

Enzym-Immunoassay für die quantitative Bestimmung von SC5b-9 Komplexen in Humanserum und Humanplasma

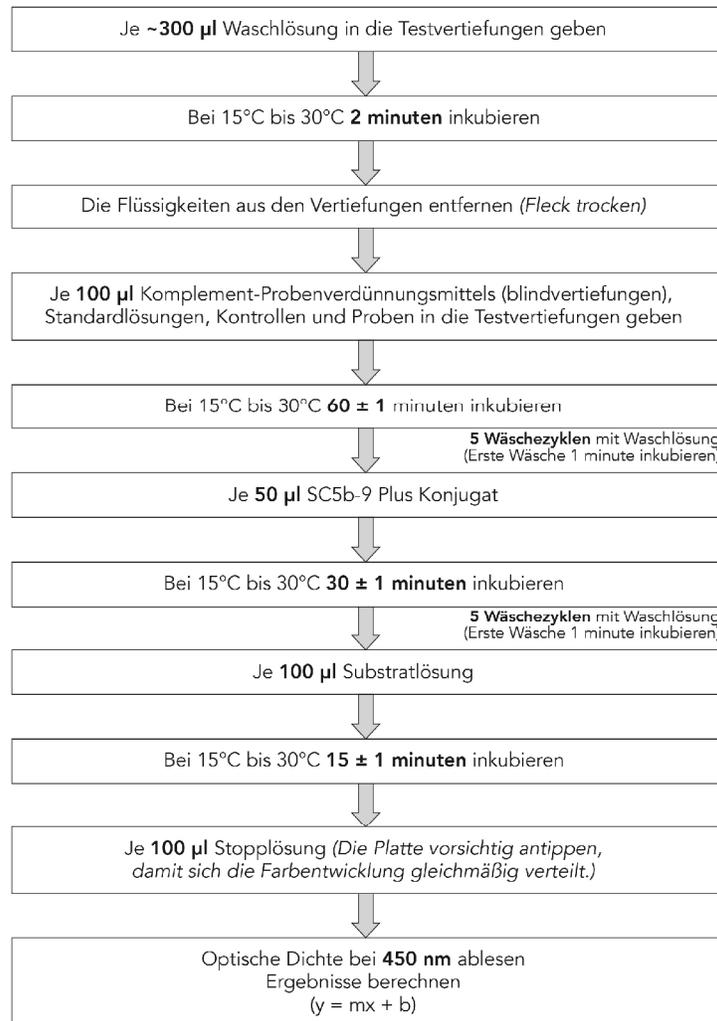
Zur *in-vitro*-diagnostischen Anwendung. Nur für die Ausfuhr. Nicht zum Verkauf oder zur Anwendung in den USA oder Kanada bestimmt.

ZUSSAMENFASSUNG

Vorbereitung von Reagenzien und Proben

- Verdünnt konzentrierte Waschlösung 1:20 mit vollentsalztem Wasser.
- Verdünnt Serumproben 1:40 mit Probenverdünnungsmittel (e.g. 10 µl + 390 µl).
- Verdünnt Plasmaproben 1:10 mit Probenverdünnungsmittel (e.g. 50 µl + 450 µl).

Testverfahren





VERWENDUNGSZWECK

Mit dem MicroVue SC5b-9 Plus Enzym-Immunoassay kann die Menge an SC5b-9-Komplex gemessen werden, die in Humanplasma- oder Serumproben.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Der terminale Komplementkomplex (TCC, SC5b-9) ist ein Produkt der Assemblierung von C5 bis C9, die wiederum als Folge der Aktivierung des Komplementsystems — entweder auf dem klassischen Weg, über Lektin oder dem alternativen Weg — entstehen.¹ Der Membran-Attack-Komplex (MAC) — eine Form des TCC — ist ein stabiler Komplex, der indirekt für die mit der Komplementaktivierung einhergehende irreversible Schädigung der Targetzellmembran verantwortlich ist.¹⁻⁴ In Abwesenheit einer Targetmembran gebildete Komplexe werden an natürlich vorkommende regulierende Serumproteine gebunden, z. B. Protein S⁵⁻⁷ in der C5b 7-Phase der Assemblierung, das löslichen, nicht lytischen TCC bildet.^{1,5}

In diesem Dokument werden alle Formen des stabilen terminalen Komplementkomplexes entweder als TCC oder SC5b-9 bezeichnet; dabei wird vorausgesetzt, dass andere komplementäre, regulierende Proteine, wie z. B. Clusterin, auch diese stabilen Komplexe bilden und mit dem SC5b-9 Plus Assay nachgewiesen werden können. Mit dem MicroVue SC5b-9 Plus Enzym-Immunoassay kann die Konzentration von TCC gemessen werden. Diese Konzentration gibt Auskunft über den Status des terminalen Komplementwegs in der Probe. Der Test beruht auf einem monoklonalen Antikörper zu dem C9-Ring, um den Komplex zu erfassen. Der Nachweis des gebundenen TCC erfolgt anschließend durch HRP-konjugierte Antikörper, die an die Antigene des SC5b-9-Komplexes gebunden werden. Dieser Test, der eine schnelle, hochspezifische und quantitative Methode für die Bestimmung der TCC-Konzentration darstellt, ist für zahlreiche Forschungsanwendungen vorgesehen, in deren Rahmen die Bedeutung oder der Status der terminalen Komplementaktivierung untersucht werden soll, als auch für die *In-vitro*- oder *In-vivo*-Überwachung der Bildung von SC5b-9-Komplexen.

Die TCC-Konzentration ist ein Indikator für das Maß der Komplementaktivierung in der Probe. Ein hohes Maß an Komplementaktivierung wurde in einer Reihe von Krankheiten beobachtet, so z. B. bei systemischem Lupus erythematoses (SLE) und anderen Autoimmunkrankheiten, rheumatoider Arthritis, akutem Lungenversagen und bei entzündlichen Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall.

FUNKTIONSPRINZIP

Der MicroVue SC5b-9 Plus Enzym-Immunoassay ist ein in drei Phasen ablaufender Test zur quantitativen Bestimmung von SC5b-9 in Humanserum, Humanplasma oder experimentellen Proben. Er beruht auf (1.) einer mit einem monoklonalen Antikörper (Maus) beschichteten Mikroassay-Platte, der sich spezifisch an den C9-Ring von SC5b-9 bindet, (2.) HRP-konjugierten Antikörpern gegen SC5b-9-Antigene und (3.) einem chromogenen Substrat.

In der ersten Phase werden die Standardlösungen, Kontrollen und Proben in die mit monoklonalem Antikörper gegen SC5b-9 beschichteten Mikroassay-Vertiefungen gegeben. Das in den Standardlösungen, Kontrollen oder Proben vorliegende SC5b-9 wird an das immobilisierte Anti-SC5b-9 gebunden. Nach der Inkubation wird ungebundenes Konjugat im Waschschrift entfernt. Teilproteine von TCC, darunter auch C9, binden sich nicht an diesen Antikörper und werden während des Waschschrifts ausgewaschen.

In der zweiten Phase wird ein an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierter Antikörper gegen SC5b-9-Antigene in die verschiedenen Testvertiefungen gegeben. Die enzymkonjugierten Antikörper werden an SC5b-9 gebunden, das durch das an die Oberfläche der Mikroassay-Vertiefungen gebundene monoklonale Anti-SC5b-9 erfasst wurde. Nach der Inkubation wird ungebundenes Konjugat in einem Waschschrift entfernt.

In der dritten Phase wird ein chromogenes Enzymsubstrat in die Mikroassay-Vertiefungen gegeben. Das gebundene HRP-Konjugat reagiert mit dem Substrat und bildet eine blaue Färbung. Nach der Inkubation wird zum Stoppen der Farbentwicklung ein Reagenz hinzugegeben; dadurch entsteht eine gelbe Färbung. Die Extinktionswerte (E_{450} -Werte) der Standardlösungen, Kontrollen und Proben werden spektrophotometrisch bestimmt. Die Farbintensität der Reaktionsmischung ist proportional zur SC5b-9 (TCC)-Konzentration in den Proben, Standardlösungen, und Kontrollen.

REAGENZIIEN UND MITGELIEFERTE MATERIALIEN

96 Bestimmungen für SC5b-9-Komplexe

Das MicroVue SC5b-9 Plus EIA-Kit enthält folgende Komponenten:

A	SC5b-9-Plus-Standardlösungen	Artikelnr. A9958-62	5 x 1,5 ml
B	Enthält Humanserum mit bekannten Mengen von SC5b-9 in phosphatgepufferter Kochsalzlösung,		
C	Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel		
D			
E			
H	Hohe/niedrige Kontrollen	Artikelnr. A9581, A9582	2 X 1.5 ml
L	Enthält Humanplasma mit einer niedrigen/hohen Konzentration von SC5b-9-Komplexen und Konservierungsmittel		
1	Beschichtete Teststreifen	Artikelnr. A3840	je 12
	8 Vertiefungen, Teststreifen, beschichtet mit einem monoklonalen Antikörper (Maus), der für humanes SC5b-9 spezifisch ist, in einem wiederverschließbaren Kunststoffbeutel		
2	Stopplösung	Artikelnr. 4978	12 ml
	Enthält 2 N H_2SO_4		
3	20fach konzentrierte Waschlösung	Artikelnr. A9957	2 x 50 ml
	Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 0.05% Tween-20®, und Proclin® 300		
4	Probenverdünnungsmittel	Artikelnr. A3670	50 ml
	Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 0,05% Tween-20, Proteinstabilisatoren und 0,035% ProClin 300		
5	TMB-Substrat	Artikelnr. A9946	12 ml
	Gebrauchsfertiges Peroxidsubstrat und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)		
6	SC5b-9-Plus-Konjugat	Artikelnr. A9577	7 ml
	Enthält an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte Antikörper (Ziege) gegen SC5b-9-Antigene		

Tween-20® ist eine eingetragene Marke der ICI Americas Inc.

ProClin® ist eine eingetragene Marke der Rohm and Haas Company.

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)

- Stoppuhr (für eine Zeitspanne von 60 Minuten)
- Taschenrechner oder anderes Rechenverfahren zum Validieren der Testergebnisse
- Saubere, unbenutzte Mikroassay-Platten und/oder Teströhrchen und Ständer
- Behälter für die Waschpufferverdünnung
- Waschflasche oder anderes für Immunassays geeignetes Waschsysteem
- Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanäle) Mehrfachmikropipetten (optional)
- Saubere Pipetten, 1 ml, 5 ml und 10 ml
- Mikropipetten und Pipettenspitzen
- Plattenlesegerät für Extinktionsmessungen über den Bereich von 0,0 bis 2,0
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Ein Plattenlesegerät mit automatischer Mischfunktion ist zwar nicht erforderlich, es wird aber empfohlen.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- *In-vitro*-Diagnostikum.
- Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln. Beim Arbeiten mit diesem Kit und den Proben allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Die Reagenzien des Assays wie angegeben lagern.
- Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
- ProClin 300 wird als Konservierungstoff 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.
- Die Stopplösung für diesen Assay ist 2 N H₂SO₄. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen.
- Alle Spendereinheiten, die für die Standardlösungen und Kontrollseren dieses Produkts verwendet werden, wurden mit einer vom FDA zugelassenen Methode auf Antikörper gegen HIV (HIV1 und HIV2), Hepatitis-C-Viren und HBsAg untersucht. Da keine Testmethode mit 100%iger Sicherheit garantieren kann, dass keine infektiösen Substanzen vorliegen, sollten diese Reagenzien wie alle potenziell infektiösen Humanserum- oder Blutproben gemäß Biosafety Level 2 behandelt werden. Dementsprechende Empfehlungen sind im Handbuch „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“, 2007, Centers for Disease Control/National Institutes of Health, beschrieben.
- Für den Erhalt genauer Ergebnisse müssen die Proben fachgerecht entnommen und aufbewahrt werden (siehe *ENTNAHME UND LAGERUNG DER PROBEN*).
- Eine mikrobielle Kontamination bzw. Kreuzkontamination der Proben und Reagenzien ist zu vermeiden.
- Die Mikroassay-Vertiefungen jeweils nur für eine Bestimmung verwenden.
- Alle Proben, Reagenzien und Materialien dekontaminieren, indem sie 30 Minuten in einer 1:10-Lösung von haushaltsüblichem Bleichmittel (Natriumhypochlorit) eingeweicht oder bei 121°C und 1,03 bar 30 Minuten autoklaviert werden.
- Durch die Verwendung von Inkubationszeiten und -temperaturen, die von den unter *TESTVERFAHREN* gegebenen Werten abweichen, können falsche Ergebnisse auftreten.
- **Das TMB-Substrat muss während der Lagerung und Inkubation vor Licht geschützt werden.** Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen.
- Die Mikroassay-Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
- Beim Entfernen von Flüssigkeiten von den Mikroassay-Vertiefungen nicht den Boden der Vertiefungen ankratzen oder berühren.
- Hitzeinaktivierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
- Hyperlipämische oder kontaminierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
- Um beim Waschen die Bildung von Aerosolen zu vermeiden, eine Vorrichtung verwenden, mit der die Waschflüssigkeit in eine Flasche mit haushaltsüblichem Bleichmittel gesaugt wird.
- **Zum Waschen der Platte eine Waschflasche oder ein automatisiertes Dosiergerät verwenden (siehe *TESTVERFAHREN*, Schritt 8). Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassay-Platte verwenden.**
- Testverfahren in Bereichen mit angemessener Belüftung durchführen.
- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.
- Bei der Handhabung der Kitkomponenten geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
- Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt (SDB) auf quidel.com, um weitere Informationen zu Gefahrensymbolen, Sicherheit, Handhabung und Entsorgung der Komponenten in diesem Kit zu erhalten.

LAGERUNG

Ungeöffnetes Kit bei 2°C bis 8°C aufbewahren. Alle Reagenzien vor dem Gebrauch auf 15°C bis 30°C bringen. Die nicht benötigten Mikroassay-Teststreifen wieder in den Beutel legen, den Beutel verschließen und bei 2°C bis 8°C lagern.

ENTNAHME UND LAGERUNG DER PROBEN

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

Entnahme, Bearbeitung und Lagerung der Proben müssen fachgerecht durchgeführt werden, da bei einer unsachgemäßen Handhabung der Proben durch artefaktische Komplementaktivierung SC5b-9 gebildet werden kann.

Die Werte für normale Serumproben sind typischerweise etwas höher als die von EDTA- oder Zitratplasmaproben. Die SC5b-9-Konzentrationen in EDTA- oder Zitratplasma entsprechen daher u. U. besser den tatsächlichen *In-Vivo*-Konzentrationen.

Serum-, EDTA- oder Zitratplasmaproben sollten gemäß Standardverfahren unter keimfreien Bedingungen entnommen werden. Die Proben sollten umgehend getestet oder bis zum Testen für maximal 4 Stunden bei 4°C bzw. auf Eis gelagert werden.

Kann eine Probe nicht innerhalb von vier Stunden nach den oben beschriebenen Richtlinien getestet werden, sollte sie bei –70°C oder tieferen Temperaturen eingefroren werden.

Humanserum- und Plasmaproben können auch mit einem **Probenstabilisator** (Artikelnr. A9576) präpariert werden. Mit diesem Produkt, das nur von Quidel erhältlich ist, muss die Probe vor dem Einfrieren im Verhältnis 1:1 verdünnt werden. Weitere Informationen zu diesem Probenstabilisator sind auf Anfrage erhältlich.

Gefrorene Proben schnell bei 37°C bis kurz nach dem Auftaupunkt auftauen. Die gefrorenen Proben sofort auf Eis legen (nicht länger als vier Stunden), um Komplementaktivierung vor der Verdünnung zu vermeiden. Proben nicht bei 37°C aufbewahren, da sonst Komplementaktivierung auftreten könnte. Proben nicht bei Raumtemperatur oder 4°C auftauen, da sonst Komplementaktivierung eintreten könnte. Proben sollten unmittelbar nach dem Auftauen getestet werden. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen wird nicht empfohlen. Falls Proben zur weiteren Analyse wieder eingefroren werden sollen, empfiehlt Quidel das Einfrieren mehrerer Proben-Aliquote, um wiederholte Gefrier-/Auftauzyklen zu vermeiden.

VORBEREITUNG VON REAGENZIEN

Alle Reagenzien und Materialien vor dem Gebrauch auf 15°C bis 30°C bringen.

Nach der Entnahme der erforderlichen Reagenzien und Materialien die nicht mehr benötigten Komponenten wieder auf die erforderliche Lagertemperatur bringen (siehe *LAGERUNG*).

Standard- und Kontrolllösungen brauchen vor der Verwendung nicht verdünnt oder präpariert zu werden.

Waschlösung

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

Entnehmen der Mikroassay-Teststreifen

Die für den Test erforderliche Anzahl der Teststreifen bestimmen. Blindvertiefungen, Kontrollen und Standardlösungen sollten in Doppelbestimmungen getestet werden. Die Teststreifen-Feststelleinrichtung von der Platte entfernen. Die nicht benötigten Teststreifen entnehmen und in den Beutel legen. Den Beutel wieder verschließen und bei 2°C bis 8°C aufbewahren. Die für den Test zu verwendenden Teststreifen im Testplattenrahmen befestigen.

Probenverdünnung

VORSICHT: Alle Proben sind als potenziell gefährlich zu betrachten. Allgemein übliche Vorsichtsmaßnahmen beachten. Hitzeinaktivierte, kontaminierte oder falsch gelagerte Proben dürfen nicht verwendet werden.

HINWEIS: Wichtige Hinweise zum korrekten Auftauen gefrorener Proben siehe „ENTNAHME UND LAGERUNG DER PROBEN“. Die korrekte Handhabung der Proben ist für korrekte Testergebnisse unerlässlich.

Quidel empfiehlt, normale Plasmaproben mit dem beiliegenden Probenverdünnungsmittel im Verhältnis 1:10 zu verdünnen; Serumproben sollten dagegen im Verhältnis 1:40 verdünnt werden. Proben mit hohen SC5b-9-Konzentrationen müssen u. U. im Verhältnis 1:200 oder stärker verdünnt werden. Die Proben **müssen** jedoch so weit verdünnt werden, dass die gemessenen E_{450} -Werte oberhalb der LLOQ (untere Qualitifikationsgrenze) liegen und den E_{450} -Wert von Standardlösung E des SC5b-9-Kits nicht überschreiten. Proben, deren E_{450} -Werte außerhalb dieses Bereichs liegen, sollten in einem anderen Verdünnungsverhältnis neu getestet werden.

Die Anzahl (N) der zu testenden Proben bestimmen. Die Probenröhrchen 1 bis N beschriften und die Probandaten jedes Probenröhrchens schriftlich festhalten. Alle Proben mit Verdünnungsmittel auf ein geeignetes Verhältnis verdünnen (siehe vorherigen Absatz). Gründlich mischen, dabei jedoch die Bildung von Schaum und Blasen vermeiden. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden.

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 6 unter *TESTVERFAHREN*). Bei kleinen Testserien, 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 besonders für umfangreiche Testdurchläufe sollten zum Hinzugeben der Proben, wie im Folgenden beschrieben, 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 µl bis 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 immer dann ausgewechselt werden, wenn sich die Zusammensetzung der zu überführenden Proben ändert.

TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

Siehe hierzu auch *VORBEREITUNG VON REAGENZIEN* und *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*.

1. Die Positionen der Blindvertiefungen, Proben, Standardlösungen und Kontrollen sowie die auf den Flaschenetiketten angegebenen Chargennummern schriftlich festhalten. Die Ausrichtung der Mikroassay-Platte durch die Markierung einer Plattenecke festhalten.
2. Die Mikroassay-Teststreifen wie folgt vorbereiten:
 - a. Die Mikroassay-Vertiefungen rehydrieren, indem mit einer Waschflasche oder einem automatisierten Dosiergerät in jede Vertiefung 300 µl Waschlösung gegeben wird.
 - b. Bei 15°C bis 30°C für 2 Minuten inkubieren.
 - c. Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - d. Die Platte umdrehen und zweimal vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
3. Eine oder mehrere Vertiefungen als Blindvertiefung auswählen. 100 µl des Probenverdünnungsmittels in diejenige(n) Vertiefung(en) geben, die zur Bestimmung des Nullwertes des Plattenlesegeräts verwendet werden sollen (die sog. Blindvertiefungen).
4. Je 100 µl der SC5b-9-Standardlösungen (A, B, C, D und E) in die Duplikatvertiefungen geben. **Hinweis: Die Standardlösungen sind bereits verdünnt und können ohne weitere Vorbereitungen eingesetzt werden.**
5. Je 100 µl der niedrigen und der hohen SC5b-9-Kontrolle in die Duplikatvertiefungen geben. **Hinweis: Die Kontrollen sind bereits verdünnt und können ohne weitere Vorbereitungen eingesetzt werden.**
6. Je 100 µl der verdünnten Proben in die entsprechenden Mikroassay-Vertiefungen geben (siehe *VORBEREITUNG VON REAGENZIEN, Probenverdünnung*).
7. Bei 15°C bis 30°C für 60 ± 1 Minuten inkubieren.
8. Die Mikroassay-Vertiefungen wie folgt waschen:
 - a. Nach der Inkubation von Schritt 7 (und Schritt 10 — siehe unten) die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - b. Mit einer Waschflasche oder einem automatisierten Dosiergerät ungefähr 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - c. Die Vertiefungen bei 15°C bis 30°C für 1 Minute inkubieren.
 - d. Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - e. Ungefähr 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - f. Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - g. Die Schritte e-f dreimal wiederholen.**
 - h. Die Platte nach dem fünften Waschschrift umdrehen und zweimal vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
9. Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette jeweils 50 µl des SC5b-9-Konjugats in die gewaschenen Testvertiefungen und die Blindvertiefungen geben.
10. Die Mikroassay-Teststreifen bei 15°C bis 30°C für 30 ± 1 Minuten inkubieren. Während dieser Inkubation die Substratlösung vorbereiten (siehe *VORBEREITUNG VON REAGENZIEN*).
11. Die Mikroassay-Vertiefungen nach der 30 Minuten dauernden Inkubation (Schritt 10) wie in Schritt 8 unter *TESTVERFAHREN* beschrieben waschen.
12. Unmittelbar nach dem Waschschrift je 100 µl der Substratlösung in die Vertiefungen und Blindvertiefung(en) geben.
13. Die Mikroassay-Teststreifen bei 15°C bis 30°C für 15 (± 1) Minuten inkubieren.
14. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion je 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen geben. Die Zugabe der Stopplösung in die Vertiefungen sollte in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgen wie bei der Zugabe der Substratlösung. Die Platte vorsichtig antippen, damit sich die Farbentwicklung gleichmäßig verteilt. **Hinweis: Optimale Ergebnisse werden durch Anwendung der automatischen Mischfunktion (falls vorhanden) direkt vor dem Ablesen der Mikroassay-Platte erreicht.**

15. Innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung (Schritt 14) die Extinktion der Testvertiefungen bei 450 nm bestimmen (E_{450} -Wert) und eine Blindwertkorrektur vornehmen.
16. Die Konzentration der Proben und Kontrollen anhand der Eichgeraden bestimmen.
17. Die verbleibenden verdünnten Proben und Kontrollen sowie die benutzten Mikroassay-Teststreifen entsorgen (siehe *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*).

QUALITÄTSKONTROLLE

Gemäß guter Laborpraxis sollten Kontrollen verwendet werden, um die Richtigkeit der Testergebnisse zu gewährleisten. Zu diesem Zweck enthält das SC5b-9 (TCC) Plus EIA-Kit hohe und niedrige Kontrollen. Die im Rahmen der Qualitätskontrolle zu verwendenden Bereiche sind angegeben. Die Kontrollwerte haben die Aufgabe, die Gültigkeit der Kurve und der Probenergebnisse zu bestätigen. Jedes Labor sollte eigene Kriterien festlegen, nach denen die Testergebnisse anzunehmen sind. Wenn die Kontrollwerte nicht innerhalb der zulässigen Grenzwerte Ihres Labors liegen, sollten die Testergebnisse in Frage gestellt und die Proben wiederholt werden. Zudem wird auf der Packungsbeilage angegeben, dass die Eichgerade, die mit den Standardlösungen des Testkits erstellt wurde, strengen Validierungsanforderungen gerecht werden muss. Erfüllt der Test diese Anforderungen nicht, den Test wiederholen oder den technischen Service von Quidel verständigen.

Das diesem Kit beiliegende Analysezertifikat ist chargenspezifisch und soll sicherstellen, dass die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse denen der Quidel Corporation entsprechen. Die gegebenen Extinktionswerte sollen lediglich als Richtwerte dienen. Die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse können davon abweichen.

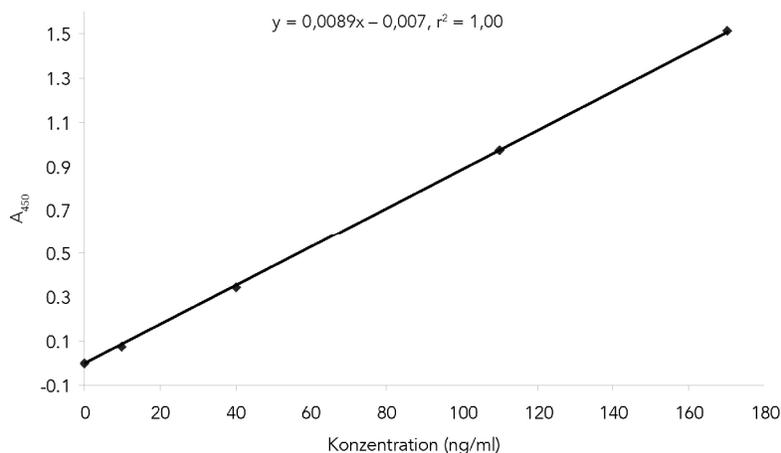
AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Berechnung der Ergebnisse

Verwendung der Eichgeraden: Die Eichgerade des SC5b-9 Plus EIA wird mit den blindwert-korrigierten E_{450} -Werten der verschiedenen Standardlösungen (auf der y-Achse) und den entsprechenden Standardkonzentrationen (auf der x-Achse) erstellt. Nach der Durchführung der linearen Regression muss die erstellte Eichgerade den Validierungsanforderungen (siehe unten) gerecht werden. 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 (ng/ml) werden dann von der durch die Punkte gelegten Gerade abgelesen. Ein Beispiel einer typischen Eichgerade ist in Abb. 1 dargestellt.

Abb 1
Repräsentative Eichgerade



Probe	E ₄₅₀	ng/ml
Standard A	0	0
Standard B	0,079	10
Standard C	0,347	40
Standard D	0,975	110
Standard E	1,512	170

Berechnung der tatsächlichen SC5b-9-Konzentration in den Proben

Bei den Konzentrationen, die auf den Fläschchen der Standardlösungen und Kontrollen angegeben sind, handelt es sich um absolute Konzentrationen des SC5b-9-Komplexes. Die in einer Probe vorliegende SC5b-9-Konzentration wird berechnet, indem die gemessene Konzentration mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Probe multipliziert wird. Wurde z. B. für eine EDTA-Plasmaprobe, die für den Test im Verhältnis 1:10 verdünnt wurde, anhand der Regressionsgeraden eine Konzentration von 20 ng/ml SC5b-9 ermittelt, so entspricht dies einer SC5b-9-Konzentration in der Probe von 200 ng/ml SC5b-9 (nämlich 10 x 20 ng/ml SC5b-9).

Um für Proben mit E₄₅₀-Werten, die über dem E₄₅₀-Wert von SC5b-9-Standardlösung E (oder E₄₅₀-Einheiten unter der LLOQ) liegen, genaue SC5b-9-Bestimmungen zu erhalten, müssen die Proben u. U. mit einem anderen Verdünnungsverhältnis erneut getestet werden, so dass ihre neuen E₄₅₀-Werte innerhalb dieser Grenzwerte liegen. Bei allen Testwiederholungen müssen auch die SC5b-9-Standardlösungen und Kontrollen gemessen werden.

Validierung

Die Steigung, den Schnittpunkt mit der y-Achse und den Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden bestimmen, die für die SC5b-9-Standardlösungen A, B, C, D und E berechnet wurde. Diese Werte müssen innerhalb der folgenden Bereiche liegen, damit der Test gültig ist:

korrelationskoeffizient (r): > 0,95
steigung (m): 0,0039 bis 0,0123
y-schnittpunkt (b): (-)0,189 bis (+)0,201

Der zulässige SC5b-9-Konzentrationsbereich ist für die niedrigen und hohen Kontrollen auf den Fläschchen angegeben.

GRENZEN DER METHODE

Der MicroVue SC5b-9 Plus Enzym-Immunoassay wurde zum Testen von Proben eingesetzt, die als Serum oder Plasma in EDTA oder Zitrat vorlagen. Andere Antikoagulanzen wurden nicht untersucht.

PROBENWERTE

EDTA-Plasma und -Serum von vierzig (40) normalen Spendern wurden im SC5b-9 Plus EIA-Kit getestet. Die Ergebnisse werden unten aufgeführt.

	n	Mittelwert (ng/ml)	Bereich: ± 2SD (ng/ml)
EDTA-Plasma	40	147	75 bis 219
Serum	40	356	187 bis 525

HINWEIS: Der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) von für Plasma- oder Serumproben bestimmte SC5b-9 Komplexkonzentrationen können zwischen Labors variieren; daher wird empfohlen, dass jedes Labor seine jeweils eigenen Bereiche bestimmt. Die oben angegebenen Werte dienen nur als Referenz.

LEISTUNGSMERKMALE DES TESTS

Grenzen

Nachweisgrenze: Die Nachweisgrenze (LOD, Limit of Detection) des SC5b-9-Plus-Tests liegt bei 3,7 ng/ml und wurde im Rahmen einer Nullstandardstudie an der 3fachen Standardabweichung festgelegt.

Untere Bestimmungsgrenze: Die untere Quantifikationsgrenze (LLOQ, Lower Limit of Detection) des SC5b-9-Tests liegt bei 8,8 ng/ml. Dies entspricht der niedrigsten Konzentration der Eichgeraden, die den NCCLS-Kriterien für Genauigkeit und Präzision noch gerecht wird.

Störsubstanzen

Die folgenden Substanzen wurden mit den angegebenen Konzentrationen getestet. Sie stellen keine Störung für diesen SC5b-9 Plus Assay dar.

Substanz	Konzentration
Bilirubin	40 mg/dl
Hemoglobin	500 mg/dl
Triclycerides	3000 mg/dl
Li + Heparin	14 U/ml
Na + Heparin	14 U/ml
C9 Protein	180 mg/l
Albumin	6000 mg/dl
Glucose	1200 mg/dl
Cholesterol	500 mg/dl

Präzision

Die intraindividuelle und interindividuelle Präzision hierher wurde durch die Analyse von 2 Plasmaproben und 2 Serumproben (20 Wiederholungen in 10 Serien) ermittelt.

Probe	SC5b-9 (ng/ml)	Intraindividuell ¹ C.V. (%)	Interindividuell ² C.V. (%)
Plasma	139,0	6,8	13,1
	462,9	1,9	5,2
Serum	803,6	2,8	10,4
	1410,6	1,6	5,0

¹n = 20 Wiederholungen ²n = 10 Serien

Linearität

Die Linearität wurde geprüft, indem einer hohen Plasmaprobe mit einer niedrigen Plasmaprobe in verschiedenen Verhältnissen gemischt wurde, so dass verschiedene intermediäre Analytkonzentrationen entstanden. Die mittlere Wiederfindungsrate betrug 94%, mit einem absoluten Bereich von 86% bis 104%.

KUNDENDIENST

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 quidel.com.

LITERATURVERWEISE

1. Müller-Eberhard, H.J., The Membrane Attack Complex, Springer Seminars in Immunopathology, Vol. 7, p.93, 1984.

2. Lachmann, P.J. and Thompson, R.A., Reactive lysis: The complement-mediated lysis of unsensitized cells. II. The characterization of activated reactor as C56 and the participation of C8 and C9. J. Exp. Med., Vol. 131, p.643, 1970.
3. Götze, O., and Müller-Eberhard, H.J., Lysis of erythrocytes by complement in the absence of antibody. J. Exp. Med., Vol. 132, p.898, 1970.
4. Kolb, W.P., Haxby, J.A., Arroyave, C.M., and Müller-Eberhard, H. J., Molecular analysis of the membrane attack mechanism of complement. J. Exp. Med., Vol. 135, p.549, 1972.
5. Kolb, W.P., and Müller-Eberhard, H.J., The membrane attack mechanism of complement. Isolation and subunit composition of the C5b-9 complex, J. Exp. Med., Vol. 141, p.724, 1975.
6. Podack, E.R., Kolb, W.P., and Müller-Eberhard, H.J., The C5b-6 complex: formation, isolation, and inhibition of its activity by lipoprotein and the S-protein of human serum. J. Immunol., Vol. 120, p.1841, 1978.
7. Podack, E.R. and Müller-Eberhard, H.J., Isolation of human S-protein, of an inhibitor of the membrane attack complex of complement. J. Biol. Chem., Vol. 254, p.9808, 1979.

REF A029 – MicroVue SC5b-9 Plus EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA029001DE00 (02/17)

GLOSSAR

REF

Katalog-Nr.



CE-Konformitätskennzeichnung

EC REP

Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft

LOT

Chargencode



Verwenden bis



Hersteller



Temperaturbegrenzung



Verwendungszweck



Consult E-Beschriftung
Gebrauchsanweisung beachten



Biogefährdung

IVD

Zur *In-vitro*-Diagnostik



Inhalt ist ausreichend für 96 Bestimmungen

CONT

Inhalt/Enthält

CONTROL

Kontrolle
