

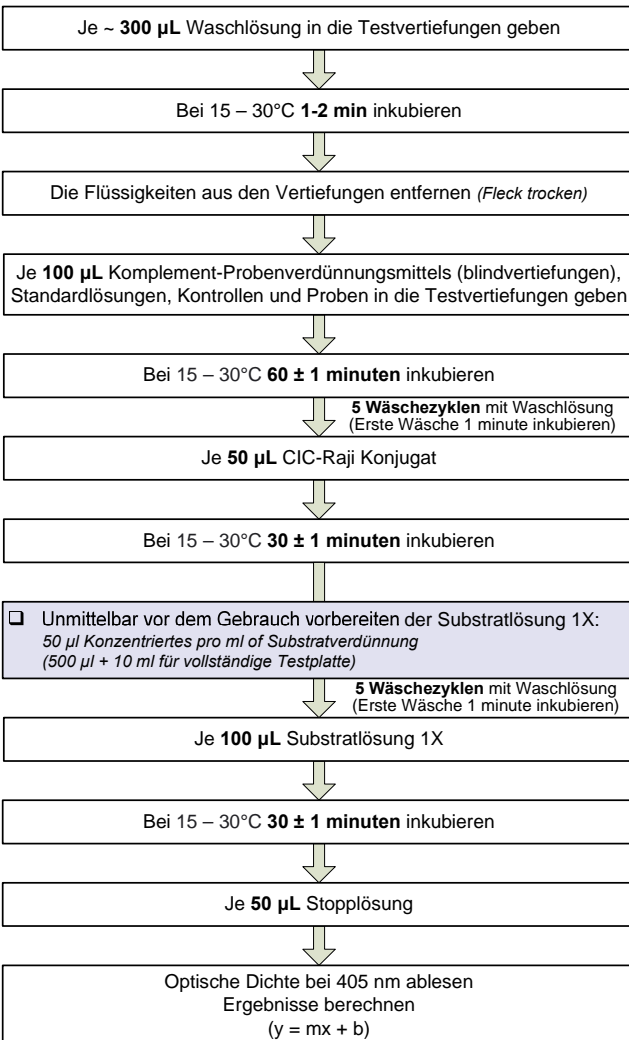
Enzym-Immunoassay zur Quantifizierung zirkulierender Immunkomplexe (CIC) mit C3-Aktivierungsfragmenten in Humanserum und -plasma

MicroVue™ CIC-Raji Cell Replacement EIA Zusammenfassung

Vorbereitung von Reagenzien und Proben

- Konzentrierte Waschlösung verdünnen 1:20 mit vollentsalztem Wasser.
- Jede Kontrolle sollte mit 1,0 ml Komplement-Probenverdünnungsmittel verdünnt werden, gründlich mischen, und ließ sitzen für 15 Minuten. (Um Hohe CIC-RCR-Kontrolle, verwenden Sie 1 ml der CIC-Raji-Kontrollverdünnungsmittel für Wiederherstellungsschritt.)
- Proben verdünnen 1:50 mit Komplement-Probenverdünnungsmittel (10 µL + 490 µL).
- Sollen positive Ergebnisse bestätigt werden, Mit dem CIC-Raji-Kontrollverdünnungsmittel eine Verdünnung im Verhältnis 1:50 erstellen.

Testverfahren



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 Autoimmunerkrankungen (SLE, SLE-Syndrom, RA), Glomerulonephritis, neoplastischen Krankheiten (Hodgkin-Krankheit, Leukämie), bakteriellen Erkrankungen (Endocarditis lenta, Lepra), Parasiteninfektionen (Malaria, Schistosomiasis) und Virusinfektionen (Hepatitis, Mononucleosis) berichtet.

VORGESEHENER VERWENDUNGSZWECK

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

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 Konglutintest, 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 MicroVue 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 Plasmaproben, 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 Waschschriff 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 Waschschriff 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 | | |
| B | | Artikel Nr. A9970-A9974 | je 1, 2 ml |
| C | Jede Standardlösung enthält eine bekannte Menge an humanem, serumbehandeltem HAGG in phosphatgepufferter | | |
| D | Kochsalzlösung, 2,5 % Stabilisatoren und 0,01 % Thimerosal | | |
| L | Niedrige CIC-RCR-Kontrolle | Artikel Nr. A9919 | je 3 |
| | (Lyophilisiert) Enthält niedrige Konzentrationen von serumbehandeltem HAGG in Humanserum, 20 mmol/l EDTA, 0,01 % Thimerosal | | |
| H | Hohe CIC-RCR-Kontrolle | Artikel Nr. A9920 | je 3 |
| | (Lyophilisiert) Enthält hohe Konzentrationen von serumbehandeltem HAGG in Humanserum, 20 mmol/l EDTA, 0,01 % Thimerosal | | |
| 1 | Mikroassay-Platte | Artikel Nr. 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 | Artikel Nr. A9957 | je 2, 50 ml |
| | Enthält jeweils phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 1,0 % Tween-20® und 0,035 % ProClin® 300 | | |
| 4 | Komplement- Probenverdünnungsmittel | Artikel Nr. A3670 | 50 ml |
| | Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 2,5 % Stabilisatoren und 0,035 % ProClin 300 | | |
| 5 | Substratverdünnung | Artikel Nr. A3672 | 25 ml |
| | Enthält 0,1 M Zitratpuffer und 0,05 % H ₂ O ₂ | | |
| 6 | Konzentriertes Substrat | Artikel Nr. A3671 | 1,5 ml |
| | Enthält 0,7 % 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), Diammoniumsalz | | |
| 7 | CIC-Raji-Konjugat | Artikel Nr. A9516 | je 2, 3 ml |
| | Enthält an Peroxidase konjugiertes, antihumanes IgG (Maus), suspendiert in einem stabilisierenden HRP-Puffer mit Konservierungsmittel | | |
| 8 | CIC-Raji- Kontrollverdünnungsmittel | Artikel Nr. A9517 | 12 ml |
| | Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 2,5 % Stabilisatoren, antihumane Antikörper (C3-Fragmente) und 0,035 % ProClin 300 | | |

Tween-20® ist ein eingetragenes Warenzeichen von ICI Americas Inc.
ProClin® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Rohm and Haas Company.

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG)

- Stoppuhr (über einen Bereich von 60 Minuten)
- Taschenrechner oder anderes Rechenverfahren zum Validieren der Testergebnisse
- Saubere, unbenutzte Mikroassay-Platten und/oder Teströhrchen und Ständer
- Behälter für die Waschpufferverdünnung
- Waschflasche oder anderes für Immunassays geeignetes Waschsystem
- 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

1. Zur *in-vitro*-Diagnostik.
2. Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln. Beim Arbeiten mit diesem Kit und den Proben allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
3. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen beim Arbeiten mit diesem Kit.
4. Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
5. Die Reagenzien des Assays wie angegeben lagern.
6. Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
7. 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.
8. 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.
9. Für ein zügiges und effizientes Dosieren von Flüssigkeiten wird der Gebrauch von Mehrkanal- oder Mehrfachpipetten empfohlen.
10. Zum Gewährleisten genauer Messungen bei der Zugabe der Proben und Standardlösungen genau arbeiten. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen und nur kalibrierte Geräte verwenden.
11. Für den Erhalt genauer Ergebnisse müssen die Proben fachgerecht entnommen und aufbewahrt werden (siehe *ENTNAHME UND LAGERUNG DER PROBEN*).

12. Eine mikrobielle Kontamination bzw. Kreuzkontamination von Proben, Reagenzien oder Materialien vermeiden. Eine Kontaminationen kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. Jede Probe mit Duplikaten testen.
14. Die Mikroassay-Vertiefungen jeweils nur für eine Bestimmung verwenden.
15. Durch die Verwendung von Inkubationszeiten und -temperaturen, die von den unter „*TESTVERFAHREN*“ gegebenen Werten abweichen, können falsche Ergebnisse erhalten werden.
16. 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.
17. Die Mikroassay-Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
18. Beim Hinzufügen oder Ansaugen von Flüssigkeiten zu bzw. von den Mikroassay-Vertiefungen nicht den Boden der Vertiefungen ankratzen oder berühren.
19. Hitzeinaktivierte, hyperlipämische oder kontaminierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
20. Um beim Waschen die Bildung von Aerosolen zu vermeiden, eine Vorrichtung verwenden, mit der die Waschflüssigkeit in eine Flasche mit haushaltsüblichem Bleichmittel gesaugt wird.
21. Für dieses Assay kann eine beliebige anerkannte Waschmethode eingesetzt werden.
22. Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit und örtlich geltender Bestimmungen entsorgen.

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.^{9,10} 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 Antikörpern 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 Nb 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.

Jede Kontrolle sollte mit $1,0 \pm 0,05$ ml Komplement-Probenverdünnungsmittel verdünnt werden. Die Fläschchen nach der Wiederherstellung vorsichtig, aber dennoch gründlich mischen, um eine vollständige Rehydrierung zu gewährleisten. Die rehydrierten Lösungen bei Raumtemperatur ($15-30\text{ °C}$) für 10–15 Minuten inkubieren. Vor der Verwendung erneut vorsichtig, aber dennoch gründlich mischen. EINE WEITERE VERDÜNNUNG IST NICHT ERFORDERLICH.

**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 fünfzehn (15) Vertiefungen für die fünf 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 Füllleinrichtung in jede Vertiefung 300 µl Waschlösung gegeben wird.
 - Bei Raumtemperatur ($15-30\text{ °C}$) 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, C, D, und E) 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 ($15-30\text{ °C}$) 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 Füllleinrichtung ungefähr 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - Die Vertiefungen bei Raumtemperatur ($15-30\text{ °C}$) 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 ($15-30\text{ °C}$) 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 ($15-30\text{ °C}$) 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.

16. Die verbleibenden verdünnten Proben, Substrate und benutzten Mikroassay-Teststreifen entsorgen (siehe Schritt 22 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 MicroVue CIC-Raji Cell Replacement EIA getestet. Hierzu auch die unter Vorbereitung von Reagenzien und Auswertung der Ergebnisse gegebenen Informationen einsehen.

QUALITÄTSKONTROLLE

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 MicroVue 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 $\mu\text{g Äq/ml}$ 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.

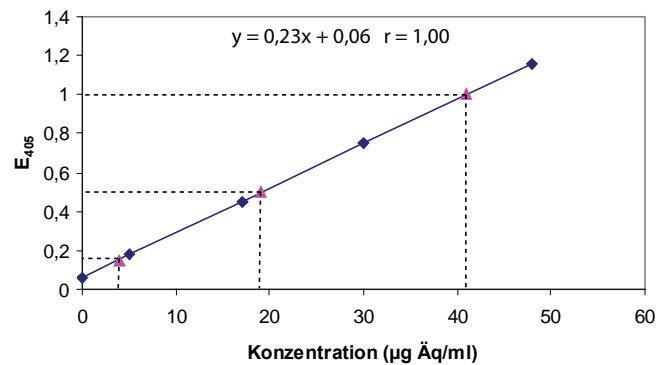
Die Daten können auch ohne Rechnerunterstützung, d.h. zeichnerisch, in ein Diagramm eingetragen werden. Die Werte der Proben ($\mu\text{g Äq/ml}$) werden dann von der durch die Punkte gelegten Gerade abgelesen. Ein Beispiel einer typischen Eichgerade ist in Abb. 1 dargestellt.

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:

$$\text{Verhältnis} = \frac{[\text{CIC}] \text{ in CIC-Raji-Kontrollverdünnungsmittel}}{[\text{CIC}] \text{ in Komplement-Probenverdünnungsmittel}}$$

Beispiel einer Eichgerade

Abb. 1



Probe	E_{405}	$\mu\text{g Äq/mL}$
Standard A	0,06	0
Standard B	0,18	5
Standard C	0,45	17
Standard D	0,75	30
Standard E	1,16	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): $(-),07$ bis $(+),010$

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 $\leq 15 \mu\text{g Äq/ml}$ 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 E liegt, sollten die Probenergebnisse als Werte angegeben werden, die über der auf der Flasche von CIC-Raji-Standardlösung E 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 MicroVue 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 MicroVue 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 sechszwanzig (26) gesunden Probanden der beiden SLE-Kliniken und von fünfundzwanzig (25) nicht autoimmunen 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

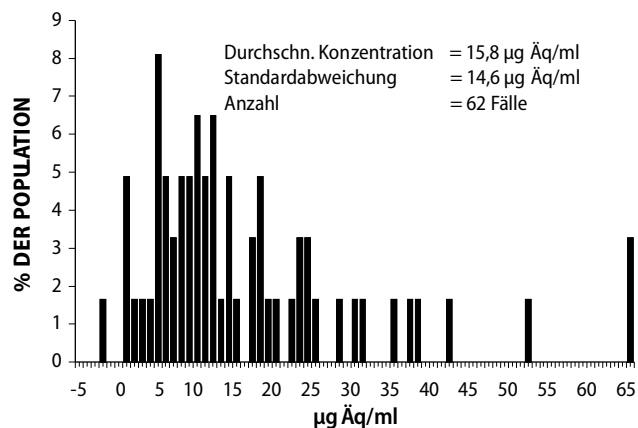


Abb. 3, CIC-RAJI CELL REPLACEMENT EIA
RA-Population

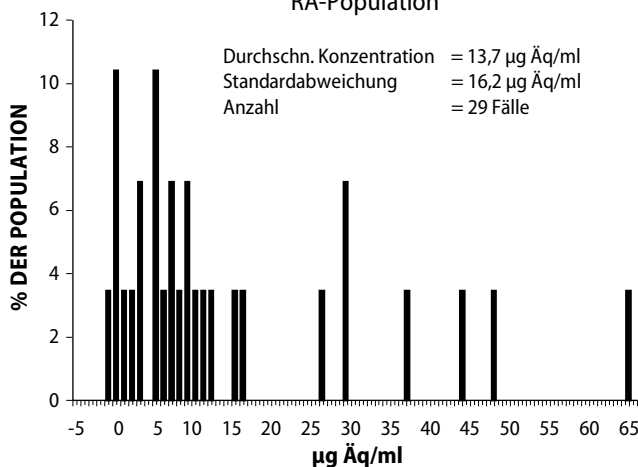
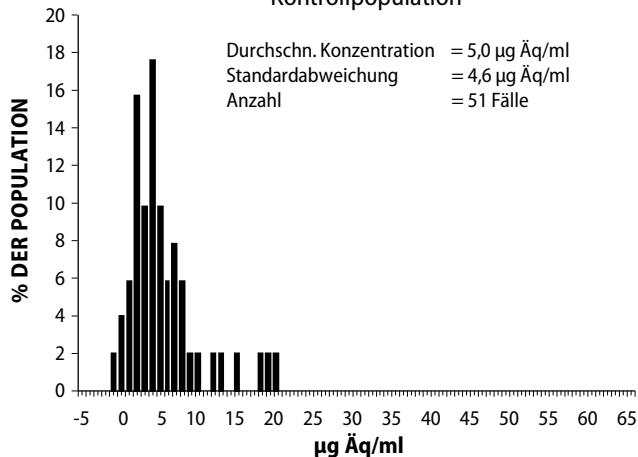


Abb. 4, CIC-RAJI CELL REPLACEMENT EIA
Kontrollpopulation



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 MicroVue 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 MicroVue 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 MicroVue 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 MicroVue 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 MicroVue 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

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

LITERATURVERWEISE

1. 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., Glassock, R.J., Correlation and Predictive Accuracy of Circulating Immune Complexes with Disease Activity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus, *Arthritis Rheum.*, Vol. 23, p. 273, 1980.
4. Duquesnoy, B., Circulating Immune Complexes and Complement in Rheumatoid Arthritis, *Ann. Biol. Clin.*, Vol. 42, p. 71, 1984.
5. Theofilopoulos, A.N., The Raji, Conglutinin, and Anti-C3 Assays for the Detection of Complement-Fixing Immune Complexes, *Methods in Enzymology*, Vol. 74, p. 511, 1981 .
6. Agnello, V., Winchester, R.J., Kunkel, H.G., Precipitin Reactions of the C1q Component of Complement with Aggregated Gamma-Globulin and Immune Complexes in Gel Diffusion, *Immunology*, Vol. 19, p. 909, 1970.
7. Hack, C.E., Huijbregts, C.C., Paardekooper, J., Influence of Ionic Strength, EDTA Concentration, Endogenous C1q and Polyanions on the 125I-C1q-Binding Test, *J. Immunol. Meth.*, Vol. 72, p. 197, 1984.
8. Richardson, J.H., Barkley, W.E., *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, p. 11-13, 1984.
9. Davidson, I., et al., *The Blood*, p. 1 20. in Cl. Davidson and J.B. Henry (ed.), *Todd-Sanford Clinical Diagnosis*, W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, 1969.
10. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.

GLOSSAR



Gebrauchsanweisung beachten auf CDROM



Vorgesehener Verwendungszweck

REF A002 – MICROVUE[®] Complement CIC-Raji Cell Replacement EIA Kit



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



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany