai Raji Cell CIC est basé sur la capacité des récepteurs CR2 des cellules Raji à se lier aux complexes immuns contenant ces fragments du C3.⁶ L'essai immunoenzymatique de remplacement des cellules CIC-Raji de Quidel permet également de quantifier les fragments du C3 contenant des CIC en utilisant un anticorps monoclonal immobilisé qui se lie spécifiquement aux fragments d'activation iC3b, C3d,g et C3d du C3 de manière analogue à la réaction de liaison des CR2 des cellules Raji.

Lors de la première étape, les échantillons étalon et les échantillons plasmatiques ou sériques dilués dans le diluant de l'échantillon de complément sont ajoutés dans les puits de micro-essai enduits d'anticorps monoclonaux aux fragments du C3 humain, puis incubés. Pendant cette incubation, les complexes immuns contenant des fragments d'activation du C3 sont capturés par l'anticorps en phase solide. Après incubation, les protéines sériques ou plasmatiques non liées sont éliminées au cours d'un cycle de lavage.

Lors de la deuxième étape, des IgG antihumaines de souris conjuguées à de la peroxydase de raifort (HRP) sont ajoutées dans chacun des puits de test et incubées. Pendant cette incubation, le conjugué se lie aux complexes immuns qui sont désormais liés aux puits de micro-essai. Le conjugué non lié est éliminé au cours d'un cycle de lavage.

Au cours de la troisième étape, un substrat enzymatique est ajouté dans chaque puits de micro-essai. La réaction du conjugué anticorps-HRP avec le substrat chromogénique se traduit par une coloration verte. Après incubation, on ajoute un réactif pour arrêter la propagation de la coloration.

L'absorbance des échantillons étalon et à analyser (valeurs A_{405}) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'intensité de la coloration verte qui apparaît est proportionnelle à la quantité de CIC se liant à la phase solide. On obtient une courbe étalon en reliant les valeurs A_{405} obtenues pour chaque échantillon étalon à sa concentration indiquée. On détermine la concentration de complexes immuns présents dans l'échantillon à analyser en se référant à la courbe étalon. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalents gammaglobuline humaine agrégée par la chaleur et traitée par sérum par ml ($\mu\text{g Eq/ml}$). Afin de confirmer la présence de CIC, l'échantillon peut être analysé après dilution dans du diluant de confirmation CIC-Raji, qui contient des anticorps bloquants dont les spécificités sont similaires à l'anticorps immobilisé sur le puits de micro-essai.

RÉACTIFS ET MATÉRIAUX FOURNIS

Le kit d'essai immunoenzymatique CIC-Raji Cell contient les éléments suivants :

- | | | | |
|----------|--|-------------------------|------------------------|
| A | Des échantillons étalon CIC-Raji | Réf. A9513–A9515 | 1 chacun x 2 ml |
| B | Chacun d'entre eux contient une quantité connue de gammaglobuline humaine agrégée par la chaleur | | |
| C | et traitée par sérum dans une PBS, 2,5 % de stabilisants, et 0,01 % de thimérosal. | | |
-
- | | | | |
|----------|--|-------------------|------------------|
| 1 | Plaque de micro-essai | Réf. A9512 | 12 chacun |
| | de 96 puits avec portoir et support composé de bandes de huit puits enduites de fragments de C3 anti-humain de souris dans une poche d'aluminium refermable. | | |
| 2 | Solution d'arrêt | Réf. A3673 | 6 ml |
| | Contient 250 mM d'acide oxalique. | | |

- | | | | |
|----------|--|-------------------|--------------------------|
| 3 | Concentré de solution de lavage 20X | Réf. A3674 | 2 flacons x 50 ml |
| | Après dilution, chacun contient une solution saline de tampon phosphate (PBS), 0,05 % de Tween-20 [™] , et 0,01 % de thimérosal. | | |
| 4 | Diluant de l'échantillon de complément | Réf. A3670 | 50 ml |
| | Contient de la PBS, 2,5 % de stabilisants, 0,035 % de ProClin [®] 300. | | |
| 5 | Diluant du substrat | Réf. A3672 | 25 ml |
| | Contient 0,1 M de tampon citrate et 0,05 % d' H_2O_2 . | | |
| 6 | Concentré de substrat | Réf. A3671 | 1,5 ml |
| | Contient 0,7 % de 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) et du sel de diammonium. | | |
| 7 | Conjugué CIC-Raji | Réf. A9516 | 2 flacons x 3 ml |
| | Contient des IgG anti-humaine (de souris) conjuguées à de la peroxydase en suspension dans un tampon stabilisant de HRP contenant un conservateur. | | |
| 8 | Diluant de confirmation CIC-Raji | Réf. A9517 | 2 flacons x 12 ml |
| | Contient de la PBS, 2,5 % des stabilisants, un anticorps anti-fragment C3 humain, et 0,035 % du ProClin 300. | | |

Tween-20[™] est une marque d'Atlas Chemical Industries, Inc.
ProClin[®] est une marque de Rohm and Haas Company

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Minuterie (60 minutes)

Calculateur, ou tout autre équipement informatique permettant de valider l'essai

Plaques de micro-essai et/ou tubes à essais et supports de tests propres et non utilisés

Récipient pour dilution de tampon de lavage

Flacon de lavage ou tout autre système de lavage adapté aux dosages immunologiques

Pipettes multi-canaux réglables (8 ou 12 canaux) ou micropipettes automatisées (en option)

Pipettes propres de 1 ml, 5 ml et 10 ml

Embouts de micropipettes et de pipettes

Lecteur de plaque capable de mesurer la densité optique A_{405} entre 0,0 et 2,0

Eau déionisée ou distillée

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Pour utilisation diagnostique *in vitro*.
- Suivre les précautions standard lors de la manipulation du contenu de ce kit et de tous les échantillons de patients.
- Éliminer les récipients et leur contenu inutilisé conformément aux dispositions réglementaires nationales et locales.
- Utiliser les réactifs fournis en une seule livraison avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Stocker les réactifs de l'essai selon les indications.
- Ne pas effleurer ni toucher le fond des puits en ajoutant ou en aspirant des liquides.
- Le fait de ne pas appliquer les durées et températures d'incubation indiquées dans le procédé est susceptible de conduire à des résultats erronés.
- Ne pas laisser sécher les puits de micro-essai une fois que l'essai a commencé.
- Ne pas réutiliser un puits de micro-essai pour un deuxième test.
- L'utilisation de pipettes multi-canaux ou de robots pipetteurs est recommandée pour assurer la distribution rapide des réactifs.
- Pour une mesure exacte des échantillons, ajouter les échantillons et les solutions étalon avec précision. Pipetter avec soin, en utilisant uniquement un équipement étalonné.
- Cet essai peut être effectué avec n'importe quelle méthode de lavage validée.
- Il est essentiel de prélever et de conserver les échantillons avec soin pour obtenir des résultats corrects.
- Éviter toute contamination microbienne ou croisée des échantillons, des réactifs et du matériel. En cas de contamination, des résultats inexacts pourraient être obtenus.

- Le thimérosal est utilisé comme conservateur. Tout contact ou toute ingestion accidentelle de tampons ou de réactifs contenant du thimérosal peut provoquer des réactions d'hypersensibilité, notamment une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Consulter un médecin en cas d'observation de ces symptômes. L'exposition au thimérosal est susceptible de provoquer des effets mutagènes. Éviter tout contact avec des bases ou des acides forts.
- Le ProClin® 300 est utilisé comme conservateur. Tout contact ou toute ingestion accidentelle de tampons ou de réactifs contenant du Proclin peut provoquer une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Le respect des bonnes pratiques de laboratoire permet de réduire l'exposition. Consulter un médecin en cas d'observation de ces symptômes.
- Le concentré de substrat est photosensible. Éviter toute exposition prolongée à la lumière directe ou indirecte. Conserver les réactifs dans l'obscurité lorsqu'ils ne sont pas utilisés.
- Afin d'éviter la production d'aérosols pendant le lavage, utiliser un appareil pour aspirer le liquide de lavage et le déverser directement dans un flacon contenant de l'eau de Javel.
- Des échantillons inactivés par la chaleur, hyperlipémiqes ou contaminés, peuvent entraîner des résultats erronés.

CONSERVATION

Conserver les kits non ouverts entre 2 et 8 °C. Après ouverture du kit, le concentré de solution de lavage 20X peut être conservé entre 2 et 30 °C.

Après avoir choisi les réactifs ou les produits à utiliser pour l'essai, replacer immédiatement les réactifs non utilisés à une température de conservation appropriée. Amener les réactifs et produits de l'essai à température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant utilisation.

SIGNES D'INSTABILITÉ ET DE DÉTÉRIORATION DES RÉACTIFS

La couleur du concentré de substrat peut aller du transparent au vert pâle à foncé. Cela n'altère pas ses performances. Cependant, la solution de substrat qui vient d'être préparée doit être transparente à vert pâle. Une coloration vert foncé indique une détérioration de la solution de substrat ; celle-ci doit alors être jetée et une nouvelle solution de substrat préparée dans un récipient en verre propre.

Toute turbidité ou décoloration de la solution de lavage indique une détérioration du réactif. Le cas échéant, la solution doit être jetée.

PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Manipuler et éliminer tous les échantillons en suivant les précautions standard.

Les échantillons sériques ou plasmatiques doivent être prélevés dans des conditions d'asepsie et préparés suivant les techniques standard pour les tests en laboratoire d'analyse.¹⁰ Ne pas inactiver les échantillons par la chaleur. Avant le test, toute particule doit être éliminée des échantillons par centrifugation à faible vitesse.

Les échantillons peuvent être stockés sur de la glace, à environ 0 °C pendant 6 heures maximum. Si les échantillons sont conservés pendant plus longtemps, il faut les congeler à -70 °C minimum (le stockage à -20 °C peut entraîner des résultats erronés).

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Se référer au Tableau 1 pour connaître les quantités de solution de substrat et le nombre de bandes nécessaires pour un nombre donné de tests. Après avoir choisi les réactifs et les matériaux nécessaires, replacer immédiatement les produits inutilisés aux températures de conservation appropriées (voir la partie CONSERVATION). Amener tous les réactifs et matériaux de l'essai à température ambiante (de 15 à 30 °C) avant utilisation.

- Solution de lavage.** Mélanger le concentré de solution de lavage 20X en retournant plusieurs fois le flacon. Si le concentré de solution de lavage 20X a été conservé entre 2 et 8 °C, il est possible que des cristaux se soient formés. Pour les dissoudre, réchauffer le flacon au bain-marie entre 37 et 50 °C jusqu'à dissolution complète, puis bien mélanger. Préparer la solution de lavage en diluant tout le contenu d'un flacon de concentré de solution de lavage 20X avec de l'eau distillée ou déionisée jusqu'à obtention d'un litre de produit. Bien mélanger. La solution de lavage reste stable pendant 30 jours quand elle est conservée dans un récipient propre entre 2 et 8 °C. Si le réactif devient trouble ou se décolore, il doit être jeté.
- Sélection des bandes de micro-essai.** Déterminer le nombre de bandes requis pour l'essai en consultant le Tableau 1. Retirer le support pour bandes de la plaque assemblée. Remettre les bandes inutilisées dans le sac de conservation refermé, et le stocker entre 2 et 8 °C. Fixer solidement les bandes utilisées pour l'essai.

3. Dilution de l'échantillon.

Avertissement : Manipuler tous les échantillons comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur ou contaminés.

Déterminer le nombre (N) d'échantillons à analyser. Numéroté les tubes à essai de 1 à N et noter quel échantillon correspond à chaque tube sur la fiche technique fournie.

Préparer une solution diluée à 1:50 de chaque échantillon à l'aide de diluant de l'échantillon de complément (ex. : 10 µl d'échantillon de test mélangé avec 490 µl de diluant de l'échantillon de complément). Bien mélanger, mais éviter de faire de la mousse et des bulles. Ne pas conserver ni réutiliser les échantillons dilués.

- Ajout d'échantillons dilués dans les puits de microtitrage.** Il existe deux méthodes pour ajouter le tampon et les échantillons dilués, étalon et de contrôle dans les puits (voir étape 5 de la partie PROCÉDÉ DE L'ESSAI). Lors de tests d'ampleur limitée pour lesquels seuls quelques échantillons sont testés, les échantillons dilués et les autres réactifs peuvent être ajoutés directement dans les puits qui leur ont été attribués à l'aide d'une micropipette (100 µl/puits). Pour les analyses de faible et de grande ampleur, mais en particulier pour ces dernières, nous recommandons d'utiliser une pipette multi-canaux pour ajouter les échantillons comme indiqué ci-après. **(Une pipette multi-canaux peut également servir à ajouter facilement le conjugué, le substrat et la solution d'arrêt.)**

Afin de verser les échantillons étalon, de contrôle et dilués dans les puits de micro-essai le plus rapidement possible, on peut utiliser la « technique des répliques ». Au lieu d'ajouter 100 µl de chacun des trois types d'échantillons dans les puits enduits d'anticorps un par un, il est possible d'ajouter entre 120 et 130 µl de chaque solution dans les différents puits d'une plaque vide (non fournie) correspondant au schéma d'essai immunoenzymatique souhaité. Une fois que toutes les solutions à analyser ont été versées dans les puits de micro-essai de la plaque vide, transvaser rapidement 100 µl de chaque puits vide dans les puits enduits d'anticorps, à l'aide d'une micropipette multi-canaux. Pour éviter toute contamination croisée, les embouts des pipettes doivent être changés à chaque fois que la composition des échantillons à transvaser change.

- Diluant de confirmation CIC-Raji (en option).** Si l'on souhaite une confirmation des résultats positifs, déterminer le nombre (N) d'échantillons devant être confirmés. Numéroté les tubes à essai de 1c à Nc et les enregistrer. Préparer la dilution à 1:50 en utilisant le diluant de confirmation CIC-Raji. L'échantillon dilué dans le diluant de confirmation CIC-Raji doit être analysé **en même temps** que l'échantillon dilué dans le diluant d'échantillon de complément.
- Préparation de solution de substrat.** À préparer juste avant l'utilisation. Déterminer le volume de solution de substrat requis à l'aide du Tableau 1 ci-après. Préparer la solution de substrat en ajoutant 50 µl de concentré de substrat pour chaque ml de diluant de substrat. Bien mélanger.
- Contrôles CIC.** Les contrôles CIC-RCR positifs et négatifs sont vendus séparément par Quidel (Contrôles CIC-RCR Réf. catalogue A014). Ils doivent être préparés conformément aux instructions de la notice produit. Voir également la partie CONTRÔLE QUALITÉ de cette notice.

TABLEAU 1
MATÉRIEL ET QUANTITÉS NÉCESSAIRES POUR L'ESSAI

Puits ¹	Bandes de 8 puits	Solution de substrat nécessaire (ml)	Diluant de substrat (ml)	Concentré de substrat (µl)
16	2	1,6	2,0	100
24	3	2,4	3,0	150
32	4	3,2	4,0	200
40	5	4,0	5,0	250
48	6	4,8	5,0	250
56	7	5,6	6,0	300
64	8	6,4	7,0	350
72	9	7,2	8,0	400
80	10	8,0	9,0	450
88	11	8,8	9,0	450
96	12	9,6	10,0	500

¹ Déterminer le nombre d'échantillons à analyser, et ajouter onze (11) puits pour les trois échantillons étalon et les échantillons de contrôle haut et bas à analyser (en double), ainsi qu'un puits vide. Il est conseillé de tester les échantillons étalon et de contrôle en double, sur d'autres plaques de micro-essai si possible.

PROCÉDÉ DE L'ESSAI

Lire la notice produit dans son intégralité avant de commencer l'essai.

Voir les parties *PRÉPARATION DES RÉACTIFS* et *AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS* avant de poursuivre.

1. Noter les emplacements de puits de micro-essai correspondant au(x) puits vide(s), aux échantillons à analyser, étalon et contrôles ainsi que les numéros de lot indiqués sur les étiquettes des flacons. Sur l'un des coins de la plaque de micro-essai, coller une étiquette qui servira de point de repère pour l'orientation.
2. Préparer les bandes de micro-essai comme indiqué ci-après:
 - a. Réhydrater les puits de micro-essai en ajoutant environ 300 µl de solution de lavage dans chaque puits à l'aide d'un flacon de lavage ou tout autre dispositif de remplissage.
 - b. Incuber à température ambiante (15–30 °C) pendant 1 à 2 minutes.
 - c. Aspirer le contenu de chaque puits.
 - d. Retourner la plaque et la taper sur du papier absorbant à deux reprises afin d'éliminer toute trace de liquide. Ne pas laisser sécher les puits.
3. Ajouter 100 µl de diluant de l'échantillon de complément dans le(s) puits qui sera/ont utilisé(s) pour vider le lecteur de plaque.
4. Ajouter 100 µl de chaque échantillon étalon de CIC-Raji (A, B et C) dans les puits en double.
5. Ajouter 100 µl de chaque échantillon dilué dans les puits de micro-essai qui lui a été attribué. Voir la partie *PRÉPARATION DES RÉACTIFS*, étape 4.
6. Incuber à température ambiante (15–30 °C) pendant 60 minutes ± 1 minute.
7. Laver les puits de micro-essai comme suit :
 - a. Après l'incubation de l'étape 6 (et de l'étape 9 plus bas), vider chaque puits.
 - b. Ajouter environ 300 µl de solution de lavage dans chaque puits à l'aide d'un flacon de lavage ou tout dispositif de remplissage.
 - c. Incuber les puits pendant 1 minute à température ambiante (15–30 °C).
 - d. Vider chaque puits.
 - e. Ajouter environ 300 µl de solution de lavage dans chaque puits.
 - f. Vider chaque puits.
 - g. Renouveler les étapes e à f encore trois fois.
 - h. Après le cinquième cycle de lavage, retourner la plaque et la taper sur du papier absorbant à deux reprises afin d'éliminer toute trace de liquide.
8. Verser 50 µl de conjugué CIC-Raji dans chaque puits lavé, y compris dans les puits vides, au moyen d'une pipette multi-canaux ou automatisée.
9. Incuber les bandes de micro-essai à température ambiante (15–30 °C) pendant 30 minutes ± 1 minute.
Préparer la solution de substrat pendant cette incubation (voir PRÉPARATION DES RÉACTIFS étape 6).
10. Laver les puits de micro-essai après l'incubation de 30 minutes de l'étape 9, comme décrit ci-avant, à l'étape 7.
11. Immédiatement après le lavage, verser 100 µl de la solution de substrat fraîchement préparée dans chaque puits, y compris dans le(s) puits vide(s), à l'aide d'une pipette multi-canaux ou automatisée.
12. Incuber les bandes de micro-essai à température ambiante (15–30 °C) pendant 30 minutes ± 1 minute.
13. Verser 50 µl de solution d'arrêt dans chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique, au moyen d'une pipette multi-canaux ou automatisée. La solution d'arrêt doit être ajoutée dans les puits dans le même ordre et au même rythme que l'a été la solution de substrat. Taper doucement la plaque pour que la couleur se propage régulièrement.
14. Déterminer le degré d'absorbance à 405 nm (valeur A_{405}) pour chaque puits de test dans l'heure suivant l'ajout de la solution d'arrêt (étape 13), en corrigeant le puits vide en fonction du type de système spectrophotométrique utilisé.

15. Garder le portoir et le support pour bandes en vue d'une réutilisation.

16. Jeter les échantillons dilués restants, ainsi que le substrat et les bandes de micro-essai utilisées (voir la partie *AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS*, paragraphe 3). Garder le portoir et le support pour bandes en vue d'une réutilisation.

MÉTHODE DE CONFIRMATION RECOMMANDÉE

S'il est nécessaire de confirmer un résultat positif avec un autre test, ou si un résultat positif est incompatible avec l'interprétation clinique, l'échantillon positif peut être soumis de nouveau à un test de confirmation. Un résultat négatif ne peut être confirmé. La méthode de confirmation repose sur un diluant d'échantillon (le diluant de confirmation CIC-Raji) qui contient des anticorps anti-fragment C3 humain. Pour confirmer un résultat positif, une aliquote de l'échantillon doit être diluée dans le diluant de confirmation CIC-Raji, et une autre aliquote doit être diluée dans la même proportion dans le diluant de l'échantillon de complément. Les deux échantillons sont alors testés suivant le procédé habituel de l'essai immunoenzymatique de remplacement CIC-Raji de Quidel. Voir les parties *PRÉPARATION DES RÉACTIFS* et *INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS* pour plus de détails.

CONTRÔLE QUALITÉ

Afin de respecter les bonnes pratiques de laboratoire, il est recommandé de pratiquer des contrôles positifs et négatifs chaque jour. C'est pourquoi des échantillons de contrôle pour l'essai de remplacement des cellules CIC-Raji Quidel sont disponibles auprès de Quidel (Contrôles CIC-RCR, Réf. catalogue **A014**), et doivent être utilisés comme indiqué dans la notice produit. Si le contrôle positif et/ou négatif ne fonctionne pas comme indiqué, veuillez contacter l'Assistance technique Quidel dès que possible.

En plus des échantillons de contrôle, l'essai de remplacement des cellules CIC-Raji Quidel comprend également une *MÉTHODE DE CONFIRMATION RECOMMANDÉE* et une étape de *VALIDATION*.

En utilisant les contrôles, étalons avec validation, et la méthode de confirmation, vous devez pouvoir obtenir des résultats reproductibles et précis.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Calcul des résultats

Calculs : On obtient la courbe étalon en utilisant les valeurs A_{405} pour chaque échantillon étalon CIC-Raji, auxquelles on a soustrait l'échantillon à blanc (en ordonnée), et les microgrammes correspondants d'équivalent gammaglobuline humaine agrégée par la chaleur et traitée par sérum par ml (µg Eq/ml), indiqués sur l'étiquette du flacon pour chaque étalon (en abscisse). Après régression linéaire, la courbe étalon obtenue doit répondre aux critères de validation (voir ci-dessous). Les concentrations des échantillons sont alors calculées directement à partir de la courbe étalon. La plupart des ordinateurs et des calculateurs sont capables d'exécuter ces calculs.

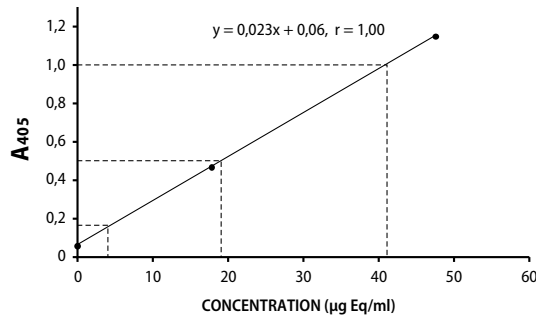
Les données peuvent aussi être obtenues par graphique réalisé à la main et les valeurs (µg Eq/ml) de l'échantillon à analyser peuvent être lues directement à partir de la courbe étalon la plus adaptée. La Figure 1 est un exemple de courbe étalon type.

Calculs du test de confirmation : Pour confirmer un résultat positif, on divise la concentration en complexes immuns de l'échantillon dilué dans du diluant de confirmation CIC-Raji par la concentration en complexes immuns de l'échantillon dilué dans du diluant d'échantillon de complément, pour obtenir un rapport :

$$\text{rapport} = \frac{[\text{CIC}] \text{ dans diluant de confirmation}}{[\text{CIC}] \text{ dans diluant échantillon de complément}}$$

Exemple de courbe étalon

FIGURE 1



Échantillon	A ₄₀₅	µg Eq/ml
Étalon A	0,06	0
Étalon B	0,46	18
Étalon C	1,15	48
Échantillon 1	0,15	3,9
Échantillon 2	0,50	19,1
Échantillon 3	1,00	40,9
r = 1,00	m = 0,023	b = 0,06

Validation

Déterminer la pente, le point d'intersection et le coefficient de corrélation de la meilleure courbe obtenue. Les valeurs doivent être comprises entre les limites indiquées pour que l'essai soit valide.

coefficient de corrélation (r) :	> 0,95
pente (m) :	de 0,013 à 0,034
point d'intersection sur l'axe des ordonnées (b) :	de (-)0,07 à (+)0,10

La plupart des sujets sains ont des niveaux de CIC mesurables. Étant donné qu'il n'y a pas de niveau anormal de CIC reconnu, l'utilisateur doit établir ses propres niveaux normaux. À titre indicatif, les niveaux de CIC basés sur les résultats obtenus à partir de populations saines décrits dans la partie VALEURS ATTENDUES sont les suivants :

Résultats normaux : Si la concentration en CIC est inférieure ou égale à 15 µg Eq/ml, les niveaux de CIC sont considérés comme normaux.

Résultats anormaux : Si la concentration en CIC est supérieure ou égale à 20 µg Eq/ml, les niveaux de CIC sont considérés comme anormaux. Les échantillons dont les concentrations mesurées en CIC sont supérieures à l'étalon C CIC-Raji doivent être notés comme supérieurs aux concentrations d'étalon C CIC-Raji attribuées indiquées sur l'étiquette du flacon.

Résultats ambigus : Si la concentration en CIC est supérieure à 15 µg Eq/ml et inférieure à 20 µg Eq/ml, les résultats sont ambigus. Ces échantillons peuvent être analysés de nouveau, ou un nouvel échantillon peut être prélevé et analysé, si indiqué. Si un échantillon obtient un deuxième résultat ambigu, il peut alors être considéré comme nettement supérieur à la moyenne et donc être enregistré comme anormal.

Résultats de confirmation : Si le rapport est inférieur à 0,5, le résultat positif est confirmé. Autrement dit, une réduction supérieure à 50 % de la concentration en CIC apparente confirme un résultat positif.

Il arrive parfois que des échantillons positifs lors de l'essai ne soient pas confirmés comme tels. Cela peut être notamment dû à : (1) une mauvaise manipulation des échantillons (ex. : contaminés ou inactivés par la chaleur) ou (2) des échantillons contenant des anticorps IgG humains qui se lient aux IgG de souris. Ces échantillons ne sont pas forcément négatifs aux CIC. En effet, la substance à l'origine du faux positif peut masquer les CIC présents concomitamment qui, en l'absence de cette autre substance, donneraient un résultat positif pouvant être confirmé.

LIMITES DU PROCÉDÉ

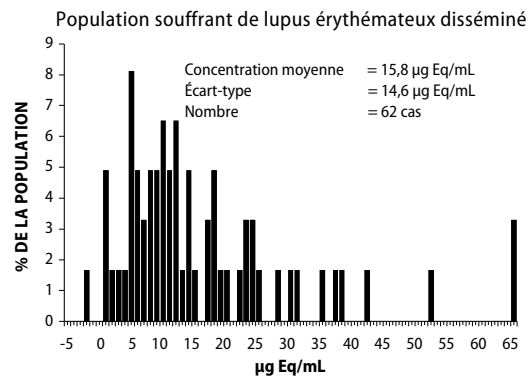
Ce test mesure la quantité de complexes immuns ou d'agrégats d'IgG humaine contenant des fragments d'activation du C3. Par conséquent, les conditions qui entraînent l'agrégation des IgG ou l'activation du complément doivent être évitées pendant le prélèvement et le traitement de l'échantillon.

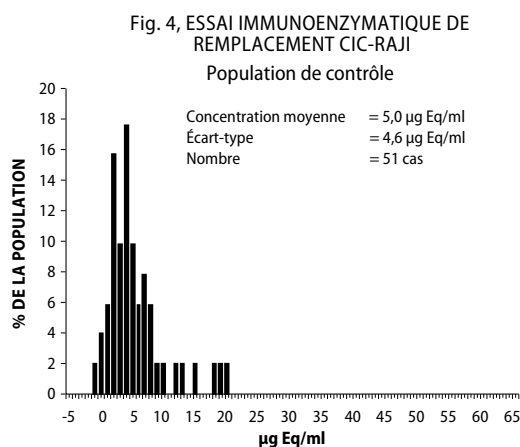
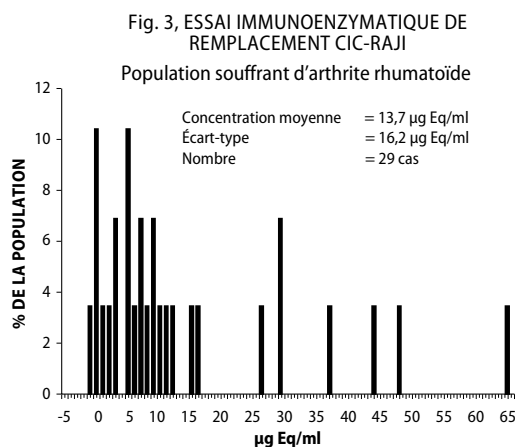
VALEURS ATTENDUES

Cinquante (50) échantillons de sérum choisis ont été obtenus auprès d'un laboratoire de référence qui reçoit des échantillons provenant de tous les États-Unis. Ces échantillons de sérum ont été testés lors de l'essai immunoenzymatique de remplacement des cellules CIC-Raji de Quidel et lors de l'essai sur les cellules Raji du laboratoire de référence. Une concordance de 92 % a été observée entre les deux essais en termes de détection de la présence de CIC.

Les échantillons de sérum obtenus auprès de soixante-deux (62) patients atteints de LED dans deux cliniques de l'Est des États-Unis et de vingt-neuf (29) patients souffrant d'AR soignés dans une clinique rhumatologique du Sud des États-Unis ont été analysés lors de l'essai immunoenzymatique de remplacement des cellules CIC-Raji de Quidel. En outre, on a analysé des échantillons de sérum obtenus auprès de vingt-six (26) sujets sains suivis dans deux sites cliniques spécialisés dans le LED et de vingt-cinq (25) patients non-autoimmuns du point de vue clinique et suivis en clinique rhumatologique. Les concentrations moyennes de CIC, les écarts-types, et la distribution statistique pour chaque population sont présentés aux Figures 2, 3 et 4.

Fig. 2. ESSAI IMMUNOENZYMATIQUE DE REMPLACEMENT CIC-RAJI





Sur un site spécialisé dans le LED et sur le site dédié à l'AR, le degré d'activité de la maladie a été attribué indépendamment de toute donnée de laboratoire sur les CIC. Cette évaluation a été effectuée par le(s) médecin(s) traitant(s). Pour garantir la cohérence du suivi, un médecin de chaque site a passé en revue ultérieurement les dossiers des patients et a défini l'activité de la maladie. Un patient atteint d'AR a été décrit comme étant au stade final, dit « d'épuisement ». Le résultat des CIC pour ce patient était de 1 µg Eq/ml. Puisqu'il n'y avait aucun autre patient atteint d'AR similaire, ce résultat n'est pas inclus dans le Tableau 2. Le Tableau 2 indique la relation observée entre les CIC mesurés par l'essai immunoenzymatique de remplacement des cellules CIC-Raji de Quidel et l'activité de la maladie chez les patients.

TABLEAU 2
RÉSULTATS DE L'ESSAI DE REMPLACEMENT DES CELLULES CIC-RAJI COMPARÉS À L'ACTIVITÉ DE LA MALADIE

	% anormal ¹		
	Activité faible	Activité modérée	Activité élevée
LED	8 % (1/12)	36 % (4/11)	79 % (11/14)
AR	0 % (0/4)	19 % (3/16)	50 % (4/8)

¹ Entre parenthèses (après chaque % anormal) figure le nombre de patients pour lesquels le résultat est anormal, divisé par le nombre de patients classés présentant une activité particulière de la maladie.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Exactitude

Un étalon des complexes immuns de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), à savoir des complexes anatoxine tétanique-anatoxine antitétanique préincubés dans du sérum humain normal fraîchement prélevé, a été utilisé pour standardiser l'essai. Pour tester l'exactitude de l'essai, cinq dilutions de l'échantillon étalon de l'OMS ont été testées en triple au cours de neuf séries d'essais avec le kit de Quidel.

Les concentrations analysées ont indiqué une corrélation de 0,99 avec les valeurs connues.

Reproductibilité de l'essai

Les échantillons des patients et les étalons des kits ont été analysés au cours de neuf analyses utilisant deux lots de kits différents. Chaque échantillon a été testé en triple au cours de chaque série de tests. La variation moyenne entre chaque série, pour les échantillons à analyser et les étalons du kit, figure dans le Tableau 3 comme variation inter-essais. La variation moyenne dans chaque série, pour les échantillons à analyser et les étalons du kit, figure dans le Tableau 3 comme variation intra-essai.

TABLEAU 3
REPRODUCTIBILITÉ DE L'ESSAI

	Moyenne (µg Eq/ml)	Intra-essai (CV en %)	Inter-essais (CV en %)
Échantillon 1	56	5	9
	2	13	23
Étalon 1	4	8	30
	2	11	15
	3	23	9
	4	32	6
	5	40	6
	6	48	5
	7	59	3

Sensibilité

L'essai immunoenzymatique de remplacement des cellules CIC-Raji de Quidel mesure au moins 4 µg Eq/ml d'analyte CIC basé sur la comparaison avec l'étalon de l'OMS.

Spécificité

Les cinquante et un (51) échantillons de sérum de contrôle décrits dans la partie VALEURS D'ÉCHANTILLON ont été analysés au cours de l'essai de remplacement des cellules CIC-Raji de Quidel. Seuls trois étaient positifs (systématiquement supérieurs à 15 µg Eq/ml), soit une spécificité de 94 %.

ASSISTANCE

Pour passer une commande ou pour une assistance technique depuis les États-Unis, veuillez contacter un représentant Quidel au +1-408-616-4301, du lundi au vendredi, entre 8 h et 17 h, heure du Pacifique. Les commandes peuvent également être passées par fax au +1-408-616-4310.

Pour obtenir ces services depuis les autres pays, veuillez contacter votre distributeur local.

GUÍA RÁPIDA DE LOS PASOS DEL ENSAYO

Lea el prospecto del producto en su totalidad antes de iniciar el ensayo.

Preparación preliminar

1. Prepare la solución de lavado.
2. Diluya las muestras de ensayo.

Procedimiento de ensayo

3. Rehidrate los pocillos de microensayo.
4. Añada 100 µl de diluyente de muestras de complemento al pocillo o pocillos testigo.
5. Añada 100 µl de cada patrón y muestra de ensayo a los pocillos correspondientes.
6. Incube durante 60 a temperatura ambiente (15–30 °C).
7. Lave los pocillos de microensayo cinco veces.
8. Añada 50 µl de conjugado de CIC-Raji reconstituido a cada pocillo de ensayo.
9. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente. (Prepare la solución de sustrato durante la incubación.)
10. Lave los pocillos de microensayo cinco veces.
11. Añada 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo de ensayo.
12. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente.
13. Añada 50 µl de solución de parada a cada pocillo de ensayo.
14. Mida la absorbancia a 405 nm dentro de los 60 minutos.

Cálculos

15. Represente gráficamente la absorbancia vs. la concentración de los patrones en el papel cuadrículado suministrado o introduzca los datos en la calculadora para realizar un análisis de regresión lineal.
16. Lea las concentraciones de las muestras de ensayo directamente del gráfico o ejecute las funciones requeridas en la calculadora para obtener las concentraciones de las muestras.

USO PREVISTO

El enzoinmunoensayo de CIC-reposición de células Raji de Quidel mide los complejos inmunes que contienen fragmentos de activación de C3 en suero y plasma humanos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La importancia de los complejos inmunes circulantes (CIC) y su relación con diferentes enfermedades es objeto de investigación desde hace varios años. La formación de complejos inmunes es un proceso de protección continuo y, por lo general, benigno de un sistema inmune normal. Los CIC son eliminados de su huésped mediante una serie de procesos bioquímicos, enzimáticos y celulares complejos. Para que esta eliminación sea eficaz, en muchos casos se requiere la activación del complemento. Su activación da como resultado una deposición de fragmentos de C3 dentro del complejo inmune, seguida de una mayor eliminación por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial. En ciertas condiciones de enfermedad que aún no se comprenden muy bien, los complejos inmunes no son eliminados de forma eficiente del organismo. En estos casos, los complejos inmunes pueden acumularse y producir lesiones dependientes del complemento en diferentes órganos y tejidos. Esta activación del complemento puede comenzar como una serie de episodios potencialmente destructivos en el huésped, incluyendo la producción de anafilatoxina, lisis celular, estimulación leucocitaria y activación de macrófagos y otras células.¹ Cuando los complejos inmunes se fijan a las paredes de los vasos o a las membranas celulares, puede producirse la destrucción de tejido normal, como ocurre en algunos casos de glomerulonefritis.

Ciertas propiedades de los CIC influyen en su patogenicidad potencial. Las más importantes son: (1) la naturaleza, tamaño y concentración del antígeno; (2) la naturaleza, tamaño y concentración del anticuerpo; (3) la velocidad de formación y eliminación de los complejos inmunes.^{1,2}

Los complejos inmunes circulantes se han medido en diferentes condiciones: por ejemplo, infecciones, trastornos autoinmunes, traumatismos y enfermedades proliferativas neoplásicas. Los estudios actuales sugieren que la determinación de los CIC puede ser importante para la evaluación de ciertas enfermedades y, algunas veces, para realizar un seguimiento de la eficiencia de la terapia, como ocurre particularmente con el lupus eritematoso sistémico (LES) y algunas formas de la artritis reumatoide (AR).^{3,4} La primera enfermedad vinculada a la formación de complejos inmunes fue la enfermedad de suero, descrita a

comienzos del siglo XX por Pirquet. Desde entonces, se han descrito niveles elevados de CIC en enfermedades autoinmunes (LES, síndrome relacionado con el LES, AR), glomerulonefritis, enfermedad neoplásica (Hodgkin, leucemia), infecciones bacterianas (endocarditis bacteriana subaguda, lepra), infecciones parasitarias (malaria, esquistosomiasis) e infecciones virales (hepatitis, mononucleosis).

Se han descrito más de 40 técnicas de ensayo para la detección o cuantificación de los CIC, como el ensayo de células Raji, la prueba de desviación del C1q, el ensayo de conglutinina, los procedimientos de unión del C1q en fase fluida, el ensayo del factor reumatoide, la prueba de PEG precipitina y ensayos del C1q en fase sólida.¹⁵ Debido a que el tamaño y las propiedades fisicoquímicas de los CIC varían de forma considerable, ninguno de estos ensayos se ha establecido como norma. Un estudio en colaboración patrocinado por la Organización Mundial de la Salud en 1978 determinó que no había un solo método adecuado para todos los estados de enfermedad sospechados y recomendaba utilizar al menos dos técnicas de ensayo diferentes para detectar y medir los CIC de forma adecuada.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Algunos fragmentos del tercer componente del complemento, C3, suelen unirse de forma covalente a los complejos inmunes activadores del complemento. Las células Raji, que se obtuvieron de una línea celular cultivada de linfocitos B continua, poseen receptores para los componentes del complemento CR2 que unen los fragmentos iC3b, C3d,g y C3d del C3 activado.^{6,7,8} El ensayo de CIC-células Raji se basa en la capacidad de los receptores de CR2 de las células Raji de unir los complejos inmunes que contienen dichos fragmentos de C3.⁹ El ensayo inmunoenzimático de CIC-reposición de células Raji de Quidel también mide los fragmentos de C3 que contienen CIC utilizando un anticuerpo monoclonal inmovilizado que une específicamente los fragmentos de activación iC3b, C3d,g y C3d del C3 de forma análoga a la reacción de unión del CR2 de las células Raji.

En la primera etapa, se añaden los patrones y muestras de suero o plasma diluidos en diluyente de muestras de complemento a los pocillos de microensayo recubiertos con anticuerpos monoclonales contra fragmentos de C3 humanos y se los incuba. Durante la incubación, los complejos inmunes que contienen fragmentos de activación de C3 son capturados por el anticuerpo en fase sólida. Después de la incubación, un ciclo de lavado elimina las proteínas de suero o plasma no unidas.

En la segunda etapa, se añade IgG antihumana de ratón conjugada con peroxidasa de rábano a cada pocillo de ensayo y se los incuba. Durante la incubación, el conjugado se une a los complejos inmunes que ahora se encuentran unidos a los pocillos de microensayo. Un ciclo de lavado elimina el conjugado no unido.

En la tercera etapa, se añade un sustrato enzimático a cada pocillo de ensayo. El anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano unido reacciona con el sustrato cromogénico y forma un color verde. Después de la incubación, se añade un reactivo para detener la coloración.

Se miden las absorbancias del patrón y de las muestras de ensayo (valores A_{405}) mediante espectrofotometría. La intensidad del color verde que se forma es proporcional a la cantidad de CIC que se unen a la fase sólida. Se genera una curva estándar representando gráficamente los valores A_{405} obtenidos para cada patrón en función de su concentración indicada. La concentración de complejos inmunes presentes en la muestra de ensayo se determina por referencia a la curva estándar. Los resultados se expresan en microgramos de gammaglobulina humana agregada por calor tratada con suero equivalentes por ml ($\mu\text{g Eq/ml}$). Para confirmar un resultado CIC positivo, la muestra puede analizarse después de diluirse en diluyente de confirmación de CIC-Raji, el cual contiene anticuerpos bloqueantes con especificidades similares a las del anticuerpo inmovilizado sobre el pocillo de microensayo.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

El kit de enzimoimmunoensayo de CIC-reposición de células Raji contiene los siguientes elementos:

- | | | |
|---|-------------------------|-------------------------|
| A Patrones CIC-Raji | Cód. A9513–A9515 | 1 unidad de 2 ml |
| B Cada uno contiene una cantidad conocida de gammaglobulina humana agregada por calor tratada con suero en PBS, estabilizadores al 2,5 %, timerosal al 0,01 %. | | |
| 1 Placa de microensayo | Cód. A9512 | 12 unidades |
| 96 pocillos con retén y soporte, en tiras de ocho pocillos recubiertas con fragmentos de C3 antihumano de ratón en una bolsa de papel de aluminio resellable. | | |
| 2 Solución de parada | Cód. A3673 | 6 ml |
| Contiene 250 mM de ácido oxálico. | | |
| 3 Concentrado de solución de lavado 20X | Cód. A3674 | 2 x 50 ml |
| Una vez diluido, cada uno contiene solución salina tamponada de fosfato (PBS), Tween-20™ al 0,05 % y timerosal al 0,01 %. | | |

- | | | |
|--|-------------------|------------------|
| 4 Diluyente de muestras de complemento | Cód. A3670 | 50 ml |
| Contiene PBS, estabilizadores al 2,5 %, ProClin® 300 al 0,035 %. | | |
| 5 Diluyente de sustrato | Cód. A3672 | 25 ml |
| Contiene 0,1 M de tampón de citrato y H ₂ O ₂ al 0,05 %. | | |
| 6 Concentrado de sustrato | Cód. A3671 | 1,5 ml |
| Contiene ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) al 0,7 %, sal de diamonio. | | |
| 7 Conjugado de CIC-Raji | Cód. A9516 | 2 x 3 ml |
| Contiene IgG antihumana (de ratón) conjugada con peroxidasa suspendida en un tampón estabilizador de peroxidasa de rábano con conservante. | | |
| 8 Diluyente de confirmación de CIC-Raji | Cód. A9517 | 2 x 12 ml |
| Contiene PBS, estabilizadores al 2,5 %, anticuerpo de fragmento de C3 antihumano, ProClin® 300 al 0,035 %. | | |

Tween-20™ es una marca de Atlas Chemical Industries, Inc.

ProClin® es una marca registrada de Rohm and Haas Company.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Cronómetro (de 60 minutos)

Calculadora u otro método de cálculo para validar el ensayo

Placas de microensayo limpias y sin usar y/o tubos de ensayo y portatubos

Recipiente para dilución del tampón de lavado

Botella para lavado u otro sistema de lavado para inmunoensayo

Pipeta multicanal ajustable (8 ó 12 canales) o micropipetas de repetición (opcionales)

Pipetas limpias, 1 ml, 5 ml y 10 ml

Micropipetas y puntas de pipeta

Lector de placas apto para leer valores A_{405} de densidad óptica de 0,0 a 2,0

Agua desionizada o destilada

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Respete las precauciones universales al manipular el contenido de este kit y las muestras de los pacientes.
3. Deseche los recipientes y el contenido no utilizado de acuerdo con la normativa internacional, nacional y local.
4. Use los reactivos suministrados como una unidad integral antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.
5. Guarde los reactivos de ensayo según lo indicado.
6. Al añadir o aspirar líquidos de los pocillos de microensayo, no raspe ni toque el fondo de los pocillos.
7. El uso de tiempos y temperaturas de incubación que no sean los indicados en la sección Procedimiento de ensayo puede dar resultados erróneos.
8. No permita que los pocillos de microensayo se sequen una vez iniciado el ensayo.
9. No utilice un pocillo de microensayo para más de un ensayo.
10. Se recomienda utilizar pipetas multicanal o pipeteros de repetición para garantizar la administración de los reactivos en el momento adecuado.
11. Para una medición exacta de las muestras, añada las muestras y los patrones con precisión. Pipete cuidadosamente utilizando sólo equipo calibrado.
12. Este ensayo puede realizarse con cualquier método de lavado homologado.
13. Es fundamental recoger y almacenar de forma adecuada las muestras de ensayo para obtener resultados precisos.
14. Evite la contaminación microbiana o cruzada de las muestras, reactivos o materiales. Su contaminación puede llevar a la obtención de resultados incorrectos.

15. El timerosal se utiliza como conservante. El contacto o la ingestión accidentales de tampones o reactivos que contienen timerosal pueden provocar reacciones de aumento de la hipersensibilidad, incluyendo irritación en la piel, los ojos o la boca. Busque atención médica en caso de experimentar estos síntomas. La exposición al timerosal puede tener efectos mutagénicos potenciales. Evite el contacto con los ácidos y bases fuertes.
16. El ProClin® 300 se utiliza como conservante. El contacto o la ingestión accidentales de tampones o reactivos que contienen ProClin pueden provocar irritación en la piel, los ojos o la boca. Utilice buenas prácticas de laboratorio para reducir la exposición. Busque atención médica en caso de experimentar estos síntomas.
17. El concentrado de sustrato es sensible a la luz. Evite la exposición prolongada a la luz fuerte o directa. Guarde los reactivos en un lugar oscuro cuando no los utilice.
18. Para evitar la formación de aerosoles durante el lavado, utilice un aparato para aspirar el líquido de lavado al interior de un frasco que contenga lejía de uso doméstico.
19. Las muestras inactivadas por calor, hiperlipémicas o contaminadas pueden dar resultados erróneos.

CONSERVACIÓN

Conserve el kit no abierto a 2–8 °C. Una vez abierto, el concentrado de solución de lavado 20X puede guardarse a 2–30 °C.

Después de seleccionar los reactivos o materiales que se utilizarán en el ensayo, vuelva a guardar inmediatamente los reactivos no utilizados a las temperaturas de conservación adecuadas. Deje que los reactivos y los materiales para el ensayo se estabilicen a temperatura ambiente (15–30 °C) antes de su uso.

INDICACIONES DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE REACTIVOS

El color del concentrado de sustrato puede variar entre verde claro y verde oscuro. Esta condición no influirá en su funcionamiento normal. No obstante, la solución de sustrato recién preparada debe ser incolora o de un color verde claro. Un color verde oscuro indica que la solución de sustrato preparada se ha deteriorado. En este caso, debe desecharse y prepararse solución de sustrato fresca en un recipiente de vidrio limpio.

Si la solución de lavado diluida se vuelve turbia o se decolora significa que el reactivo se ha echado a perder y debe desecharse.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

Manipule y deseche todas las muestras utilizando las precauciones universales.

Las muestras de suero o plasma deben recogerse utilizando técnicas asepticas y prepararse según las técnicas habituales para el análisis clínico en laboratorio.¹⁰ No inactive por calor las muestras. Deben eliminarse de las muestras todas las partículas de materia mediante centrifugado a baja velocidad antes de realizar el ensayo.

Las muestras pueden conservarse en hielo, a aproximadamente 0 °C hasta 6 horas. Para conservarlas por períodos más prolongados, deben congelarse a –70 °C o a una temperatura inferior (la conservación a –20 °C puede dar lugar a resultados erróneos).

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Vea en la Tabla 1 las cantidades de solución de sustrato y tiras de microensayo requeridas por número de ensayos. Tras retirar los reactivos y materiales necesarios, vuelva a guardar los elementos no utilizados a la temperatura correspondiente indicada (vea la sección *CONSERVACIÓN*). Deje que todos los reactivos y materiales para el ensayo se estabilicen a temperatura ambiente (15–30 °C) antes de su uso.

1. **Solución de lavado.** Mezcle el concentrado de solución de lavado 20X invirtiendo el frasco varias veces. Si el concentrado de solución de lavado 20X se ha guardado a una temperatura de 2–8 °C, es posible que se hayan formado cristales. Para disolver los cristales, caliente el frasco en un baño de agua de 37–50 °C hasta que todos los cristales se hayan disuelto y, a continuación, mézclelo bien. Prepare la solución de lavado diluyendo todo el contenido de uno de los frascos de concentrado de solución de lavado 20X, hasta un litro, con agua destilada o desionizada. Mezcle bien. La solución de lavado es estable durante 30 días si se conserva en un recipiente limpio a 2–8 °C. En caso de decoloración o turbiedad, deseche el reactivo.
2. **Selección de las tiras de microensayo.** Determine la cantidad de tiras de microensayo requeridas para el ensayo consultando la Tabla 1. Retire el retén de las tiras de la placa montada. Retire las tiras que no necesita y colóquelas en la bolsa de conservación. Vuelva a sellar la bolsa y guárdela a 2–8 °C. Fije las tiras que utilizará en el ensayo.

3. Dilución de muestras

Atención: trate todas las muestras como si fueran potencialmente infecciosas. No utilice muestras inactivadas por calor o contaminadas.

Determine el número (N) de muestras que someterá a ensayo. Identifique los tubos de ensayo con etiquetas con números del 1 al N y anote en la hoja de datos provista qué muestra corresponde a cada tubo.

Prepare una dilución de 1:50 de cada muestra utilizando el diluyente de muestras de complemento (p. ej., 10 µl de muestra de ensayo con 490 µl de diluyente de muestras de complemento). Mezcle bien pero evite la formación de espuma y burbujas. No guarde ni vuelva a utilizar las muestras diluidas.

4. **Incorporación de las muestras diluidas a los pocillos de microtitulación.** puede utilizarse uno de dos métodos para incorporar las muestras diluidas, los patrones, los controles y el tampón a los pocillos (vea el paso 5 del *PROCEDIMIENTO DE ENSAYO*). Para ciclos de ensayo pequeños en los que sólo se analiza una pequeña cantidad de muestras, las muestras diluidas y otros reactivos pueden añadirse directamente a los pocillos asignados con una micropipeta (100 µl/pocillo). En el caso de ciclos pequeños o grandes, especialmente en estos últimos, recomendamos el uso de un pipetero multicanal para añadir las muestras como se indica a continuación. **(También puede utilizarse un pipetero multicanal para facilitar la incorporación del conjugado, la solución de sustrato y la solución de parada.)**

A fin de cargar los patrones, controles y muestras diluidas en los pocillos de microensayo lo más rápidamente posible, puede utilizarse un procedimiento de "réplica en placas". En lugar de añadir 100 µl de cada patrón, control o muestra diluida a los pocillos recubiertos con anticuerpos de forma individual, pueden añadirse 120–130 µl de cada solución a pocillos individuales en una placa testigo (no suministrada) correspondiente al patrón de enzimoensayo final deseado. Una vez incorporadas a los pocillos de microensayo de la placa testigo todas las soluciones que se desean someter a ensayo, transfiera rápidamente 100 µl de cada pocillo testigo a los pocillos recubiertos con anticuerpos utilizando un micropipetero multicanal. Para evitar la posibilidad de contaminación cruzada, deben cambiarse las puntas de la pipeta cada vez que cambie la composición de las muestras que se desean transferir.

5. **Dilución de confirmación de CIC-Raji (opcional).** Si desea verificar los resultados positivos obtenidos, determine el número (N) de muestras que desea confirmar. Identifique los tubos de ensayo con etiquetas con números del 1c al Nc y anote qué muestra corresponde a cada uno. Prepare una dilución de 1:50 utilizando el diluyente de confirmación de CIC-Raji. Las muestras diluidas en este diluyente deben analizarse de forma *simultánea* en el diluyente de muestras de complemento con la misma dilución.
6. **Preparación de la solución de sustrato.** Prepare la solución inmediatamente antes de utilizarla. Determine el volumen requerido de solución de sustrato consultando la Tabla 1 a continuación. Prepare la solución de sustrato añadiendo 50 µl de concentrado de sustrato por cada ml de diluyente de sustrato. Mezcle bien.
7. **Controles de CIC.** Quidel ofrece por separado controles positivos y negativos de CIC–reposición de células Raji (Controles CIC–RCR cód. A014). Deben prepararse según las indicaciones proporcionadas en el prospecto incluido en sus respectivos envases. Vea además la sección *CONTROL DE CALIDAD* en este prospecto.

TABLA 1
REQUISITOS DEL ENSAYO

Pocillos ¹	Tiras de 8 pocillos	Solución de sustrato requerida (ml)	Diluyente de sustrato (ml)	Concentrado de sustrato (µl)
16	2	1,6	2,0	100
24	3	2,4	3,0	150
32	4	3,2	4,0	200
40	5	4,0	5,0	250
48	6	4,8	5,0	250
56	7	5,6	6,0	300
64	8	6,4	7,0	350
72	9	7,2	8,0	400
80	10	8,0	9,0	450
88	11	8,8	9,0	450
96	12	9,6	10,0	500

¹ Determine el número de muestras que desea analizar y añada once (11) pocillos para los tres patrones, los controles alto y bajo que desea analizar (por duplicado) y un pocillo testigo. Se recomienda analizar los patrones y controles por duplicado en tiras de microensayo separadas siempre que sea posible.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Lea el prospecto del producto en su totalidad antes de iniciar el ensayo.

Vea las secciones *PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS* y *ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES* antes de continuar.

1. Tome nota de las posiciones de los pocillos de microensayo correspondientes a los pocillos testigo, a las muestras de ensayo, a los patrones y a los controles, así como los números de lote que figuran en las etiquetas de los viales. Marque una esquina de la placa de microensayo a modo de orientación.
2. Prepare las tiras de microensayo de la siguiente forma:
 - a. Rehidrate los pocillos de microensayo añadiendo aproximadamente 300 µl de solución de lavado a cada pocillo utilizando una botella para lavado u otro dispositivo de llenado.
 - b. Incube a temperatura ambiente (15–30 °C) durante 1–2 minutos.
 - c. Aspire el contenido de cada pocillo.
 - d. Invierta la placa y golpéela con fuerza sobre papel absorbente dos veces para eliminar el líquido restante. No deje que los pocillos se sequen.
3. Añada 100 µl de diluyente de muestras de complemento a los pocillos testigo que se utilizarán con el lector de placa.
4. Añada 100 µl de cada patrón CIC-Raji (A, B y C) a los pocillos correspondientes por duplicado.
5. Añada 100 µl de cada muestra diluida a los pocillos asignados. Vea la sección *PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS*, Paso 4.
6. Incube a temperatura ambiente (15–30 °C) durante 60 ± 1 minutos.
7. Lave los pocillos de microensayo como se indica a continuación:
 - a. Después de la incubación del paso 6 (y del paso 9 a continuación), elimine el líquido de cada pocillo.
 - b. Añada aproximadamente 300 µl de solución de lavado a cada pocillo utilizando una botella para lavado u otro dispositivo de llenado.
 - c. Incube los pocillos durante 1 minuto a temperatura ambiente (15–30 °C).
 - d. Elimine el líquido de cada pocillo.
 - e. Añada aproximadamente 300 µl de solución de lavado a cada pocillo.
 - f. Elimine el líquido de cada pocillo.
 - g. Repita los pasos e–f tres veces más.
 - h. Después de este quinto ciclo de lavado, invierta la placa y golpéela con fuerza sobre papel absorbente dos veces para eliminar todo el líquido restante.

8. Utilizando una pipeta multicanal o de repetición, aplique 50 µl del conjugado de CIC-Raji en cada pocillo de ensayo lavado, incluyendo los pocillos testigo.
9. Incube las tiras de microensayo a temperatura ambiente (15–30 °C) durante 30 ± 1 minutos.
Prepare la solución de sustrato durante la incubación (vea la sección *PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS*, paso 6).
10. Lave los pocillos de microensayo después de la incubación de 30 minutos del paso 9, tal como se describe en el paso 7 anterior.
11. Inmediatamente después del procedimiento de lavado y utilizando una pipeta multicanal o de repetición, aplique 100 µl de la solución de sustrato recién preparada a cada pocillo, incluyendo los pocillos testigo.
12. Incube las tiras de microensayo a temperatura ambiente (15–30 °C) durante 30 ± 1 minutos.
13. Utilizando una pipeta multicanal o de repetición, añada 50 µl de la solución de parada a cada pocillo para detener la reacción enzimática. La solución de parada debe añadirse a los pocillos en el mismo orden y a la misma velocidad que la solución de sustrato. Golpee suavemente la placa para que la formación de color sea uniforme.
14. Determine el valor de absorbancia a 405 nm (valor A_{405}) para cada pocillo de ensayo dentro de una hora después de añadir la solución de parada (paso 13), realizando una corrección en blanco según el sistema espectrofotométrico en uso.
15. Conserve el soporte y el retén de la tira para su uso futuro.
16. Deseche las muestras diluidas restantes, el sustrato y las puntas de microensayo usadas (vea la sección *ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES*, punto 3). Conserve el soporte y el retén de la tira para su uso futuro.

MÉTODO DE CONFIRMACIÓN RECOMENDADO

En caso de requerir una confirmación independiente de un resultado positivo, o si un resultado positivo no es congruente con la interpretación clínica, puede realizarse un nuevo ensayo de la muestra positiva utilizando una prueba de confirmación. Los resultados negativos no pueden confirmarse. El método de confirmación utiliza un diluyente de muestras (el diluyente de confirmación de CIC-Raji) que contiene anticuerpos de fragmentos de C3 antihumanos. Para confirmar un resultado positivo, debe diluirse una alícuota de la muestra en el diluyente de confirmación de CIC-Raji y una segunda alícuota en el diluyente de muestras de complemento. A continuación, se analizan ambas muestras según el procedimiento de ensayo de inmunoensayo de CIC-reposición de células Raji habitual. Vea más detalles en las secciones *PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS* e *INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS*.

CONTROL DE CALIDAD

Para cumplir con las buenas prácticas de laboratorio, se recomienda incluir controles positivos y negativos en cada ensayo. Con este fin, Quidel ofrece controles para el ensayo de CIC-reposición de células Raji (controles CIC-RCR, cód. **A014**), los cuales deben utilizarse según se indica en el prospecto incluido en su envase correspondiente. Si el control positivo y/o negativo no funcionan como corresponde, póngase en contacto con el Servicio técnico de Quidel lo antes posible.

Además de los controles, el ensayo de CIC-reposición de células Raji de Quidel también incluye un *MÉTODO DE CONFIRMACIÓN recomendado* y *parámetros de VALIDACIÓN*.

Utilizando los controles, los patrones con validación y el método de confirmación, podrá obtener un resultado reproducible y preciso.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Cálculo de los resultados

Cálculos: La curva estándar se genera utilizando el valor A_{405} sustraído del testigo de cada patrón CIC-Raji (en el eje Y) en función de los microgramos asignados de equivalentes gammaglobulina agregada por calor tratada con suero/ml (µg Eq/ml) indicados en la etiqueta del vial para cada patrón (en el eje X). Después de la regresión lineal, la curva estándar generada debe cumplir con los requisitos de validación (ver más abajo). A continuación, se calculan directamente las concentraciones de la muestra a partir de la curva estándar. La mayoría de los ordenadores y calculadoras es capaz de realizar estos cálculos.

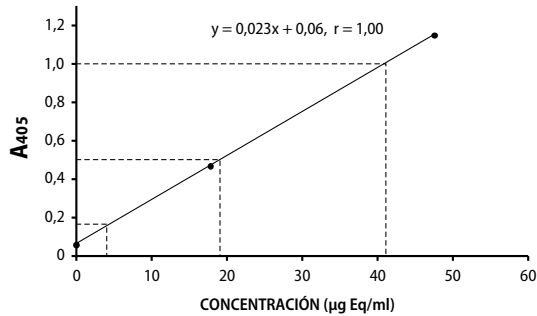
Como alternativa, pueden representarse gráficamente los datos de forma manual y los valores (µg Eq/ml) de las muestras de ensayo pueden leerse directamente de la línea de ajuste óptimo de la curva estándar. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de una curva estándar típica.

Cálculo de la prueba de confirmación: Para confirmar un resultado positivo, la concentración del complejo inmune [CIC] determinada en la muestra diluida en el diluyente de confirmación de CIC-Raji se divide por la concentración del complejo inmune medida en la muestra diluida en el diluyente de muestras de complemento para generar una relación:

$$\text{relación} = \frac{[\text{CIC}] \text{ en diluyente de confirmación CIC-Raji}}{[\text{CIC}] \text{ en diluyente de muestras de complemento}}$$

Ejemplo de curva estándar

FIGURA 1



Muestra	A ₄₀₅	µg Eq/ml
Patrón A	0,06	0
Patrón B	0,46	18
Patrón C	1,15	48
Muestra 1	0,15	3,9
Muestra 2	0,50	19,1
Muestra 3	1,00	40,9
r = 1,00	m = 0,023	b = 0,06

Validación

Determine la pendiente, intersección y coeficiente de correlación de la línea de ajuste óptimo derivada. Los valores deben encontrarse dentro de los intervalos especificados para aprobar el ensayo:

- coeficiente de correlación (r): > 0,95
- pendiente (m): 0,013 a 0,034
- intersección Y (b): (-)0,07 a (+)0,10

La mayoría de los sujetos normales demuestra niveles mensurables de CIC. Debido a que no hay un nivel anormal aceptado de CIC, el usuario debe establecer sus propios niveles normales. A modo de orientación, los niveles de CIC basados en los resultados obtenidos en las poblaciones normales que se describen en la sección VALORES ESPERADOS son los siguientes:

Resultados normales: los valores inferiores o iguales a 15 µg Eq/ml se consideran niveles de CIC normales.

Resultados anormales: los valores superiores o iguales a 20 µg Eq/ml se consideran niveles de CIC anormales. Las muestras que han dado concentraciones de CIC superiores a las del patrón CIC-Raji C deben informarse como superiores a la concentración del patrón CIC-Raji C asignada indicada en la etiqueta del vial.

Valores equívocos: los valores superiores a 15 µg Eq/ml e inferiores a 20 µg Eq/ml son equívocos. Estas muestras pueden volver a someterse a ensayo o bien puede extraerse y analizarse una nueva muestra, según esté indicado. Si una muestra equívoca vuelve a dar un resultado equívoco, la muestra se considera significativamente superior al valor normal y puede informarse como anormal.

Resultados de confirmación: si la relación es inferior a 0,5, el resultado CIC positivo queda confirmado. En otras palabras, una reducción de más del 50 % en la concentración CIC aparente confirma un resultado positivo.

Ocasionalmente, las muestras positivas no pueden confirmarse. Esto puede deberse a, entre otras razones: (1) la mala manipulación de las muestras (p. ej. contaminadas o inactivadas por calor) o (2) las muestras contienen anticuerpos IgG humanos que se unen a la IgG de ratón. No obstante, estas muestras no son necesariamente negativas en cuanto a la presencia de CIC. El material que causa el resultado positivo falso aparente puede enmascarar la presencia de CIC concomitantes que, si estuvieran presentes solos, darían un resultado positivo confirmable.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

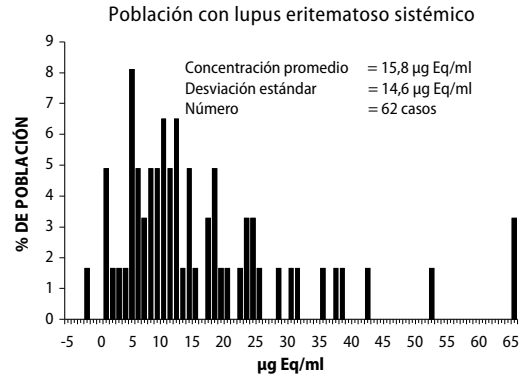
Esta prueba mide los complejos inmunes o los agregados de IgG humana que contienen fragmentos de activación de C3. Por lo tanto, deben evitarse las condiciones que promueven la agregación de IgG o la activación del complemento durante la recogida y procesamiento de las muestras.

VALORES ESPERADOS

Se obtuvieron cincuenta (50) sueros seleccionados de un laboratorio de referencia que recibe muestras de todo Estados Unidos. Estos sueros se analizaron con el ensayo de inmunoensayo de CIC-reposición de células Raji de Quidel y con el ensayo de células Raji del laboratorio de referencia. Hubo una coincidencia del 92 % entre los dos ensayos en la medición de la presencia de CIC.

Se analizaron los sueros obtenidos de sesenta y dos (62) pacientes con LES en dos clínicas del este de los EE.UU. y de veintinueve (29) pacientes con AR en una clínica de reumatología del sur de los EE.UU. con el ensayo de inmunoensayo de CIC-reposición de células Raji de Quidel. Además, se analizaron sueros de veintiséis (26) sujetos sanos y normales en los dos centros clínicos de LES y de veinticinco (25) pacientes no autoinmunes clínicamente en la clínica reumatológica. Las concentraciones medias de CIC, las desviaciones estándar y la distribución de frecuencia para cada población se presentan en las Figuras 2, 3 y 4.

Fig. 2, ENZIMOINMUNOENSAYO DE CIC- REPOSICIÓN DE CÉLULAS RAJI



ESPAÑOL

Fig. 3, ENZIMOINMUNOENSAYO DE CIC- REPOSICIÓN DE CÉLULAS RAJI

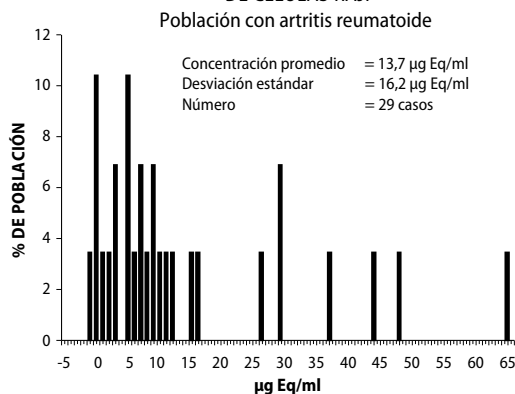
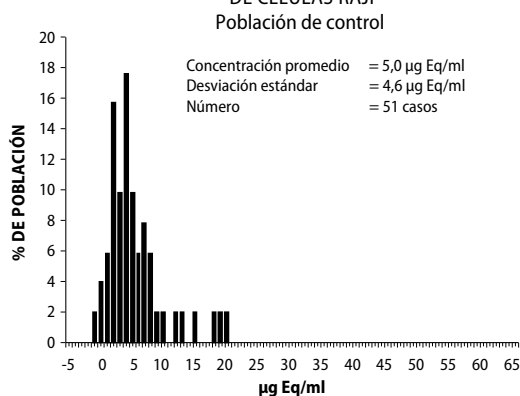


Fig. 4, ENZIMOINMUNOENSAYO DE CIC- REPOSICIÓN DE CÉLULAS RAJI



En uno de los centros de LES y en el centro de AR, el grado de actividad de la enfermedad se asignó independientemente de los datos de los análisis de laboratorio de CIC. Esta evaluación fue realizada por los médicos a cargo del tratamiento. Para asegurar la coherencia de los datos informados, un médico en cada centro revisó posteriormente las historias clínicas de los pacientes y asignó la actividad de la enfermedad. Un paciente con AR se describió como "burnout" en última etapa. El resultado de CIC para este paciente fue de 1 µg Eq/ml. Debido a que no había otros pacientes con AR con características similares, este resultado individual no se incluyó en la Tabla 2. La Tabla 2 muestra la relación observada entre los CIC medidos con el ensayo de inmunoenzima de CIC-reposición de células Raji de Quidel y la actividad de enfermedad de los pacientes.

TABLA 2
RESULTADOS DEL ENSAYO DE CIC-REPOSICIÓN DE CÉLULAS RAJI
COMPARADOS CON LA ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD

	% anormal ¹		
	Actividad baja	Actividad moderada	Actividad alta
LES	8 % (1/12)	36 % (4/11)	79 % (11/14)
AR	0 % (0/4)	19 % (3/16)	50 % (4/8)

¹ Entre paréntesis (después de cada % anormal) se indica el número de pacientes con resultados anormales dividido por el número de pacientes clasificados con la actividad de la enfermedad particular.

CARACTERÍSTICAS DE COMPORTAMIENTO

Exactitud

Se utilizó un patrón de complejo inmune de la Organización Mundial de la Salud (complejos toxoide tetánico-toxoide anti-tetánico preincubados en suero humano normal fresco) para estandarizar el ensayo. Para probar la exactitud del ensayo, se analizaron cinco diluciones del patrón de la OMS por triplicado en nueve ciclos de ensayo con el kit de Quidel.

Las concentraciones analizadas mostraron una correlación de 0,99 respecto de los valores conocidos.

Reproducibilidad

Se analizaron las muestras de los pacientes y los patrones del kit en nueve ciclos de ensayo con kits de dos lotes diferentes. Cada una se analizó por triplicado dentro de cada ciclo. La Tabla 3 muestra la variación promedio entre cada ciclo para las muestras y los patrones del kit como variación intraensayo. La Tabla 3 muestra la variación promedio dentro de cada ciclo para las muestras y los patrones del kit como variación interensayo.

TABLA 3
REPRODUCIBILIDAD DEL ENSAYO

	Media (µg Eq/ml)	Intraensayo (% CV)	Interensayo (% CV)
Muestra 1	56	5	9
2	13	9	23
Patrón 1	4	8	30
2	11	7	15
3	23	5	9
4	32	4	6
5	40	5	6
6	48	4	5
7	59	3	4

Sensibilidad

El ensayo de inmunoenzima de CIC-reposición de células Raji de Quidel mide al menos 4 µg Eq/ml o más de analito de CIC, basado en una comparación con el patrón de la OMS.

Especificidad

Los cincuenta y un (51) sueros de control que se describen en la sección VALORES DE LA MUESTRA se sometieron al ensayo de CIC-reposición de células Raji de Quidel. Sólo tres fueron positivos (superiores a los 15 µg Eq/ml de forma reiterada), con una especificidad del 94 %.

ASISTENCIA

Para realizar pedidos u obtener asistencia técnica, póngase en contacto con un representante de Quidel llamando a los teléfonos +1 408-616-4301, de lunes a viernes de 8:00 a.m. a 5:00 p.m., hora del Pacífico. Los pedidos también pueden efectuarse por fax al número +1 408-616-4310.

Para servicios fuera de los EE.UU., póngase en contacto con su distribuidor local.

HURTIG VEJLEDNING I ANALYSENS TRIN

Læs hele indlægsedlen inden analysen startes.

Indledende forberedelser

1. Forbered vaskeopløsningen.
2. Fortynd testprøverne.

Analyseprocedure

3. Rehydrér mikrobrøndene
4. Tilsæt 100 µl komplementprøvefortynder til de brønde, der skal anvendes til blindprøver.
5. Tilsæt 100 µl fra hver standard og testprøve til de modsvarende brønde.
6. Inkubér 60 minutter ved stuetemperatur (15–30 °C).
7. Vask mikrobrøndene fem gange.
8. Tilsæt 50 µl CIC Raji-konjugat til hver brønd.
9. Inkubér 30 minutter ved stuetemperatur. (Præparér en substratopløsning under denne inkubering).
10. Vask mikrobrøndene fem gange.
11. Tilsæt 100 µl substratopløsning til hver brønd.
12. Inkubér 30 minutter ved stuetemperatur.
13. Tilsæt 50 µl stopopløsning til hver brønd.
14. Mål absorbansen ved 405 nm inden for 60 minutter.

Beregninger

15. Absorbansen plottes imod koncentrationen for standarderne på det medfølgende grafpapir eller tages ind på regnemaskinen for en lineær regressionsanalyse.
16. Aflæs koncentrationerne fra testprøverne direkte af diagrammet eller udfør de nødvendige beregninger på regnemaskinen for at nå frem til prøvekoncentrationerne.

TILSIGTET ANVENDELSE

Quidel CIC-Raji –Cell Replacement Enzymimmunoassay måler immunkomplekser, der indeholder C3-aktiveringsfragmenter i humant serum og plasma.

OPSUMMERING OG FORKLARING

Vigtigheden af de cirkulerende immunkomplekser (CIC) og deres sammenhæng med forskellige sygdomme har været genstand for forskning igennem mange år. Dannelsen af immunkomplekser er en beskyttende, vedvarende og som regel godartet proces i et normalt fungerende immunsystem. CIC fjernes fra kredsløbet i den normale vært ved hjælp af en række komplekse biokemiske, enzymatiske og cellulære processer. Effektiv udrensning af flere CIC'er kræver aktivering af komplementet. Komplementaktivering resulterer i deponering af C3-fragmenter inden i immunkomplekset efterfulgt af en forstærket elimering ved hjælp af fagocytiske celler i det reticuloendoteliale system. Ved særlige sygdomstilstande, hvortil kendskabet stadigvæk er begrænset, kan det forekomme at immunkomplekserne ikke elimineres effektivt fra kroppen. Ved disse lidelser kan immunkomplekserne akkumuleres og initiere en komplementafhængig beskadigelse af forskellige organer og væv. Denne aktivering af komplementet kan sætte gang i en række potentielt destruktive hændelser i vævten, heriblandt produktion af anaphylatoxin, cellelysis, leukocytstimulering og aktivering af makrofager og andre celler.¹ Når immunkomplekserne hæftes til blodkarrenes vægge eller til cellemembranerne, kan der forekomme ødelæggelse af normalt væv som i visse tilfælde af glomerulonephritis.

Visse egenskaber ved CIC påvirker deres potentielle patogenicitet. Særlig vigtig er: (1) Antigenets beskaffenhed, størrelse og koncentration, (2) Antistoffets beskaffenhed, størrelse og koncentration, (3) Hastigheden hvormed dannelse og fjernelse af immunkomplekser foregår.^{1,2}

Cirkulerende immunkomplekser er blevet målt ved en række tilstande: For eksempel infektioner, autoimmune forstyrrelser, trauma og neoplastiske proliferative sygdomme. De seneste undersøgelser peger på, at CIC-bestemmelse kan være betydningsfuld ved evalueringen af visse lidelser og sommetider ved måling af en behandlings effektivitet. Dette gælder specielt for systemisk lupus erythematosus (SLE) samt ved nogle former for reumatoid arthritis (RA).^{3,4} Den første sygdomstilstand der blev forbundet med dannelse af immunkomplekser, var serumsygdom som blev beskrevet af von Pirquet i starten af 1900-tallet. Siden da er forhøjede CIC-niveauer blevet beskrevet i sammenhæng med autoimmune

sygdomme (SLE, SLE-relateret syndrom, RA) glomerulonephritis, neoplastiske sygdomme (Hodgkins, leukæmi) bakterieinfektioner (subakut bakteriel endocarditis, spædalskhed), parasitinfektioner (malaria, schistosomiasis) og virale infektioner (hepatitis, mononukleose).

Der er blevet beskrevet over 40 analyseteknikker til detektion og kvantificering af CIC. De beskrevne testmetoder omfatter Raji Cell-assay, test for C1q-afvigelse, konglutintest, væskefase-C1q bindingsprocedurer, rheumatoidfaktor-analyser, PEG-precipitintest, faststof-C1q-analyser.^{1,5} Da størrelsen og de fysiokemiske egenskaber for CIC varierer markant, er ingen af disse analyser blevet accepteret som en standard. En samarbejdende undersøgelse sponsoreret af World Health Organization fra 1978 påviste, at ingen enkeltstående metode var egnet for samtlige mistænkte sygdomstilstande, og det anbefalede at der anvendes mindst to forskellige analyseteknikker, for at en tilstrækkelig måling af CIC kan foretages.

PROCEDURENS PRINCIP

Fragmenter af den tredje komplementdel, C3, bindes ofte kovalent til komplementaktiverende immunkomplekser. Raji-celler som er blevet udvundet fra en kontinuert B-lymfocytkultur-cellelinie, indeholder CR2-komplementreceptorer som binder iC3b-, C3d-, g- og C3d-fragmenter af aktiveret C3.^{6,7,8} Raji Cell CIC-analysen er baseret på Raji-celle-CR2-receptorernes evne til at binde de immunkomplekser, der indeholder disse C3-fragmenter.⁹ Quidel CIC-Raji Cell Replacement Enzymimmunoassay måler også CIC-holdige C3-fragmenter ved hjælp af et immobiliseret monoklonalt antistof der specifikt binder iC3b, C3d,g og C3d aktiveringsfragmenter af C3 på en måde der er analog med Raji-cellelernes CR2-bindingreaktion.

I det første trin tilsættes standarder og serum- eller plasma-prøver, der er fortyndet i komplement-prøvefortynder, til mikrobrønde som er coatede med monoklonale antistoffer mod humane C3-fragmenter, hvorefter de inkuberes. Under denne inkubering bliver immunkomplekser indeholdende C3-aktiveringsfragmenter opfanget af fastfaseantistoffet. Efter inkubering fjernes ubundne serum- eller plasmaproteiner i en vascecyklus.

I det andet trin tilsættes peberrodperoxidase og (HRP)-konjugeret muse-anti-humant IgG til hver prøvebrønd og der inkuberes. Under denne inkubering binder konjugatet til immunkomplekserne, som nu er bundet til mikrobrøndene. Det ubundne konjugat fjernes i en vascecyklus.

I det tredje trin tilsættes et enzymsubstrat til hver prøvebrønd. Det bundne HRP-konjugerede antistof reagerer med det kromogene substrat, så der dannes en grøn farve. Efter inkubering tilsættes en reagens for at standse farveudviklingen.

Absorbansen (A_{405} værdierne) for standard og testprøver måles med et spektrofotometer. Intensiteten på den fremkomne grønne farve er proportional med mængden af CIC, der binder til den faste fase. Der genereres en standardkurve ved at plote de opnåede A_{405} værdier for hver standard, op imod dens angivne koncentration. Immunkompleksskoncentrationen i prøven bestemmes ud fra standardkurven. Resultaterne udtrykkes som mikrogram serum-behandlede, varme-aggregerede, humane gammaglobulin-ækvivalenter (HAGG) per ml ($\mu\text{g Eq/ml}$). For at et positivt CIC-resultat kan bekræftes, kan prøven analyseres efter at være fortyndet med CIC-Raji Bekræftelsesfortynder som indeholder blokerende antistoffer, hvis specificiteter ligner dem fra det immobiliserede antistof fra mikrobrønden.

LEVEREDE MATERIALER OG REAGENSER

CIC-Raji –Cell Replacement EIA-kittet indeholder følgende:

A	CIC-Raji-standarder	Del A9513–A9515	1 stk, 2 ml
B	Hver indeholder en kendt mængde serum-behandlet, varmeaggregeret, humant gammaglobulin		
C	(HAGG) i PBS, 2,5 % stabilisatorer, 0,01 % thimerosal.		
1	Mikroplade	Del A9512	12 stk
	96-brønde med holder og stativ bestående af 8-brøndstrips coated med mus-anti-humane C3-fragmenter i en forsejlet foliepose med genlukning.		
2	Stopopløsning	Del A3673	6 ml
	Indeholder 250 mM oxalsyre.		
3	20X Vasceopløsningskoncentrat	Del A3674	2 stk, 50 ml
	I fortyndet tilstand indeholder hver fosfatbufferjusteret saltvand (PBS), 0,05 % Tween-20™, og 0,01 % thimerosal.		
4	Komplement-prøvefortynder	Del A3670	50 ml
	Indeholder PBS, 2,5 % stabilisatorer, 0,035 % ProClin® 300.		

60

5	Substratfortynder	Del A3672	25 ml
	Indeholder 0,1 M citratbuffer og 0,05 % H_2O_2 .		
6	Substratkoncentrat	Del A3671	1,5 ml
	Indeholder 0,7 % 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsyre), diammoniumsalt.		
7	CIC-Raji-konjugat	Del A9516	2 stk, 3 ml
	Indeholder peroxidase-konjugeret mus-anti-humant IgG i suspension i en HRP-stabiliserende buffer med konserveringsmiddel.		
8	CIC-Raji Bekræftelsesfortynder	Del A9517	2 stk, 12 ml
	Indeholder PBS, 2,5 % stabilisatorer, antihumant C3-fragment-antistof, 0,035 % ProClin® 300.		

Tween-20™ er et varemærke tilhørende Atlas Chemical Industries, Inc.
ProClin® er et registreret varemærke tilhørende Rohm and Haas Company.

NØDVENDIGE, MEN IKKE MEDLEVEREDE MATERIALER

Timer (60 minutter)

Regnemaskine eller andet beregningsudstyr til validering af analysen

Rene, ubrugte mikroplader og/eller testrør og -stativer

Beholder til vascebufferfortynder

Vasceflaske eller andet vascesystem til immunanalyse

Justerbar multikanalpipette (8 eller 12 kanaler) eller repeat-mikropipetter (valgfri)

Rene pipetter, 1 ml, 5 ml og 10 ml

Mikropipetter og pipettespidser

Pladelæser til optiske densitets aflæsninger ved A_{405} mellem 0,0 og 2,0

Ionbyttet eller destilleret vand

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

- Kun til *in-vitro*-diagnostisk brug.
- Følg gældende retningslinier for omgang med biologisk risikomateriale ved håndtering af dette kit og alle patientprøver.
- Beholdere og ikke anvendt indhold bortskaffes i overensstemmelse med de nationale, regionale og lokale bestemmelser.
- Brug de leverede reagenser som en integreret enhed, inden udløbsdatoen på pakningens etiket.
- Opbevar analysereagenserne som anvist.
- Når væskerne tilsættes til eller aspireres fra mikrobrønde, skal det undgås at skrabe eller berøre brøndenes bund.
- Anvendelse af andre inkuberingstider og -temperaturer end dem, der er anført i afsnittet Procedure, kan medføre fejlagtige resultater.
- Mikrobrønde må ikke tørre når analysen er begyndt.
- Mikrobrønde må ikke anvendes til mere end en test.
- Brug af multikanalpipetter eller repeat-pipetter anbefales for at sikre en rettidig tilsætning af reagenser.
- Tilsæt prøver og standarder præcist for at sikre en nøjagtig prøveudmåling. Foretag omhyggelig afpipettering og kun ved hjælp af kalibreret udstyr.
- Denne analyse kan udføres med enhver valideret vaskemetode.
- Korrekt opsamling og opbevaring af testprøverne er vigtig for at opnå nøjagtige resultater.
- Undgå mikrobiel kryskontaminering af prøver, reagenser eller materialer. Kontaminering kan medføre ukorrekte resultater.
- Thimerosal anvendes som konserveringsmiddel. Tilfældig kontakt med eller indtagelse af buffer eller reagenser indeholdende thimerosal, kan medføre overfølsomhedsreaktioner, herunder irritation af hud, øjne eller mund. Søg læge hvis der opleves symptomer. Udsættelse for thimerosal kan have potentiel mutagen virkning. Undgå kontakt med stærke syrer og baser.
- ProClin® 300 anvendes som konserveringsmiddel. Tilfældig kontakt med eller indtagelse af buffer indeholdende ProClin, kan medføre irritation af hud, øjne eller mund. Anvendes god laboratoriepraksis så risiko for udsættelse nedsættes. Søg læge hvis der opleves symptomer.

- Substratkoncentratet er lysfølsomt. Undgå langvarig udsættelse for skarpt eller direkte lys. Opbevar reagenserne mørkt, når de ikke er i brug.
- For at undgå aerosoldannelse under vasken, skal der bruges et instrument til at aspirere vaskeopløsningen ned i en flaske med blegemiddel til husholdningsbrug.
- Varme-inaktiverede, hyperlipæmiske eller kontaminerede prøver kan give fejlagtige resultater.

OPBEVARING

Opbevar det uåbnede kit ved 2–8 °C. I åbnet tilstand kan 20X vaskeopløsningskoncentrat opbevares ved 2–30 °C.

Efter valg af reagenser eller materialer til analysen, stilles de reagenser, der ikke skal anvendes omgående, tilbage til deres opbevaringstemperatur. Reagenser og materialer til analysen skal bringes op på stuetemperatur (15–30 °C) inden brug.

INDIKATIONER OM USTABILITET ELLER FORRINGELSE AF REAGENSERNE

Substratkoncentratet kan variere i farve, fra farveløs til lyse- eller mørkegrøn. Dette har ikke betydning for ydeevnen. Dog skal nyforberedt substratopløsning være farveløs eller lysegrøn. En mørkegrøn farve indikerer at substratopløsningen er blevet forringet og derfor skal smides ud, hvorefter en ny opløsning forberedes i rene glasvarer.

Uklarhed eller misfarvning af fortyndet vaskeopløsning indikerer, at der er sket en forringelse af den pågældende reagens. Hvis dette forekommer, skal opløsningen smides ud.

PRØVEUDTAGNING- OG OPBEVARING

Håndtering og bortskaffelse af alle prøver skal foregå i overensstemmelse med gældende retningslinier.

Serum- eller plasmaprøver skal udtages under aseptiske forhold og forberedes ved hjælp af standardteknikker for kliniske laboratorieprøver.¹⁰ Prøverne må ikke varme-inaktiveres. Partikulært materiale skal fjernes fra prøven ved lavhastighedscentrifugering før analysen.

Prøverne kan opbevares på is ved ca. 0 °C i op til 6 timer. Hvis prøverne skal opbevares i længere tid, skal de fryses ved -70 °C eller lavere (opbevaring ved -20 °C kan medføre fejlagtige resultater).

KLARGØRING AF REAGENS

Se Tabel 1 for påkrævet mængde af substratopløsning og antal mikroanalyse-strips per test. Efter at de nødvendige reagenser og materialer er taget fra, stilles de reagenser der ikke skal anvendes omgående tilbage til deres opbevaringstemperaturer (Se OPBEVARING). Alle reagenser og materialer til analysen skal bringes op på stuetemperatur (15–30 °C) inden brug.

- Vaskeopløsning.** Bland vaskeopløsningskoncentratet ved at vende flasken på hovedet adskillige gange. Hvis 20X vaskeopløsningskoncentratet er blevet opbevaret ved 2–8 °C, kan der være dannet krystaller. Krystallerne opløses ved at opvarme flasken i vandbad på 37–50 °C indtil alle krystallerne er opløst, hvorefter det blandes ved godt. Vaskeopløsningen klargøres ved at fortynde hele indholdet af en flaske med 20X vaskeopløsningskoncentratet med en liter destilleret eller ionbyttet vand. Bland godt. Vaskeopløsningen er stabil i 30 dage når den opbevares i en ren beholder ved 2–8 °C. Hvis der opstår uklarhed eller misfarvning, smides reagensen ud.
- Valg af strips mikroanalysen.** Bestem hvor mange mikrostrips der er påkrævet til analysen ud fra Tabel 1. Fjern stripholderen fra den samlede plade. Fjern unødvendige strips og læg dem i en opbevaringspose som forsegles og opbevares ved 2–8 °C. De strips der skal anvendes i analysen, fastgøres.
- Fortynding af prøver**
Forsigtig: Håndtér alle prøver som værende potentielt infektiøse. Brug ikke varme-inaktiverede eller kontaminerede prøver.
Bestem antallet (N) af prøver der skal analyseres. Afmærk testrørene #1 til #N med etiketter og notér hvilke prøver der svarer til de enkelte rør på det medfølgende dataark.
Klargør en opløsning i forholdet 1:50 af hver prøve idet der anvendes komplementprøvefortynder (f.eks. 10 µl prøve blandet med 490 µl komplementprøvefortynder). Bland godt, men undgå at der dannes skum eller luftbobler. Fortyndede prøver må ikke genbruges eller gemmes.

- Tilsætning af fortyndede prøver til mikrotiterbrøndene.** De fortyndede prøver, standarder, kontroller og buffer kan tilsættes til brøndene på en af to måder (se trin 5 i ANALYSEPROCEDURE). Ved små analysekørsler hvor kun få prøver skal analyseres, kan de fortyndede prøver og andre reagenser tilsættes direkte til de tildelte brønde med en mikropipette (100 µl/brønd). Ved små og store kørsler, men især store kørsler, anbefales det at bruge en multikanalpipette ved tilsætning af prøver som følger.
(En multikanalpipette kan anvendes til at lette tilsætningen af konjugat, substrat og stopopløsning.)

For at standarder, kontroller, og fortyndede prøver kan tilsættes til mikrotiterbrøndene så hurtigt som muligt, kan dette foretages ved en replika-udpladningsteknik. I stedet for at tilsætte 100 µl fra hver standard, kontrol eller fortyndet prøve til de enkelte antistof-coatede brønde, kan 120 µl–130 µl fra hver opløsning tilsættes de individuelle brønde på en blindplade (ikke vedlagt) der svarer til det ønskede endelige EIA-mønster. Efter at alle opløsningerne er tilsat mikrotiterbrøndene på blindpladen, skal 100 µl hurtigt overføres fra hver blindprøvebrønd til de antistof-coatede brønde med en multikanalpipette. For at undgå mulig krydskontaminering skal pipettespidserne skiftes hver gang der overføres prøver med en anden sammensætning.

- CIC-Raji Bekræftelsesfortynder (valgfri).** Hvis der ønskes bekræftelse på et positivt resultat, bestemmes det antal (N) prøver, der skal bekræftes. Afmærk testrørene #1c til #Nc med etiketter og notér dette. Klargør en opløsning i forholdet 1:50 med CIC-Raji Bekræftelsesfortynder. En prøve, der er fortyndet i CIC-Raji Bekræftelsesfortynder, skal køres **samtidigt** med en prøve der er fortyndet i samme forhold i komplementprøvefortynder.
- Klargøring af substratopløsning.** *Klargøres lige før anvendelse* Bestem den nødvendige mængde substratopløsning ud fra Tabel 1 nedenfor. Klargør substratopløsningen ved at tilsætte 50 µl substratkoncentrat til hver ml substratfortynder. Bland godt.
- CIC-kontroller.** CIC-RCR-positive og -negative kontroller kan fås separat fra Quidel (CIC-RCR Controls catalog. #A014). De skal forberedes i forvejen efter anvisningen angivet på indlægssedlen. Se også afsnittet KVALITETSKONTROL på indlægssedlen.

TABEL 1
KRÆVET TIL ANALYSEN

Brønde ¹	8-brønds strips	Påkrævet Substratopløsning (ml)	Substratfortynder (ml)	Substratkoncentrat (µl)
16	2	1,6	2,0	100
24	3	2,4	3,0	150
32	4	3,2	4,0	200
40	5	4,0	5,0	250
48	6	4,8	5,0	250
56	7	5,6	6,0	300
64	8	6,4	7,0	350
72	9	7,2	8,0	400
80	10	8,0	9,0	450
88	11	8,8	9,0	450
96	12	9,6	10,0	500

¹ Bestem antallet af prøver der skal analyseres, og læg elleve (11) brønde til for de tre standarder samt lave og høje kontroller der skal analyseres (i duplikat) og en blindprøvebrønd. Det anbefales, at standarder og -kontroller analyseres i duplikat i separate mikroanalyse-strips hvis det er muligt.

ANALYSEPROCEDURE

Læs hele indlægssedlen inden analysen startes.

Se KLARGØRING AF REAGENS, og ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER inden der fortsættes.

- Notér positionen for de mikrobrønde, der svarer til blindprøvebrøndene, alle prøver, standarder og kontroller, såvel som de anførte lot-numre fra hættelasetiketterne. Afmærk et at hjørnerne på mikropladen til orientering.

2. Klargør mikrostrips til analysen som følger:
 - a. Rehydrér mikrobrøndene ved at tilsætte ca. 300 µl vaskeopløsning til hver brønd med en vaskeflaske eller en andet påfyldningsudstyr.
 - b. Inkubér 1–2 minutter ved stuetemperatur (15–30 °C).
 - c. Aspirér indholdet fra hver brønd.
 - d. Vend pladen om og læg den ovenpå trækpapir idet der bankes på den så evt. tilbagebleven væske fjernes. Gentag denne proces to gange. Brøndene må ikke tørre.
3. Tilsæt 100 µl komplementprøvefortynder til de brønde der vil blive brugt som blindprøver i pladelæseren.
4. Tilsæt 100 µl af hver CIC-Raji Standard (A, B og C) til duplikatbrøndene.
5. Tilsæt 100 µl af hver fortyndet prøve til dens tildelte mikrobrønd. Se *KLARGØRING AF REAGENS*, Trin 4.
6. Inkubér i 60 ± 1 minutter ved stuetemperatur (15–30 °C).
7. Vask mikrobrøndene som følger:
 - a. Efter inkuberingen i trin 6 (og i trin 9 nedenfor) fjernes væsken fra hver brønd.
 - b. Tilsæt ca. 300 µl vaskeopløsning til hver brønd med en vaskeflaske eller en andet påfyldningsudstyr.
 - c. Inkubér brøndene i 1 minut ved stuetemperatur (15–30 °C).
 - d. Fjern indholdet fra hver brønd.
 - e. Tilsæt ca. 300 µl vaskeopløsning til hver brønd.
 - f. Fjern væsken fra hver brønd.
 - g. Gentag trin e-f yderligere tre gange.
 - h. Efter denne femte vaskecyklus vendes pladen om og lægges ovenpå trækpapir idet der bankes på den gentagende gange så overskydende væske fjernes. Gentag denne proces to gange
8. Dispensér 50 µl af CIC-Raji-konjugatet ned i hver vasket prøvebrønd, inkl. blindprøvebrøndene, med en multikanalpipette.
9. Inkubér mikrostripsene i 30 ± 1 minutter ved stuetemperatur (15–30 °C). **Klargør substratopløsningen under denne inkubering (se *KLARGØRING AF REAGENS*, trin 6).**
10. Vask mikrobrøndene efter de 30 minutters inkubering i trin 9 som beskrevet ovenfor.
11. Straks efter vaskeproceduren dispenseres 100 µl nyforberedt substratopløsning ned i hver brønd, inkl. blindprøvebrøndene, med en multikanalpipette eller en repeat-pipette.
12. Inkubér mikrostripsene i 30 ± 1 minutter ved stuetemperatur (15–30 °C).
13. Tilsæt 50 µl stopopløsning til hver brønd med en multikanalpipette eller en repeat-pipette så den enzymatiske reaktion standses. Stopopløsningen skal tilsættes brøndene i samme rækkefølge og ved samme hastighed som substratopløsningen. Bank let på pladen så farveudviklingen spredes jævnt.
14. Bestem absorbansen ved aflæsning ved 405 nm (A_{405} værdi) af hver analysebrønd inden for en time efter tilsætning af stopopløsningen (trin 13) idet der foretages en blindprøvekorrigering i overensstemmelse med det anvendte spektrofotometriske system.
15. Gem stripholderen og stripstativet til senere brug.
16. Bortskaf de resterende fortyndede prøver, substrater og brugte mikroanalysestrips (Se *ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER*, punkt 3) Gem stripholderen og stripstativet til senere brug.

ANBEFALET METODE TIL BEKRÆFTELSE

Hvis det er nødvendigt med en uafhængig bekræftelse af et positivt resultat, eller hvis et positivt resultat ikke stemmer overens med den kliniske fortolkning, kan den positive prøve genanalyseres ved en bekræftende analyse. Et negativt resultat kan ikke bekræftes. Bekræftelsesmetoden anvender en prøvefortynder (CIC-Raji Bekræftelsesfortynder) som indeholder antihumane C3-fragment-antistoffer. For at bekræfte et positivt resultat skal en alikvot af prøven fortyndes i CIC-Raji Bekræftelsesfortynder og en anden alikvot fortyndes tilsvarende i komplement-prøvefortynder. Begge prøver skal derefter analyseres i overensstemmelse med den sædvanlige procedure for Quidel CIC-Raji –Cell Replacement EIA-procedure. Se afsnittene *KLARGØRING AF REAGENS* og *TOLKNING AF RESULTATER* for yderligere anvisninger.

KVALITETSKONTROL

For at leve op til god laboratoriepraksis anbefales det at positive og negative kontroller medtages i det daglige program. Kontroller til Quidel CIC-Raji –Cell Replacement Enzymimmunoassay kan fås fra Quidel til dette formål (CIC-RCR Controls, catalog #A014) og skal anvendes i overensstemmelse med anvisningen i indlægssedlen. Hvis positive og/eller negative kontroller ikke kan udføres korrekt, kontaktes Quidel Teknisk support hurtigst muligt.

Udover kontroller medfølger desuden *ANBEFALET METODE TIL BEKRÆFTELSE* og *VALIDERINGSPARAMETRE* med Quidel CIC-Raji –Cell Replacement Enzymimmunoassay.

Ved at anvende kontrollerne, standarderne med validering og bekræftelsesmetoden, sikres opnåelsen af et reproducerbart og nøjagtigt resultat.

FORTOLKNING AF RESULTATER

Beregning af resultater

Beregninger: Standardkurven genereres ved at bruge den blind-fratrukkede A_{405} -værdi fra hver CIC-Raji-standard på y-aksen imod de tildelte mikrogram, serum-behandlede, varme-aggregerede gammaglobulin-ækvivalenter/ml ($\mu\text{g Eq/ml}$), der er anført, på hætteglassets etiket for hver standard på x-aksen. Efter lineær regression skal den generede standardkurve opfylde valideringskravene (se nedenfor). Prøvekoncentrationerne beregnes derefter direkte ud fra standardkurven. De fleste computere og regnemaskiner er i stand til at udføre disse beregninger.

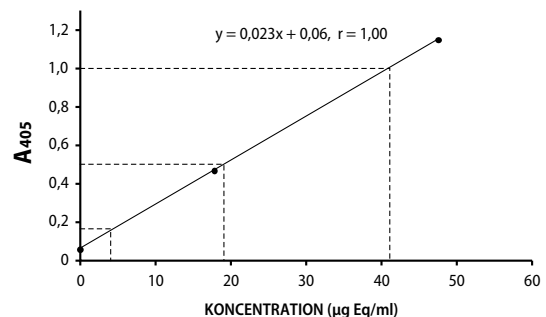
Data kan også indteges manuelt i diagrammet hvoraf værdierne ($\mu\text{g Eq/ml}$) fra analyseprøverne kan aflæses ud fra standardkurvens best-fit-linie. Et eksempel på en typisk standardkurve er vist i Figur 1.

Beregning af bekræftende analyse: For at et positivt resultat kan bekræftes, skal den immunkomplekskoncentration (CIC), der blev påvist i prøven, der var fortyndet i CIC-Raji Bekræftelsesfortynder, divideres med den immunkomplekskoncentration der blev målt i prøven, der var fortyndet i komplementprøvefortynder, så der foreligger et forhold.

$$\text{ratio} = \frac{[\text{CIC}] \text{ in CIC-Raji Confirmation Diluent}}{[\text{CIC}] \text{ in Complement Specimen Diluent}}$$

Eksempel på standardkurve

FIGUR 1



Prøve	A_{405}	$\mu\text{g Eq/ml}$
Standard A	0,06	0
Standard B	0,46	18
Standard C	1,15	48
Prøve 1	0,15	3,9
Prøve 2	0,50	19,1
Prøve 3	1,00	40,9
$r = 1,00$	$m = 0,023$	$b = 0,06$

Validering

Bestem hældningen, skæringspunktet og korrelationskoefficienten for den udledte best-fit-linie. Værdierne skal ligge inden for de specificerede områder, for at analysen kan kvalificeres.

korrelationskoefficient (r): > 0,95
hældning (m): 0,013 til 0,034
y-skæringspunkt (b): (-)0,07 til (+)0,10

De fleste normale individer udviser målbare CIC-niveauer. Da der ikke findes et accepteret normalt CIC-niveau, skal brugeren fastlægge egne normalniveauer. Som en retningslinie kan det anføres, at CIC-niveauer baseret på de resultater, der er opnået fra de normale populationer, som beskrevet under **FORVENTEDE VÆRDIER**, er som følger:

Normale resultater: Værdier der er mindre end eller lig med 15 µg Eq/ml, regnes for normale CIC-niveauer.

Anormale resultater: Værdier der er højere end eller lig med 20 µg Eq/ml, regnes for anormale CIC-niveauer. Prøver hvor de målte CIC-koncentrationer var højere end CIC-Raji-standard C, skal rapporteres som højere end den tildelte CIC-Raji Standard C-koncentration, der er anført på hætteglassets etiket.

Tvetydige værdier: Værdier der er højere end 15 µg Eq/ml og lavere end 20 µg Eq/ml, regnes for tvetydige. Disse prøver kan genanalyseres, eller nye prøver kan udtages og analyseres hvis dette er indikeret. Hvis en tvetydig prøve fortsat er tvetydig, skal prøven regnes for signifikant højere end normalt og kan rapporteres som anormal.

Bekræftelsesresultater: Hvis forholdet ligger lavere end 0,5, er det positive CIC-resultat bekræftet. Med andre ord, en reduktionen på mere end 50% i den foreliggende CIC-koncentration, bekræfter et positivt resultat.

Fra tid til anden kan det forekomme, at en positiv prøve ikke bliver bekræftet. Ikke-bekræftede prøver forekommer bla. som følge af: (1) fejlhåndterede prøver (f.eks. kontaminerede eller varme-inaktiverede) eller (2) prøver indeholdende humane IgG-antistoffer der binder til muse-IgG. Sådanne prøver er dog ikke nødvendigvis negative for CIC. Det materiale der tilsyneladende giver falsk-positive resultater, kan dække over samtidigt forekommende CIC som, hvis det var til stede alene, ville give bekræftede positive CIC-resultater.

PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Denne test måler immunkomplekser eller ophobninger af humant IgG indeholdende C3 aktiveringsfragmenter. Derfor skal tilstande der fremmer aggregering af IgG eller komplementaktivering, undgås under prøveudtagning og behandling.

FORVENTEDE VÆRDIER

Der blev taget halvtreds (50) udvalgte sera fra et referenslaboratorie, som modtager prøver fra hele USA. Disse sera blev testet i Quidel CIC-Raji –Cell Replacement EIA og i referenslaboratoriets Raji Celle-analyse. Der var 92 % overensstemmelse mellem de to analyser ved målingen af CIC-forekomsten.

Sera fra toogtreds (62) SLE-patienter fra to klinikker i det østlige USA og fra niogtyve (29) RA-patienter fra en reumatologiklinik i det sydlige USA blev analyseret i Quidel CIC-Raji –Cell Replacement EIA. Desuden blev der analyseret sera fra seksogtyve (26) normale individer fra to SLE-klinikcentre og fra femogtyve (25) klinisk, non-autoimmune patienter fra den reumatologiske klinik. Gennemsnitskoncentrationerne for CIC, standardafvigelse og hyppighedsfordelingen for hver population er anført i Figur 2, 3 og 4.

Fig. 2 CIC-RAJI CELL REPLACEMENT EIA
Systemisk Lupus Erythematosus-population

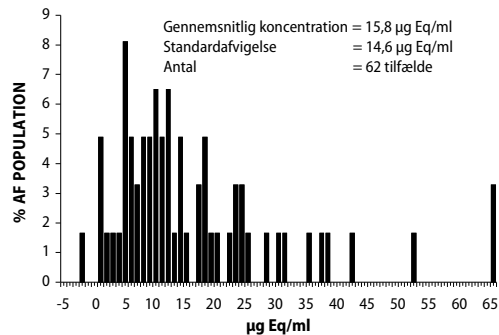


Fig. 3 CIC-RAJI CELL REPLACEMENT EIA
Rheumatoid arthritis-population

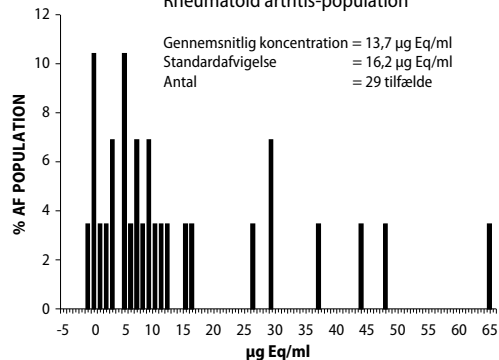
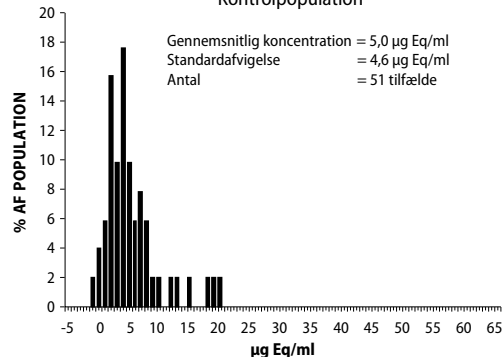


Fig. 4 CIC-RAJI CELL REPLACEMENT EIA
Kontrolpopulation



Graden af sygdomsaktivitet blev tildelt uafhængigt af nogen form for CIC-laboratedata på det ene SLE-center og RA-center. Denne bedømmelse blev udført af de behandlende læger. For at sikre konsekvens i rapporteringen blev en læge på hvert forsøgscenter bedt om at efterse patientjournalerne og den tildelte sygdomsaktivitet. En RA-patient blev beskrevet som værende i et fremskredent stadie af "udbrændthed". CIC-resultaterne for denne patient lå på 1 µg Eq/ml. Da der ikke var RA-patienter med lignende resultater, blev dette individuelle resultat ikke medtaget i Tabel 2. Tabel 2 viser det observerede forhold mellem CIC målt ved Quidel CIC-Raji –Cell Replacement Enzymimmunoassay og patienternes sygdomsaktivitet.

TABEL 2
RESULTATERNE FRA CIC-RAJI –CELL REPLACEMENT ASSAY
SAMMENLIGNET MED SYGDOMSAKTIVITETEN

	% Abnormal ¹		
	Lav aktivitet	Moderat aktivitet	Høj aktivitet
SLE	8 % (1/12)	36 % (4/11)	79 % (11/14)
RA	0 % (0/4)	19 % (3/16)	50 % (4/8)

¹Tallene i parentes (efter hver % abnormal) indikerer det antal patienter, der blev påvist som anormale, divideret med antallet af patienter med den pågældende sygdomsaktivitet.

PRÆSTATIONSKARAKTERISTIKA

Nøjagtighed

Til standardisering af analysen blev anvendt en WHO Immunkompleksstandard, dvs. tetanus-toxoid-anti-tetanus toxoid-komplekser der var præinkuberede i friskt, normalt, humant serum. Med henblik på at teste analysens nøjagtighed blev fem fortyndinger med WHO Standard analyseret i tripliket ved ni kørsler med Quidel-kittet.

De analyserede koncentrationer viste en korrelation på 0,99 med de kendte værdier.

Reproducerbarhed

Patientprøver og kit-standarder blev testet ved ni analysekørsler med to forskellige kit-lots. Hver blev testet i tripliket inden for hver analysekørsel. Den gennemsnitlige variation mellem hver kørsel for prøve- og kitstandarder fremgår af Tabel 3 som inter-assay-variation. Den gennemsnitlige variation mellem hver kørsel for prøve- og kitstandarder fremgår af Tabel 3 som intra-assay-variation.

TABEL 3
ANALYSEREPRODUCERBARHED

	Gennemsnit (µg Eq/ml)	Intra-assay (%CV)	Inter-assay (%CV)
Prøve 1	56	5	9
2	13	9	23
Standard 1	4	8	30
2	11	7	15
3	23	5	9
4	32	4	6
5	40	5	6
6	48	4	5
7	59	3	4

Sensitivitet

Quidel CIC-Raji –Cell Replacement EIA måler mindst 4 µg Eq/ml eller højere for hver CIC-analyt når sammenlignet med WHO-standard.

Specifitet

De enoghalvtreds (51) kontrolsera der er beskrevet i afsnittet *PRØVEKSEMPLAR VÆRDIER*, blev testet i Quidel CIC-Raji –Cell Replacement Assay. Kun tre blev rapporteret som positive (konsekvent højere end 15 µg Eq/ml) hvilket giver en specifitet på 94 %.

ASSISTANCE

Hvis du ønsker at afgive bestilling eller har tekniske spørgsmål, skal du rette henvendelse til en repræsentant for Quidel på +1 408-616-4301 fra mandag til fredag mellem klokken 8.00 og 17.00 (Pacific time).

Bestilling kan også afgives pr. fax på +1 408-616-4310.

For serviceydelse uden for USA kontaktes den lokale distributør.

SNABBGUIDE TILL ANALYSENS STEG

Läs hela produktbladet innan analysen påbörjas.

Preliminära förberedelser

1. Bered tvättlösning.
2. Späd testproverna.

Analysförfarande

3. Rehydrera mikroanalysbrunnarna.
4. Tillsätt 100 µl komplementprovspädningsmedel till tom brunn/tomma brunnar.
5. Tillsätt 100 µl av varje standard och testprov till tillämpliga brunnar.
6. Inkubera i 60 minuter vid rumstemperatur (15–30 °C).
7. Tvätta mikroanalysbrunnarna fem gånger.
8. Tillsätt 50 µl CIC-Raji-konjugat till varje testbrunn.
9. Inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur. (Bered substratlösningen under denna inkubation.)
10. Tvätta mikroanalysbrunnarna fem gånger.
11. Tillsätt 100 µl substratlösning till varje testbrunn.
12. Inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur.
13. Tillsätt 50 µl stopplösning till varje testbrunn.
14. Mät absorbansen vid 405 nm inom 60 minuter.

Beräkningar

15. Plotta absorbansen relativt standardkoncentrationen på det medföljande diagramappret, eller lägg in värdena i räknaren för linjär regressionsanalys.
16. Läs av testprovkoncentrationerna direkt från diagrammet, eller genomför erforderliga beräkningar på räknaren, för att få fram provkoncentrationerna.

AVSEDD ANVÄNDNING

Quidels enzymimmunoanalys för CIC-Raji-cellersättning mäter immunkomplex innehållande C3-aktiveringsfragment i humant serum och plasma.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

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

Vissa egenskaper hos CIC inverkar på den potentiella patogeniciteten. Speciellt viktigt är följande: (1) antigenens art, storlek och koncentration, (2) antikroppens art, storlek och koncentration och (3) immunkomplexens bildningshastighet och eliminering.^{1,2}

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

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

FÖRFARANDETS PRINCIP

Fragment av den tredje komplementkomponenten, C3, binds ofta kovalent till komplementaktiverande immunkomplex. Rajiceller, som härleddes från en kontinuerlig B-lymfocytodlingscellslinje, bär CR2-komplementreceptorer som binder iC3b-, C3dg- och C3d-fragmenten av aktiverat C3.^{6,7,8} Rajicell-CIC-analysen bygger på Rajicell-CR2-receptorens förmåga att binda immunkomplex innehållande dessa C3-fragment.⁶ Quidels enzymimmunoanalys för CIC-Rajicellersättning mäter även CIC-innehållande C3-fragment med hjälp av en immobiliserad monoklonal antikropp som specifikt binder iC3b-, C3dg- och C3d-aktiveringsfragmenten av C3 på ett sätt som är analogt med Rajicell-CR2-bindningsreaktionen.

I det första skedet tillsätts standarder och serum- eller plasmaprover som späts med komplementprovspädningsmedel till de mikroanalysbrunnar som är belagda med monoklonala antikroppar till humana C3-fragment och inkuberas. Under denna inkubation tas immunkomplex innehållande C3-aktiveringsfragment upp av fastfasantikropparna. Efter inkubationen avlägsnar en tvättcykel obundna serum- eller plasmaproteiner.

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

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

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

REAGENSER OCH MATERIAL SOM INGÅR

EIA-kitet för CIC-Rajicellersättning innehåller följande:

A	CIC-Rajistandarder	Art. A9513–A9515	2 ml/st
B	Var och en innehåller en känd kvantitet serumbehandlat, värmeaggregerat humant gammaglobulin		
C	(HAGG) i PBS, 2,5 % stabiliserare, 0,01 % thimerosal.		
1	Mikroanalysplatta	Art. A9512	12 av vardera
	96-brunnar med fäste och hållare, bestående av remсор med åtta brunnar, med mus-anti-humana C3-fragment i en återförslutbar foliepåse.		
2	Stopplösning	Art. A3673	6 ml
	Innehåller 250 mM oxalsyra.		
3	20 X-tvättlösningkoncentrat	Art. A3674	2 x 50 ml
	Efter spädning innehåller var och en fosfatbuffrad saltlösning (phosphate buffered saline – PBS), 0,05 % Tween-20 [™] samt 0,01 % thimerosal.		
4	Komplementprovspädningsmedel	Art. A3670	50 ml
	Innehåller PBS, 2,5 % stabiliserare, 0,035 % ProClin [®] 300.		
5	Substratspädningsmedel	Art. A3672	25 ml
	Innehåller 0,1 M citratbuffert och 0,05 % H ₂ O ₂ .		
6	Substratkoncentrat	Art. A3671	1,5 ml
	Innehåller 0,7 % 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-svavelsyra), diammoniumsalt.		

72

7	CIC-Rajikonjugat	Art. A9516	2 x 3 ml
	Innehåller peroxidkonjugerat (mus)anti-humant IgG löst i HRP-stabiliseringsbuffert med konserveringsmedel.		
8	CIC-Raji-bekräftelsespädningsmedel	Art. A9517	2 x 12 ml
	Innehåller PBS, 2,5 % stabiliserare, anti-humana C3-fragmentantikroppar, 0,035 % ProClin 300.		

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

MATERIAL SOM BEHÖVS MEN SOM INTE MEDFÖLJER

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

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSANVISNINGAR

1. För *in vitro*-diagnostik.
2. Hantera satsens innehåll och patientprover med försiktighet.
3. Behållare och oanvänt innehåll ska kasseras i enlighet med gällande lagar och bestämmelser.
4. Medföljande reagenser används som en enhet fram till det utgångsdatum som anges på förpackningen.
5. Förvara analysreagenser enligt anvisningen.
6. Undvik att skrapa eller beröra brunnarnas väggar vid tillsats av vätskor till eller aspirering av vätskor från mikroanalysbrunnarna.
7. Tillämpning av andra inkubationstider och temperaturer än dem som anges i avsnittet Förfarande kan leda till felaktiga resultat.
8. Låt inte mikroanalysbrunnarna torka när analysen har påbörjats.
9. Använd inte en mikroanalysbrunn för mer än ett test.
10. Användning av multikanal- eller repeterpipetter rekommenderas vid uppmätning av reagenser.
11. För korrekt provmätning ska exakta mängder prover och standarder tillsättas. Pipettera omsorgsfullt med kalibrerad utrustning.
12. Analysen utförs med någon validerad tvättmetod.
13. Korrekt provtagning och förvaring av testprover är av avgörande betydelse för korrekta resultat.
14. Undvik mikrobiell kontaminering eller korskontaminering av prover, reagenser eller material. Kontaminering kan leda till felaktiga resultat.
15. Thimerosal används som konserveringsmedel. Oavsiktlig kontakt med, eller sväljning av, buffertar eller reagenser som innehåller thimerosal kan leda till ökade överkänslighetsreaktioner, däribland retning av hud, ögon eller mun. Sök läkarhjälp i händelse av symptom. Exponering för thimerosal kan ha mutagena effekter. Undvik kontakt med starka syror och baser.
16. ProClin[®] 300 används som konserveringsmedel. Tillfällig kontakt med eller förtäring av buffertlösningar eller reagenser med ProClin kan orsaka irritation på hud, ögon och mun. Tillämpa god laboratoriepraxis för att reducera exponeringen. Sök läkarhjälp i händelse av symptom.
17. Substratkoncentratet är ljuskänsligt. Undvik långvarig exponering för starkt eller direkt ljus. Förvara reagenserna mörkt när de inte används.
18. Undvik aerosolbildning vid tvätt genom att använda en apparat som aspirerar tvättvätskan till en flaska innehållande ett kommersiellt blekmedel.
19. Värmeinaktiverade, hyperlipemiska eller kontaminerade prover kan leda till felaktiga resultat.

FÖRVARING

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

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

INDIKATIONER PÅ INSTABILITET HOS ELLER FÖRSÄMRING AV REAGENSER

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

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

PROVTAGNING OCH FÖRVARING

Hantera och kassera alla prover med försiktighet.

Alla prover ska tas aseptiskt och beredas med standardmetoder för klinisk laboratorietestning.¹⁰ Värmeinaktivera inte proven. Avlägsna eventuella partiklar från proven genom centrifugering med lågt varvtal före testning.

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

FÖRBEREDANDE AV REAGENS

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

- Tvättlösning.** Blanda 20 X-tvättlösningsskoncentratet genom att vända flaskan uppochner flera gånger. Om 20 X-tvättlösningsskoncentratet har förvarats vid en temperatur på 2–8 °C kan kristaller ha bildats. För att lösa upp kristallerna värmer man flaskan i ett vattenbad på 37–50 °C tills alla är upplösta och blandar därefter om omsorgsfullt. Bered tvättlösningen genom att späda ut hela innehållet i en av flaskorna med 20 X-tvättlösningsskoncentrat till en liter med destillerat eller avjoniserat vatten. Blanda omsorgsfullt. Tvättlösningen är stabil i 30 dagar vid förvaring i en ren behållare vid en temperatur på 2–8 °C. Vid missfärgning eller grumling ska reagensen kasseras.
- Välja mikroanalysremсор.** Betäm hur många mikroanalysremсор som behövs för analysen med hjälp av tabell 1. Ta bort remsfästet från den monterade plattan. Ta bort de remсор som inte behövs och placera dem i förvaringspåsen, återförslut påsen och återför den till förvaring vid en temperatur på 2–8 °C. Säkra de remсор som ska användas i analysen.

3. Provspädning

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

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

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

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

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

- CIC-Raji-bekräftelsepådningssmedel (valfritt).** Om bekräftelser av positiva resultat önskas beräknas hur många (N) prover som ska bekräftas. Märk provrören med nr. 1c till och med nr. Nc och registrera dem. Bered en spädning på 1:50 med användning av CIC-Raji-bekräftelsepådningssmedel. Ett prov som späts med CIC-Raji-bekräftelsepådningssmedel måste köras **samtidigt med** samma utspädning av provet i komplementprovspädningssmedel.
- Beredning av substratlösning.** Bered *alldes före användning*. Bestäm önskad volym substratlösning med hjälp av tabell 1 nedan. Bered substratlösningen genom att tillsätta 50 µl substratkoncentrat till varje ml substratpådningssmedel. Blanda omsorgsfullt.
- CIC-kontroller.** De positiva och negativa CIC-RCR-kontrollerna finns tillgängliga separat från Quidel (CIC-RCR-kontroller, katalognr. A014). De ska beredas i enlighet med anvisningarna i respektive förpackningsbilaga. Se även avsnittet **KVALITETSKONTROLL** i denna förpackningsbilaga.

TABELL 1
ANALYSBEHOV

Brunnar ¹	Remсор med åtta brunnar	Mängd substratlösning som behövs	Substrat–spädning–lösning (ml)	Substrat–koncentrat (µl)
16	2	1,6	2,0	100
24	3	2,4	3,0	150
32	4	3,2	4,0	200
40	5	4,0	5,0	250
48	6	4,8	5,0	250
56	7	5,6	6,0	300
64	8	6,4	7,0	350
72	9	7,2	8,0	400
80	10	8,0	9,0	450
88	11	8,8	9,0	450
96	12	9,6	10,0	500

¹ Beräkna hur många prover som ska testas och lägg till elva (11) brunnar för de tre standarder och den låga och höga kontroll som ska testas (i duplikat), samt en tom brunn. Vi rekommenderar att duplikatstandarderna och -kontrollerna testas på separata mikroanalysremсор om så är möjligt.

ANALYSFÖRFARANDE

Läs hela produktbladet innan analysen påbörjas.

Läs **REAGENSBEREDNING** och **VARNINGAR OCH SÄKERHETS FÖRESKRIFTER** innan du fortsätter.

- Registrera mikroanalysbrunnpositionerna för den eller de tomma brunnarna, samtliga testprover, standarder och kontroller, samt de indikerade satsnumren från vasketiketterna. Märk ut ett av hörnen på mikroanalysplattan för orientering.
- Bered mikroanalysbrunnarna så här:
 - Rehydrera mikroanalysbrunnarna genom att tillsätta ungefär 300 µl tvättlösning till varje brunn med hjälp av en tvättflaska eller annan automatiserad fyllningsanordning.
 - Inkubera i 1–2 minuter vid rumstemperatur (15–30 °C).
 - Aspirera innehållet i varje brunn.
 - Vänd plattan uppochner och knacka kraftigt över det absorberande papperet två gånger för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska. Låt inte brunnarna torka.
- Tillsätt 100 µl komplementprovspädningssmedel till den eller de duplikatbrunnar som ska användas för blankning av plattläsaren.
- Tillsätt 100 µl av varje CIC-Raji-standard (A, B och C) till duplikatbrunnarna.

5. Tillsätt 100 µl av varje utspätt prov till dess tillägnade mikroanalysbrunn. Se *REAGENSBEREDNING*, steg 4.
6. Inkubera i 60 ± 1 minut vid rumstemperatur (15–30 °C).
7. Tvätta mikroanalysbrunnarna så här:
 - a. Avlägsna innehållet ur varje brunn efter inkubationen i steg 6 (och i steg 9 nedan).
 - b. Tillsätt ungefär 300 µl tvättlösning till varje brunn med hjälp av en tvättflaska eller annan fyllningsanordning.
 - c. Inkubera brunnarna i 1 minut vid rumstemperatur (15–30 °C).
 - d. Avlägsna vätskan ur varje brunn.
 - e. Tillsätt ungefär 300 µl tvättlösning till varje brunn.
 - f. Avlägsna vätskan ur varje brunn.
 - g. Upprepa stegen e–f ytterligare tre gånger.
 - h. Vänd på plattan efter den femte tvättcykeln och knacka kraftigt två gånger över absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska.
8. Dispensera med hjälp av en multikanalpipett eller repeterande pipett 50 µl CIC-Raji-konjugat i varje tvättad testbrunn, inklusive blankbrunnen/brunnarna.
9. Inkubera mikroanalysremsorna i 30 ± 1 minut vid rumstemperatur (15–30 °C). **Bered substratlösningen under denna inkubation (se REAGENSBEREDNING steg 6).**
10. Tvätta mikroanalysbrunnarna efter den 30 minuter långa inkubationen i steg 9, enligt anvisningarna ovan, steg 7.
11. Dispensera direkt efter tvättförloppet 100 µl av den nyberedda substratlösningen i varje brunn, inklusive blankbrunnen/brunnarna, med en multikanalpipett eller repeterande pipett.
12. Inkubera mikroanalysremsorna i 30 ± 1 minut vid rumstemperatur (15–30 °C).
13. Tillsätt med en multikanalpipett eller repeterande pipett 50 µl av stopplösningen till varje brunn för att avbryta den enzymatiska reaktionen. Stopplösningen ska tillsättas till brunnarna i samma ordningsföljd och med samma tempo som vid tillsättningen av substratlösningen. Knacka lätt på plattan för att sprida färgutvecklingen jämnt.
14. Läs av absorbansen vid 405 nm (A_{405} -värde) för varje testbrunn inom en timme från tillsatsen av stopplösningen (steg 13), och utför en blankkorrigering beroende på det spektrometrisystem som används.
15. Behåll remshällaren och remsfästet för framtida bruk.
16. Kassera återstående utspädda prover, substrat och de begagnade mikroanalysremsorna (se *VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER*, steg 3). Behåll remshällaren och remsfästet för framtida bruk.

REKOMMENDERAD BEKRÄFTELSEMETOD

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

KVALITETSKONTROLL

För att uppfylla kraven för god laboratoriepraxis rekommenderar vi att de positiva och negativa kontrollerna tas med i varje dags aktiviteter. Kontroller för Quidels CIC-Raji-cellersättningsanalys finns tillgängliga från Quidel för detta, (CIC-RCR-kontroller, katalognr: **A014**), och ska användas i enlighet med förpackningsbilagan. Om den positiva och/eller negativa kontrollen inte fungerar på avsett sätt ska Quidels tekniska support kontaktas så snart som möjligt.

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

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

TOLKNING AV RESULTATEN

Resultatberäkning

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

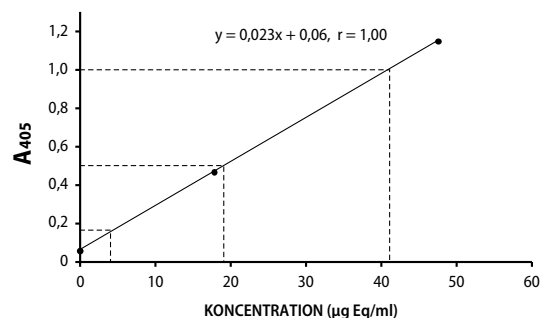
Alternativt kan berörda data läggas in i ett diagram manuellt och värdena ($\mu\text{g Eq/ml}$) för testproverna läsas av direkt från den standardkurvlinje som passar bäst. Ett exempel på en typisk standardkurva återges i figur 1.

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

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

Exempel på standardkurva

Figur 1



Prov	A_{405}	$\mu\text{g Eq/ml}$
Standard A	0,06	0
Standard B	0,46	18
Standard C	1,15	48
Prov 1	0,15	3,9
Prov 2	0,50	19,1
Prov 3	1,00	40,9
$r = 1,00$	$m = 0,023$	$b = 0,06$

Validering

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

Korrelationskoefficient (r):	> 0,95
lutning (m):	0,013 till 0,034
y-avskärning (b):	(–)0,07 till (+)0,10

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

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

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

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

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

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

PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

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

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

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

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

Fig. 2, EIA FÖR CIC-RAJI-CELLERSÄTTNING
Population med systemisk lupus erytematos

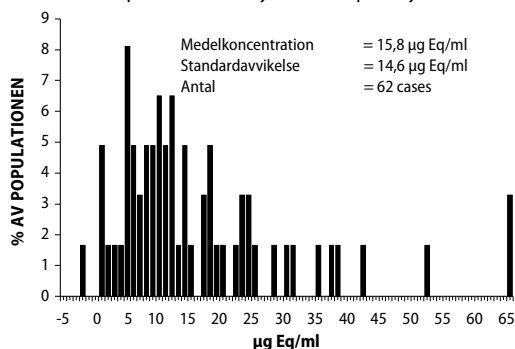


Fig. 3, EIA FÖR CIC-RAJI-CELLERSÄTTNING
Population med reumatoid artrit

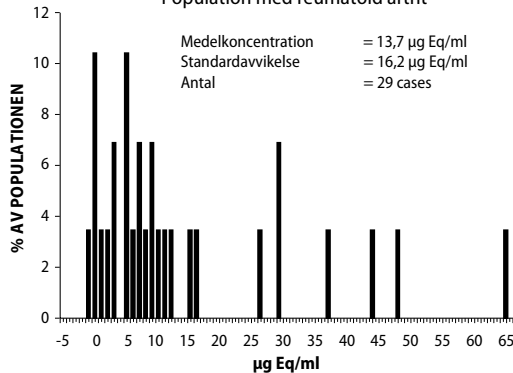
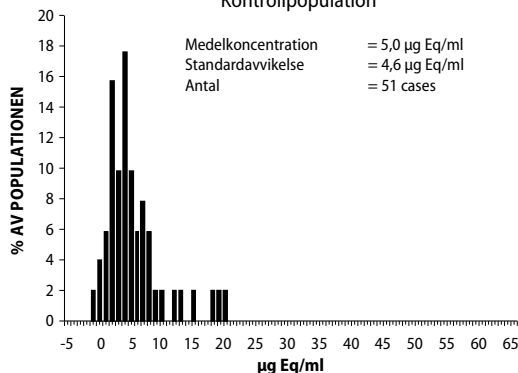


Fig. 4, EIA FÖR CIC-RAJI-CELLERSÄTTNING
Kontrollpopulation



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

TABELL 2
RESULTATEN AV CIC-RAJI-CELLERSÄTTNINGEN
JÄMFÖRDA MED SJUKDOMSAKTIVITETEN

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

¹ Inom parentes (efter varje värde för % onormala) anges antalet patienter testade som onormala, dividerat med antalet patienter som klassificerats med den specifika sjukdomsaktiviteten.

PRESTANDAKARAKTERISTIKA

Noggrannhet

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

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

Reproducerbarhet

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

TABELL 3
ANALYSREPRODUCERBARHET

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

Känslighet

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

Specifitet

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

SUPPORT

Kontakta en Quidel-representant på +1 408-616-4301, vardagar mellan 08.00 och 17.00 Pacific Time (GMT +9) för att beställa eller för teknisk support. Beställning kan också göras via fax på +1 408-616-4310.

Utanför USA: kontakta en lokal distributör för Quidel-produkter.

REFERENCES LITERATURVERWEISE BIBLIOGRAFIA RÉFÉRENCES REFERENCIAS REFERENCER REFERENZER

1. McDougal, J.S., McDuffie, F.C., Immune Complexes in Man: Detection and Clinical Significance, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 24, p. 1, 1985.
2. Endo, L., Corman, L.C., Panush, R.S., Clinical Utility of Assays for Circulating Immune Complexes, *Medical Clinics of North America*, Vol. 69, No. 4, p. 623, July 1985.
3. Abrass, C.K., Nies, K.M., Louie, J.S., Border, W.A., Glasscock, R.J., Correlation and Predictive Accuracy of Circulating Immune Complexes with Disease Activity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus, *Arthritis Rheum.*, Vol. 23, p. 273, 1980.
4. Duquesnoy, B., Circulating Immune Complexes and Complement in Rheumatoid Arthritis, *Ann. Biol. Clin.*, Vol. 42, p. 71, 1984.
5. Theofilopoulos, A.N., The Raji, Conglutinin, and Anti-C3 Assays for the Detection of Complement-Fixing Immune Complexes, *Methods in Enzymology*, Vol. 74, p. 511, 1981.
6. Agnello, V., Winchester, R.J., Kunkel, H.G., Precipitin Reactions of the C1q Component of Complement with Aggregated Gamma-Globulin and Immune Complexes in Gel Diffusion, *Immunology*, Vol. 19, p. 909, 1970.
7. Hack, C.E., Huijbregts, C.C., Paardekooper, J., Influence of Ionic Strength, EDTA Concentration, Endogenous C1q and Polyanions on the 125I-C1q-Binding Test, *J. Immunol. Meth.*, Vol. 72, p. 197, 1984.
8. Richardson, J.H., Barkley, W.E., *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, p. 11-13, 1984.
9. Davidson, I., et al., *The Blood*, p. 120. in Cl. Davidson and J.B. Henry (ed.), *Todd-Sanford Clinical Diagnosis*, W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, 1969.
10. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.

REF

Catalog Number
Katalognummer
Numero de catalogue
Numero di catalogo
Número de catálogo
Katalognummer
Katalognr

EC REP

Authorized Representative
Bevollmächtigter
Représentant agréé
Rappresentante autorizzato
Representante autorizado
Auktoriserad representant
Autoriseret representant

IVD

For In Vitro Diagnostic Use
In Vitro Diagnosticum
Usage In Vitro
Per Uso Diagnostico In Vitro
Para Uso Diagnostico In Vitro
För in-vitro diagnostiskt bruk
Til in Vitro diagnosticering

**EXP**

Use by
Verwendbar bis
Date de péremption
Data di scadenza
Usar hasta el
Använd före
Anvend før

LOT

Lot Number
Chargen-Nr.
Número de lot
Numero di lotto
Número de lote
Satsnummer
Batchnummer



European Conformity
CE-Konformitätskennzeichnung
Conformité aux normes européennes
Conformità europea
Conformidad europea
Europeisk overensstemmelse



Consult Instructions for Use
Gebrauchsanweisung beachten
Consulter le istruzioni per l'uso
Consulte la notice d'emploi
Consulte las instrucciones de uso
Benyt brugsanvisningen
Läs bruksanvisningen



Temperature Limit
Temperaturlimit
Limite de température
Limite di temperatura
Limite de temperatura
Temperaturgränser
Temperaturgrænse



Manufactured by
Hergestellt von
Fabriqué par
Fabricato da
Fabricado por
Tilberkare
Fremstillet a



Biological risks
biogefährlich
rischi biologici
risques biologiques
riesgos biológicos
biologisk risk
biologiske risici

REF A002 – CIC-Raji EIA Kit**EC REP**

Quidel Deutschland GmbH
Betrieb Marburg
Emil-v.-Behring-Straße 76
Gebäude M 213
35041 Marburg



Quidel Corporation
Worldwide Headquarters
10165 McKellar Court
San Diego, CA 92121 USA
www.quidel.com

QUIDEL®**IVD**

A5319E (2003/12)

CIC-Raji

An enzyme immunoassay for the quantitation of circulating immune complexes (CIC) containing C3 activation fragments in human serum and plasma

Enzym-Immunoassay zur Quantifizierung zirkulierender Immunkomplexe (CIC) mit C3-Aktivierungsfragmenten in Humanserum und -plasma.

Saggio immunoenzimatico per la quantizzazione degli immunocomplessi circolanti (CIC) contenenti frammenti di attivazione C3 nel siero e nel plasma umani

Essai immunoenzymatique portant sur la quantification des complexes immuns circulants (CIC) contenant des fragments d'activation du C3 et présents dans le sérum ou le plasma humains.

Enzimoinmunoensayo para la cuantificación de complejos inmunes circulantes (CIC) que contienen fragmentos de activación de C3 en suero y plasma humanos

Et enzymimmunoassay til kvantisering af cirkulerende immunkomplekser (CIC) indeholdende C3-aktiveringsfragmenter i humant serum og plasma.

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

ENGLISH

DEUTSCH

ITALIANO

FRANÇAIS

ESPAÑOL

DANSK

SVENSKA