

INSTRUCTIONS FOR USE

WIESLAB® Complement system

Classical pathway

Qualitative and Semi-Quantitative test

Enzyme immunoassay for assessment of
Complement functional activity

- Break apart microtitration strips (12x8) 96 wells
- Store the kit at +2-8° C
- Store the positive and activity control at -20° C
- FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

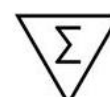


Document No. LABEL-DOC-0031, 5.0
Effective date: 31-May-2023

WIESLAB® Complement system		
Classical pathway		
English:	page	2
Français:	page	18
Español:	página	35
Deutsch:	Seite	52
Italiano:	pagina	69
Dansk:	side	85
Norsk:	side	100
Svenska:	sida	115



COMPL CP310

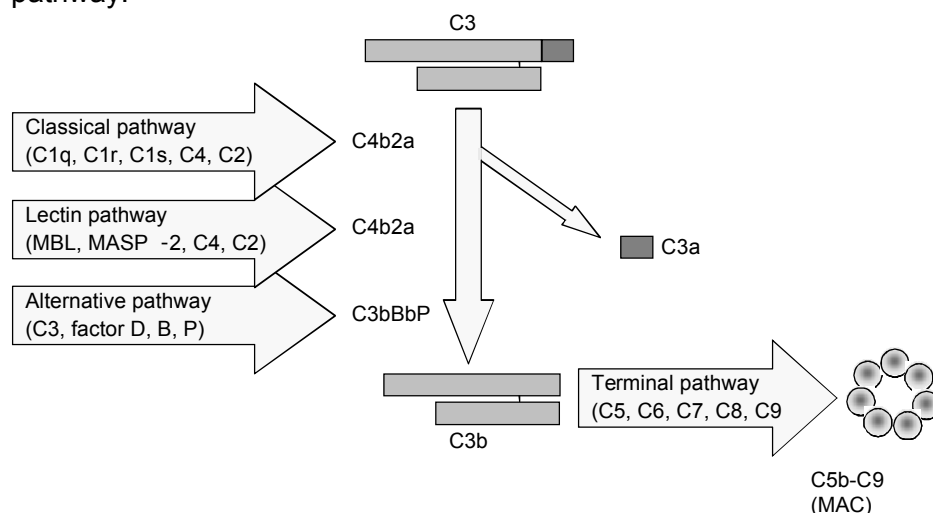


INTENDED USE

The Wieslab® Complement system Classical pathway is an enzyme immunoassay for the qualitative and/or semi-quantitative determination of functional classical complement pathway in human serum. The analysis should be performed by trained laboratory professionals.
FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

SUMMARY AND EXPLANATION

The complement system plays an essential role in chronic, autoimmune and infectious disease. There are three pathways of complement activation (fig. 1), namely the classical, the alternative and the lectin pathway.



Impaired complement activity causes humans to become susceptible to repetitive fulminant or severe infections and may contribute to development of autoimmune disease. Inappropriate activation of complement contributes to chronic inflammation and tissue injury.

In vitro activation of the complement sequence leads to the consumption of complement components which, in turn, leads to a decrease in their concentration. Thus, the determination of complement proteins or complement activity is used to indicate whether the complement system has been activated by an immunologic and/or pathogenic mechanism. Both functional and immunochemical complement measurements are used to evaluate patients when a complement-activating disease is suspected or an inherited deficiency is possible. The level of complement activity evaluated by functional assays such as Wieslab® Complement kit takes into account the rate of synthesis, degradation, and consumption of the components and provides a measure of the integrity of the pathways as opposed to immunochemical methods which specifically measure the concentration of various complement components.

PRINCIPLE OF THE WIESLAB® COMPLEMENT CLASSICAL PATHWAY ASSAY

The Wieslab® Complement Classical pathway assay combines principles of the hemolytic assay for complement activation with the use of labelled antibodies specific for neoantigen produced as a result of complement activation. The amount of neoantigen generated is proportional to the functional activity of complement pathways.

In the Complement CP kit, the wells of the microtitre strips are coated with specific activators of the classical pathway. This in combination with sample dilution buffer composition and patient serum dilution level ensure that only the Classical pathway is activated.

During the incubation of the diluted patient serum in the wells, complement is activated by the specific coating. The wells are then washed and the amount of C5b-9 complex formed on the plate surface is detected with a specific alkaline phosphatase labelled antibody to the C5b-9 neoantigen formed during MAC (Membrane Attack Complex) formation.

After a further washing step, detection of specific antibodies is obtained by incubation with alkaline phosphatase substrate solution. The amount of complement activation correlates with the colour intensity and is measured in terms of absorbance (optical density (OD)).

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.
- The human serum components used in the preparation of the controls in the kit have been tested for the presence of antibodies to human immunodeficiency virus 1 & 2 (HIV 1&2), hepatitis C (HCV) as well as hepatitis B surface antigen by FDA approved methods and found negative. Because no test methods can offer complete assurance that HIV, HCV, hepatitis B virus, or other infectious agents are absent, specimens and human-based reagents should be handled as if capable of transmitting infectious agents.
- The Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health recommended that potentially infectious agents be handled at the Biosafety Level 2.
- All solutions contain ProClin 300 as a preservative. Never pipette by mouth or allow reagents or patient sample to come into contact with skin. Reagents containing ProClin may be irritating. Avoid contact with skin and eyes. In case of contact, flush with plenty of water.
- Safety data sheet for all hazardous components contained in this kit is available on request from Svar Life Science.

Wash Solution (30x Conc.)**WARNING**

Contains: Reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 May cause an allergic skin reaction.
 H412 Harmful to aquatic life with long lasting effects.
 P261 Avoid breathing spray.
 P273 Avoid release to the environment.
 P280 Wear protective gloves.
 P333 + P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

Dilution Buffer CP, Conjugate Solution, Negative Control, Substrate pNPP

EUH208 Contains "Reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)" May produce an allergic reaction.
 EUH210: Safety data sheet available on request.

SPECIMEN COLLECTION

Blood samples are to be collected using aseptic venipuncture technique and serum obtained using standard procedures. A minimum of 5 mL of whole blood is recommended. Allow blood to clot in serum tubes, for 60-65 minutes at room temperature (20-25° C). Centrifuge blood samples and transfer cell-free serum to a clean tube. Sera must be properly handled to prevent in vitro complement activation. Sera should be frozen at -70° C or lower in tightly sealed tubes for extended storage or for transport on dry ice. Samples should not be frozen and thawed more than once.

Do not use sera which are icteric, lipemic and hemolyzed. Heat-inactivated sera cannot be used. Plasma cannot be used. The CLSI provides recommendations for storing blood specimens (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

KIT COMPONENTS AND STORAGE OF REAGENTS

- One frame with colorless break-apart wells (12x8) coated with human IgM, sealed in a foil pack with a desiccation sachet.
- 2 x 35 mL Diluent CP (Dil CP), labelled blue.
- 13 mL conjugate containing alkaline phosphatase-labelled antibodies to C5b-9 (blue colour).
- 13 mL Substrate solution ready to use.
- 30 mL wash solution 30x concentrated.
- 0.2 mL negative control (NC) containing human serum (to be diluted as for a patient serum sample).
- Lyophilized positive control (PC) containing freeze-dried human serum, to be reconstituted in 0.2 mL distilled water, see "Reconstitution of positive control", below.
- Lyophilized activity control (AC) for semi-quantitative application, containing freeze-dried human serum (different origin than PC), see "Reconstitution of activity control" under procedure for semi-quantitative application.

The positive control and the activity control should be stored at -20° C upon arrival.

Please note: The reconstitution volume for AC is indicated in Certificate of Analysis (CoA) (XXX µl) and on AC label.

All reagents in the kit are ready to use except wash solution and controls. The reagents should be stored at 2-8° C except the positive control and the activity control. The reconstituted positive control and activity control should be stored at -70° C and may be thawed once.

MATERIALS OR EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader with filter 405 nm.
- Precision pipettes with disposable tips.
- Washer for strips, absorbent tissue, tubes and a timer.

PROCEDURE – QUALITATIVE APPLICATION

Remove only the number of wells needed for testing, resealing the aluminium package carefully. Let all solutions equilibrate to room temperature (20-25° C) before analysis. Do not mix reagents between lots.

PREPARATION OF WASHING SOLUTION

In case salt crystals are observed in the vial with concentrated wash solution, place the vial at 37° C water bath until the crystals have dissolved before dilution of wash solution.

Dilute 30 mL of the 30x concentrated wash solution in 870 mL distilled water. When stored at 2-8° C, the diluted wash solution is stable until the date of expiration of the kit.

RECONSTITUTION OF POSITIVE CONTROL

Gently tap down all lyophilized material to the bottom of the vial and remove the cap. Immediately add 200 µL of distilled water directly to the lyophilized material. Replace the cap. Allow the vial to stand on ice for 5 minutes and then gently shake or vortex occasionally until completely dissolved. Dilute the reconstituted control in the same way as a patient serum sample. The reconstituted positive control can be stored for up to 4 hours prior to use if kept at 2-8° C or on ice. It should be stored at -70° C and may be thawed once.

SERUM

Partially thaw frozen sera by briefly placing in a 37° C water bath with gentle mixing. After partially thawing immediately place the tubes in an ice bath and leave on ice until completely thawed. Mix briefly on a vortex mixer.

DILUTION OF SERUM

Dilute the serum 1/101 with Diluent CP, blue label, (500 µL Diluent + 5 µL serum) and mix thoroughly but gently on a vortex. The diluted serum can be left at room temperature for a maximum of 60 minutes before analysis.

INCUBATION OF SAMPLES

Pipet 100 μ L/well in duplicate of Diluent (Dil) as a blank, positive control (PC), negative control (NC) and diluted patient's serum (P) according to the diagram below. Incubate for 60-70 minutes at +37° C with lid.

Classical Pathway

	1	2	3
A	Dil CP	P2	
B	Dil CP	P2	
C	PC	etc	
D	PC		
E	NC		
F	NC		
G	P1		
H	P1		

AFTER SERUM INCUBATION

Empty the wells and wash 3 times with 300 μ L washing solution, filling and emptying the wells each time. After the last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue.

ADDING CONJUGATE

Add 100 μ L conjugate to each well. Incubate for 30 minutes at room temperature (+20-25° C).

AFTER CONJUGATE INCUBATION

Wash 3 times as before.

ADDING SUBSTRATE SOLUTION

Add 100 μ L substrate solution to each well, incubate for 30 minutes at room temperature (+20-25° C). Read the absorbance at 405 nm on a microplate reader. (5 mM EDTA can be used as stop solution, 100 μ L/well. Read the absorbance of the wells within 60 minutes.)

CALCULATION OF RESULT

Subtract the absorbance of the Blank (Diluent) from the absorbances of the NC, PC and the samples. The absorbance of the positive control should be >1.0 and the negative control absorbance < 0.2 after subtraction of the Blank.

Calculate the mean OD_{405nm} values for the sample, PC and NC and calculate the % complement activity as follows: $(\text{Sample}-\text{NC})/(\text{PC}-\text{NC})\times 100$. The negative and positive controls are intended to monitor for substantial reagent failure. The positive control will not ensure precision at the assay cut-off. It is recommended that each laboratory establish its own reference level and cut-off value for deficiencies.

If any of the controls are not within their respective range, the test should be considered as invalid and repeated.

QUALITY CONTROL

CoA included in this kit is lot specific and is to be used to verify results obtained by your laboratory. The results indicated on CoA are to be used as a guideline only. The results obtained by your laboratory may differ.

LIMITATIONS

The individual patient's complement level can not be used as a measure of disease severity, as it may vary from patient to patient. Thus, it is difficult to obtain an absolute standardization of results.

The test should not be relied upon as the sole basis of decisions on clinical therapy, but should be used in combination with clinical symptoms and the results of other available tests. Therapy should not be started on basis of the complement assay result. Initiation or changes in treatment should not be based on changes in complement levels alone, but rather on careful clinical observation.

EXPECTED RESULTS

When decreased levels of complement components or complement function are found, a deficiency or an ongoing, immunologic process, leading to increased breakdown of components and depression of complement levels is considered by clinicians.

The normal distribution within 2SD has, for the qualitative assay, been determined to be 69-129% of the positive control, see table 1. Results within this range indicate a normal functionality of the classical pathway. It is recommended that each laboratory confirms or establishes own reference range for the population they serve.

A value below the 69-129% range indicates either increased activation, resulting in consumption of the classical complement pathway capacity, or a genetically determined low activity.

Values below 5% strongly suggest a complete deficiency either caused by excessive activation or an inherited deficiency in the classical pathway. To establish which complement factor(s) causes the lowered activity further analysis of complement proteins is needed.

A negative result i.e. suspected deficiency, should always be verified by testing a new, carefully handled sample to ensure that no in vitro complement activation has taken place.

Increased complement levels are usually a nonspecific expression of an acute phase response.

The Wieslab® Complement system Classical Pathway can be helpful for detection of complement deficiencies related to the Classical Pathways as shown in the table below: A more complete and in-depth functional assessment of all three complement pathways may be achieved using Wieslab® Complement system Screen.

Classical pathway	MBL pathway	Alternative pathway	Possible deficiency
Positive	Positive	Positive	None
Negative	Positive	Positive	C1q, C1r, C1s
Positive	Positive	Negative	Properdin, Factor B, D
Positive	Negative	Positive	MBL, MASP2
Negative	Negative	Negative	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negative	Negative	Positive	C4, C2 or combination

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

120 sera from blood donors were tested and the normal reference range was calculated. The values were expressed in % of the positive control. See Figure 1 and Table 1. No blood donor was below 40 %.

Figure 1.

CP Qualitative application

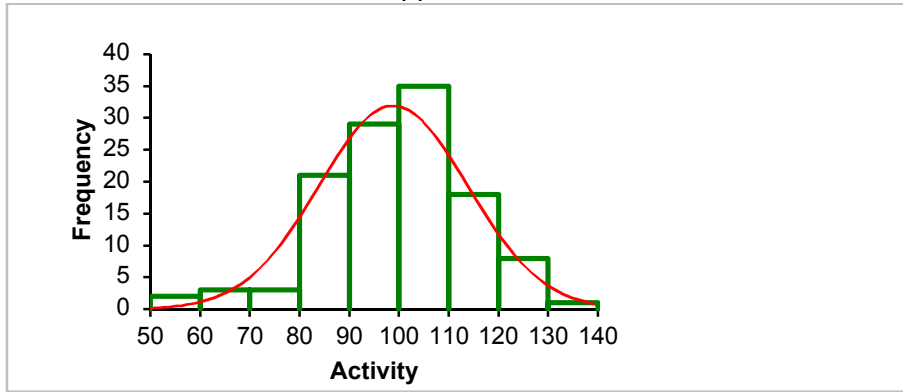


Table 1.

	n	Mean (%)	±2SD (%)	Median (%)
Classical pathway	120	99	69-129*	100

*)This is a statistical calculation and will not guarantee a true cut-off.

It's recommended that each laboratory establish its own reference level and cut-off value for suspected deficiency.

Table 2.

Sera with known complement deficiencies were tested in the assay and the following results were obtained. All deficient sera were detected in the assay and gave values below 5 %**).

Deficiency	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Number of patients	5	1	1	1	2	2
Number of deficient sera detected	5	1	1	1	2	2

**)) See "M.A. Seelen et. al, Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. J Immunol Meth 2005, 296, 187-198", for extended tests of deficient patient samples tested with qualitative application

Depletion	C1q	C3	C4	C5	C7
Number of depleted sera	2	1	1	1	1
Number of detected depletion	2	1	1	1	1

Table 3. Inter-assay precision for qualitative application was determined by testing three samples in duplicate. Results were obtained for six different runs.

	CP P1	CP P2	CP P3
Mean value			
%	98	92	21
SD	4.3	3.9	1.7
CV%	4	4	8

Table 4. Intra-assay precision for qualitative application was determined by testing one sample in 40 wells.

Assay	Mean value %	SD	CV %
CP	85	2.9	3

PROCEDURE – SEMI-QUANTITATIVE APPLICATION

The semi-quantitative application differ from the qualitative in that a calibration curve is made by diluting the kit PC giving a calibration curve with 100, 75, 50, 25 and 12.5% activity. Remove only the number of wells needed for testing, resealing the aluminium package carefully. Let all solutions equilibrate to room temperature (20-25° C) before analysis. Do not mix reagents between lots.

PREPARATION OF WASHING SOLUTION

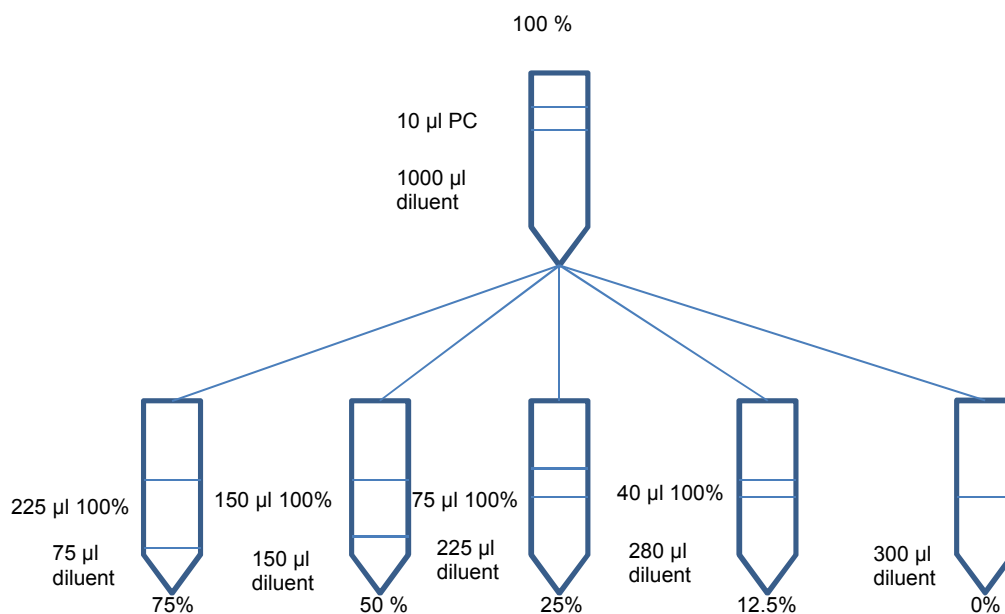
In case salt crystals are observed in the vial with concentrated wash solution, place the vial at 37°C water bath until the crystals have dissolved before dilution of wash solution.

Dilute 30 mL of the 30x concentrated wash solution in 870 mL distilled water. When stored at 2-8° C, the diluted wash solution is stable until the date of expiration of the kit.

RECONSTITUTION OF POSITIVE CONTROL AND DILUTION FOR USE AS CALIBRATOR

Gently tap down all lyophilized material to the bottom of the vial and remove the cap. Immediately add 200 µL of distilled water directly to the lyophilized material. Reattach the cap. Allow the vial to stand on ice for 5 minutes and then gently shake or vortex occasionally until completely dissolved. The reconstituted positive control can be stored for up to 4 hours prior to use if kept at 2-8° C or on ice. It can be frozen at -70° C and thawed once.

For dilution of reconstituted positive control to calibrators please see picture below.



The calibrator can be left at RT up to 1 h before use. The calibrator must be prepared fresh and cannot be stored at -20 °C after dilution for later usage.

RECONSTITUTION OF ACTIVITY CONTROL (AC)

Gently tap down all lyophilized material to the bottom of the vial and remove the cap. Add immediately the volume distilled water indicated in the CoA /AC label directly to the lyophilized material. Reattach the cap. Allow the vial to stay on ice for 5 minutes and then shake or vortex gently until complete dissolution. Dilute the reconstituted control in the same way as a patient serum sample. The reconstituted activity control can be stored for up to 4 hours prior to use if kept at 2-8° C or on ice. It can be stored at -70° C and thawed once.

SERUM

Partially thaw frozen sera by briefly placing in a 37° C water bath with gentle mixing. After partially thawing immediately place the tubes in an ice bath and leave on ice until completely thawed. Briefly mix on a vortex mixer.

DILUTION OF SERUM AND THE ACTIVITY CONTROL

Dilute the serum 1/101 with Diluent CP, blue label, (500 µL Diluent + 5 µL serum) and mix thoroughly but gently on a vortex. The diluted serum and activity control can be left at room temperature for maximum 60 minutes before analysis.

INCUBATION OF SAMPLES

Pipet 100 µL/well in duplicate of calibrator (100%-0%), negative control (NC), and activity control (AC) and diluted patient's serum (P) according to the diagram. Incubate for 60-70 minutes at +37° C with lid.

Classical Pathway

	1	2	3
A	100 %	12.5 %	P1
B	100 %	12.5 %	P1
C	75 %	0 %	P2
D	75 %	0%	P2
E	50 %	NC	etc
F	50 %	NC	
G	25 %	AC	
H	25 %	AC	

AFTER SERUM INCUBATION

Empty the wells and wash 3 times with 300 µL washing solution, filling and emptying the wells each time. After the last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue.

ADDING CONJUGATE

Add 100 µL conjugate to each well. Incubate for 30 minutes at room temperature (+20-25° C).

AFTER CONJUGATE INCUBATION

Wash 3 times as before.

ADDING SUBSTRATE SOLUTION

Add 100 µL substrate solution to each well, incubate for 30 minutes at room temperature (+20-25° C). Read the absorbance at 405 nm on a microplate reader. (5 mM EDTA can be used as stop solution, 100 µL/well. Read the absorbance of the wells within 60 minutes.)

CALCULATION OF RESULT

Curve fit 4-parameter logistic (Marquardt) is recommended. Subtract the absorbance of the 0 % - calibrator from all OD values.

The absorbance of Calibrator 100% should be > 1.0, NC absorbance < 0.2 and AC activity >30%.

In cases where the obtained sample values are higher than the highest Calibrator 100%, the samples can be diluted 1/201 and retested.

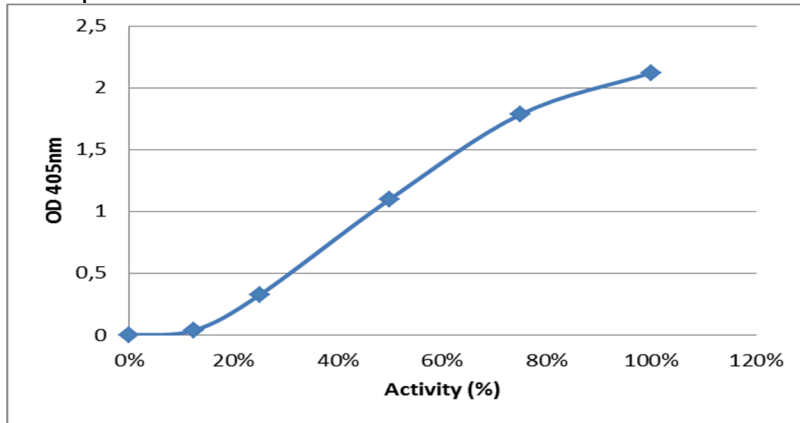
Please note that the obtained activity value in this case should be adjusted according to applied sample dilution.

If any of controls are not within their respective ranges, the test should be considered as invalid and then repeated.

It is recommended that each laboratory establish its own reference level and cut-off value for deficiencies.

CoA included in the kit, is lot specific, and is to be used to verify results obtained by our laboratory. The results indicated on CoA are to be used as a guideline only. The results obtained by your laboratory may differ.

Example of a standard curve



Please Note: The figure above shows an example of a semi-quantitative standard curve and should not be used for actual patient sample interpretation.

LIMITATIONS

The individual patient's complement level cannot be used as a measure of disease severity, as it may vary from patient to patient. Thus, it is difficult to obtain an absolute standardization of results. The test should not be relied upon as the sole basis of decisions on clinical therapy, but should be used in combination with clinical symptoms and the results of other available tests. Therapy should not be started on basis of the complement assay result. Initiation or changes in treatment should not be based on changes in complement levels alone, but rather on careful clinical observation.

EXPECTED RESULTS

When decreased levels of complement components or complement function are found, a deficiency or an ongoing, immunologic process, leading to increased breakdown of components and depression of complement levels is considered by clinicians.

The normal distribution within 2SD has, for the semi-quantitative assay, been determined to be 66-113% of the positive control, see table 5. Results within this range indicate a normal functionality of the classical pathway. It is recommended that each laboratory confirms or establishes own reference ranges for the population they serve.

A value below the 66-113% range indicates either increased activation, resulting in consumption of the classical complement pathway capacity, or a genetically determined low activity.

Values below 15% strongly suggest a complete deficiency either caused by excessive activation or an inherited deficiency in the classical pathway. To establish which complement factor(s) causes the lowered activity further analysis of complement proteins is needed.

A negative result i.e. suspected deficiency, should always be verified by testing a new, carefully handled sample to ensure that no in vitro complement activation has taken place.

Increased complement levels are usually a nonspecific expression of an acute phase response.

The Wieslab® Complement system Classical Pathway can be helpful for detection of complement deficiencies related to the Classical Pathways as shown in the table below. A more complete and in-depth functional assessment of all three complement pathways may be achieved using Wieslab® Complement system Screen.

Classical pathway	MBL pathway	Alternative pathway	Possible deficiency
Positive	Positive	Positive	None
Negative	Positive	Positive	C1q, C1r, C1s
Positive	Positive	Negative	Properdin, Factor B, D
Positive	Negative	Positive	MBL, MASP2
Negative	Negative	Negative	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negative	Negative	Positive	C4, C2 or combination

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

120 sera from blood donors were tested and the normal reference range was calculated. See Figure 2 and Table 3. No blood donor was below 40 %.

Calibrator measurement range: 12.5% - 100 %
 Limit of Detection (LOD) = 8%

Figure 2. CP semi-quantitative

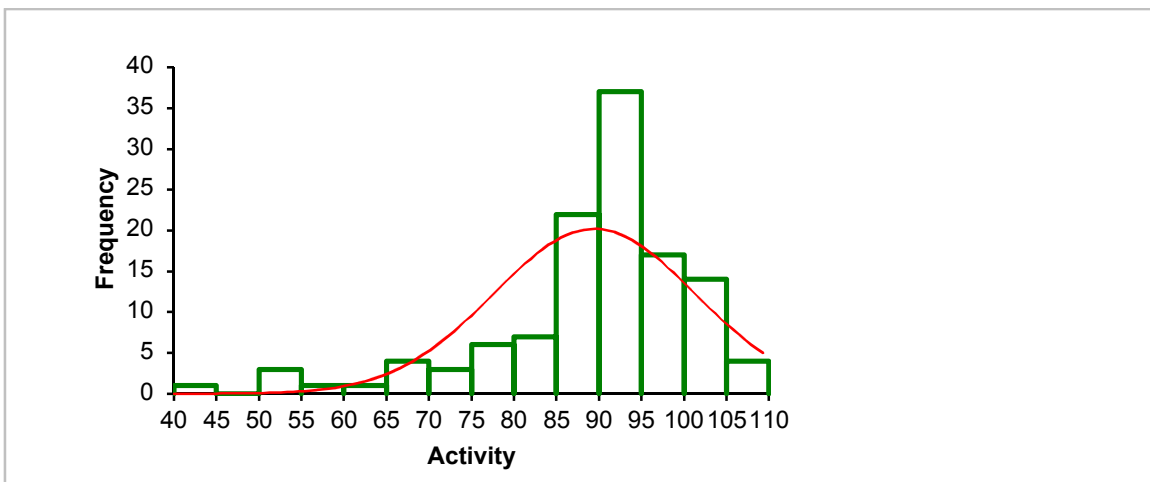


Table 5.

	n	Mean (%)	±2SD (%)	Median (%)
Semi-quantitative application	120	89	66-113*	92

This is a statistic calculation and will not guarantee a true cut-off. It is recommended that each laboratory establish its own reference level and cut-off value for deficiency.

*) Including samples diluted 1/201 to end up on the curve

Table 6.

Sera with known complement deficiencies and specific complement factor depleted sera were tested in the assay. All deficient/depleted sera were low in the assay and gave values below 15 %.

Deficiency	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Number of patients	5	1	1	1	2	2
Number of deficient sera detected	5	1	1	1	2	2

Depletion	C1q	C3	C4	C5	C7
Number of depleted sera	2	1	1	1	1
Number of detected depletion	2	1	1	1	1

Table 7. Inter-assay precision for semi-quantitative application was determined by testing seven samples in eight replicates at three different occasions.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value %	71	73	69	72	25	35	31
SD	9	9	6	11	1	2	2
CV%	13%	13%	9%	15%	4%	5%	5%

Table 8. Intra-assay precision for semi-quantitative application was determined by testing seven different samples in eight replicates at one occasion.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value %	79	76	72	83	24	34	30
SD	10	11	6	9	0	1	1
CV%	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

Table 9. Batch to batch variation semi-quantitative application was determined by testing seven samples in duplicate on three different batches by three different persons.

Sample	1	2	3	4	5	6	7
Mean value (%)	8	73	85	24	37	74	78
SD	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
%CV	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

Table 10.

Dilution recovery was determined by testing five serial dilutions for three different samples.

Sample	Dilution	Mean Measured Activity (%)	Theoretical Activity (%)	Dilution Corrected % Recovery
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
Sample	Dilution	Mean Measured Activity (%)	Theoretical Activity (%)	Dilution Corrected % Recovery
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
Sample	Dilution	Mean Measured Activity (%)	Theoretical Activity (%)	Dilution Corrected % Recovery
3	1/100	84	84	100
	1/200	37	42	88
	1/400	21	21	100
	1/800	11	11	100
	1/1600	7	6	117












TROUBLESHOOTING

PROBLEM	POSSIBLE CAUSES	SOLUTION
Control values out of range	Incorrect temperature, timing or pipetting, reagents are not mixed	Check that the time and temperature were correct. Repeat test.
	Cross contamination of controls	Pipette carefully.
	Optical pathway is not clean.	Check for the dirt or air-bubbles in the wells. Wipe plate bottom and reread.
	Controls (positive and/or activity controls) are not correctly reconstituted. Improper dilution of calibrator.	Check the controls, dissolve a new. Check the preparation and make a new dilution.
All test results negative	One or more reagents are not added, or added in wrong sequence.	Recheck procedure. Check for unused reagents. Repeat test.
	Antigen coated plate is inactive.	Check for obvious moisture in unused wells. Wipe plate bottom and reread.
	Serum inactive.	Dilute new samples.
All test results yellow.	Contaminated buffers or reagents.	Check all solutions for turbidity.
	Washing solution is contaminated.	Use clean container. Check the quality of water used for preparation of solution.
	Improper dilution of serum.	Repeat test.
Poor precision.	Pipette delivery CV >5% or samples not mixed.	Check the calibration of pipette. Use reproducible technique. Avoid air bubbles in pipette tip.
	Serum or reagents are not mixed sufficiently or not equilibrated to room temperature.	Mix all reagents gently but thoroughly and equilibrate to room temperature.
	Reagent addition is taking too long time, inconsistency in timing intervals.	Develop consistent uniform technique and use multi-tip device or auto-dispenser to decrease time.
	Optical pathway not clean.	Check for air bubbles in the wells. Wipe plate bottom and reread.
	Washing not consistent, trapped bubbles, washing solution left in the wells.	Check that all wells are filled and aspirated uniformly. Dispense liquid above level of reagent in the well. After last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue.

REFERENCES:

- Walport M. Complement (First of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1058-66.
- Walport M. Complement (Second of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1140-44.
- Roos A et al. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol* 2003; 39:655-68.
- Fredriksson GN et al. New procedure for detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. *J Immunol Meth* 1993; 166:263-70.
- Seelen MA et al. Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Meth* 2005; 296:187-98.
- Salvador-Morales C, Sim RB. *Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials*. 2013, 1st Ed, World Scientific Publishing (ISBN: 978-4390-25-5).
- Tudoran R & Kirschfink M. *Modern Complement analysis: indications, methods and outlook*. *LaboratoriumsMedizin* 2012; 36(3):--.
- Botto M et al. Complement in human disease: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol* 2009; 46:2774-83.
- Mollnes TE et al. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 2007; 44:3838-49.
- Nilsson B, Nilsson Ekdahl K. *Complement Diagnostics: Concepts, Indications, and Practical Guidelines*. *Clin Develop Immunol*; 2012, Art ID 962702.

EXPLANATION OF SYMBOLS. L'EXPLICATION DE SYMBOLES. LA EXPLICACIÓN DE SIMBOLOS. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE. LA SPIEGAZIONE DI SIMBOLI. FORKLARING TIL SYMBOLER. SYMBOLFORKLARING. FÖRKLARINGAR TILL SYMBOLER.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numerodi lotto. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbeverages ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
 96	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 tester.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno. Antigen. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Conjugato. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konz. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL -	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Negativ control. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
CONTROL + LYO	Lyophilized positive control. Contrôle positif lyophilisé. Control positivo liofilizado. Lyophilisierte Positivkontrolle. Controllo positivo liofilizzato. Frysetørret positiv kontrol. Lyofilisert positiv kontroll. Frystorkad positiv kontroll.
CONTROL AC LYO	Lyophilized activity control. Contrôle d'activité lyophilisé. Control de actividad liofilizado. Lyophilisierte Aktivitätskontrolle. Controllo dell'attività liofilizzata. Frysetørret aktivitetskontrol. Lyofilisert aktivitetskontroll. Lyofiliserad aktivitetskontroll.
CH REP	Swiss Representative. Représentant Suisse. Representante suizo. Schweizer Vertreter. Rappresentante svizzero. Schweizisk repræsentant. Sveitsisk representant. Schweizisk representant

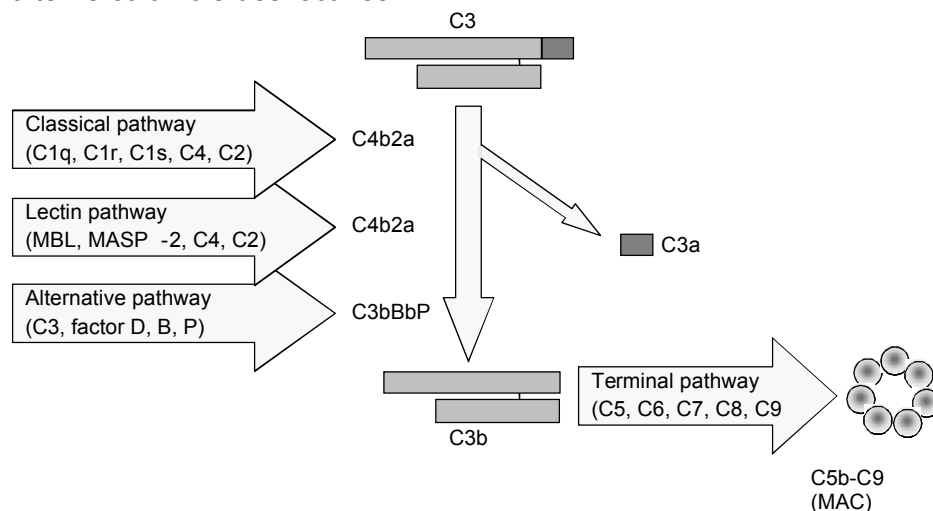
UTILISATION

Le test de la voie classique du système du complément Wieslab® est un dosage immunoenzymatique pour la détermination qualitative et/ou semi-quantitative de la voie du complément classique fonctionnelle dans le sérum humain. L'analyse doit être réalisée par des professionnels de laboratoires spécialement formés.

POUR DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le système du complément joue un rôle essentiel dans les maladies chroniques, auto-immunes et infectieuses. Il existe trois voies d'activation du complément (fig. 1), à savoir la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines.



Une activité du complément déficiente a pour conséquence d'exposer les humains à des risques d'infections fulminantes ou graves répétitives et peut contribuer au développement d'une maladie auto-immune. Une activation inappropriée du complément contribue à une inflammation et à des lésions tissulaires chroniques.

L'activation in vitro de la séquence du complément entraîne la consommation de composants du complément, laquelle entraîne à son tour une baisse de leur concentration. Ainsi, la détermination des protéines du complément ou de l'activité du complément sert d'indicateur pour déterminer si le système de complément a été activé par un mécanisme immunologique et/ou pathogène. Des mesures à la fois fonctionnelles et immunochimiques du complément sont utilisées pour évaluer les patients en cas de suspicion d'une maladie activatrice du complément ou de possibilité de déficit héréditaire. Le niveau d'activité du complément, évalué par des essais fonctionnels tels que la trousse du complément Wieslab®, tient compte du taux de synthèse, de dégradation et de consommation des composants et fournit une mesure de l'intégrité des voies, par opposition aux procédés immunochimiques qui mesurent spécifiquement la concentration de différents composants du complément.

PRINCIPE DU TEST DE LA VOIE CLASSIQUE DU COMPLÉMENT WIESLAB®

Le test de la voie classique du complément Wieslab® combine les principes de l'essai hémolytique pour l'activation du complément avec l'utilisation d'anticorps marqués spécifiques pour le néoantigène produit en conséquence de l'activation du complément. La quantité de néoantigène générée est proportionnelle à l'activité fonctionnelle des voies du complément.

Dans la trousse CP du complément, les puits des barrettes de microtitration sont revêtus d'activateurs spécifiques de la voie classique. Ceux-ci, en combinaison avec une composition tampon de dilution de l'échantillon et un niveau de dilution du sérum du patient, assurent que seule la voie classique est activée.

Pendant l'incubation du sérum du patient dilué dans les puits, le complément est activé par ce revêtement spécifique. Les puits sont ensuite lavés et la quantité de complexe C5b-9 formé sur la surface de la plaque est détectée avec un anticorps spécifique marqué à la phosphatase alcaline dirigé contre le néoantigène C5b-9 formé pendant la formation du MAC (complexe d'attaque membranaire).

Après une autre étape de lavage, la détection des anticorps spécifiques est obtenue par une incubation avec une solution substrat de la phosphatase alcaline. La quantité d'activation du complément, qui est corrélée à l'intensité de la coloration, est mesurée en termes d'absorbance (densité optique, DO).

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS POUR UN USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

Les composants du sérum humain utilisés dans la préparation des contrôles de la trousse ont été testés par des méthodes approuvées par la FDA et se sont avérés négatifs pour la présence d'anticorps dirigés contre le virus de l'immunodéficience humaine 1 et 2 (VIH 1 et 2), le virus de l'hépatite C (VHC), ainsi que d'antigène de surface de l'hépatite B. Comme aucune méthode de test ne peut garantir à 100 % l'absence de VIH, VHC, virus de l'hépatite B ou d'autres agents infectieux, les échantillons et les réactifs d'origine humaine doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux.

Les Centers for Disease Control and Prevention (Centres de contrôle et de prévention des maladies - CDC) et le National Institutes of Health (Instituts nationaux de la santé - NIH) recommandent de manipuler les agents potentiellement infectieux conformément au niveau de biosécurité 2.

Toutes les solutions contiennent du ProClin 300 comme conservateur. Ne jamais pipeter à la bouche et ne jamais laisser les réactifs ou les échantillons de patients entrer en contact avec la peau. Les réactifs contenant du ProClin peuvent être irritants. Éviter tout contact avec la peau et avec les yeux. En cas de contact, rincer abondamment à l'eau.

Une fiche de données de sécurité pour tous les composants dangereux contenus dans cette trousse est disponible sur demande auprès d'Svar Life Science.

Solution de lavage (30 x conc.)



ATTENTION

Contenir: Mélange de: 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P261 : Éviter de respirer les aérosols.

P273 : Éviter le rejet dans l'environnement

P280 : Porter des gants de protection.

P333+P313 : En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.

Tampon de dilution CP, Solution de conjugué, Contrôle négatif et Substrat pNPP

EUH208 : Contient Mélange de: 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [No. CE 247-500-7] et 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [No. CE 220-239-6] (3:1). Peut produire une réaction allergique.

EUH210: Fiche de données de sécurité disponible sur demande.

PRELEVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons de sang doivent être prélevés par une technique de ponction veineuse aseptique et le sérum doit être obtenu en utilisant des procédures standard. Un minimum de 5 ml de sang total est recommandé. Laisser le sang coaguler dans des tubes à sérum, pendant 60 à 65 minutes à température ambiante (20-25 °C). Centrifuger les échantillons de sang et transférer le sérum acellulaire dans un tube propre. Les sérums doivent être manipulés de manière adéquate pour prévenir toute activation du complément in vitro. Les sérums doivent être congelés à une température de -70 °C ou inférieure dans des tubes hermétiques pour un stockage prolongé ou un transport sur de la glace sèche. Les échantillons doivent être soumis à un seul cycle de congélation/décongélation.

Ne pas utiliser de sérums ictériques, lipémiques et hémolysés. Les sérums inactivés par la chaleur ne peuvent pas être utilisés. Le plasma ne peut pas être utilisé. Le CLSI donne des recommandations pour le stockage des échantillons de sang (Procédures standard approuvées pour la manipulation et le traitement des échantillons de sang, H18A, 1990).

COMPOSANTS DE LA TROUSSE ET CONSERVATION DES RÉACTIFS

- Un cadre avec des puits sécables sans couleur (12 x 8) revêtus d'IgM humaine, conditionné dans un emballage en aluminium hermétique avec un dessicant.
- 2 x 35 ml de diluent CP (Dil CP), marqué en bleu.
- 13 ml de conjugué contenant des anticorps marqués à la phosphatase alcaline dirigés contre C5b-9 (couleur bleue).
- 13 ml de solution substrat prête à l'emploi.
- 30 ml de solution de lavage concentrée 30x.
- 0.2 ml de contrôle négatif (CN) contenant du sérum humain (à diluer comme pour un échantillon de sérum d'un patient).
- Contrôle positif (CP) lyophilisé contenant du sérum humain lyophilisé, à reconstituer dans 0.2 ml d'eau distillée (voir « Reconstitution du contrôle positif » ci-dessous).
- Contrôle d'activité (CA) lyophilisé pour application semi-quantitative, contenant du sérum humain lyophilisé (origine différente du CP). Voir « Reconstitution du contrôle d'activité » sous la procédure d'application semi-quantitative.

Le contrôle positif et le contrôle d'activité doivent être stockés à -20 °C dès réception.

Remarque : Le volume de reconstitution du CA est indiqué sur le Certificat d'analyse (CoA) (XXX µl) et sur l'étiquette du CA.

Tous les réactifs de la trousse sont prêts à l'emploi à l'exception de la solution de lavage et des contrôles. Les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C, à l'exception du contrôle positif et du contrôle d'activité. Le contrôle positif et le contrôle d'activité doivent être stockés à -70 °C et ne peuvent être décongelés qu'une seule fois.

MATÉRIEL OU ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Lecteur de microplaques avec filtre à 405 nm.
- Pipettes de précision à pointes jetables.
- Laveur pour barrettes, papier absorbant, tubes et minuteur.

PROCÉDURE – APPLICATION QUALITATIVE

Retirer uniquement le nombre de puits nécessaires pour les tests et refermer soigneusement l'emballage en aluminium. Laisser toutes les solutions s'équilibrer à température ambiante (20-25 °C) avant analyse. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots.

PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE LAVAGE

En cas d'observation de cristaux de sel dans le flacon contenant la solution de lavage concentrée, placer le flacon dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à dissolution complète des cristaux avant de procéder à la dilution de la solution de lavage.

Diluer 30 ml de la solution de lavage concentrée 30x dans 870 ml d'eau distillée. Lorsqu'elle est conservée entre 2 et 8 °C, la solution de lavage diluée est stable jusqu'à la date de péremption de la trousse.

RECONSTITUTION DU CONTRÔLE POSITIF

Tapoter doucement pour faire descendre toute la matière lyophilisée au fond du flacon et retirer le bouchon. Ajouter immédiatement 200 µl d'eau distillée directement à la matière lyophilisée. Remettre le bouchon. Laisser reposer le flacon sur de la glace pendant 5 minutes, puis l'agiter délicatement ou le faire tourbillonner de temps en temps jusqu'à dissolution complète. Diluer le contrôle reconstitué de la même manière que l'échantillon de sérum du patient. Le contrôle positif reconstitué peut être conservé jusqu'à 4 heures avant utilisation s'il est conservé entre 2 et 8 °C ou sur de la glace. Il doit être stocké à -70 °C et ne peut être décongelé qu'une seule fois.

SÉRUM

Décongeler partiellement les sérums congelés en les plaçant dans un bain d'eau à 37 °C et en remuant doucement. Une fois qu'ils sont partiellement décongelés, placer les tubes dans un bain de glace et les laisser sur la glace jusqu'à ce qu'ils soient totalement décongelés. Mélanger brièvement sur un agitateur vortex.

DILUTION DU SÉRUM

Diluer le sérum 1/101 avec le diluant CP, étiquette bleue, (500 µl de diluant + 5 µl de sérum) et bien mélanger mais délicatement sur un agitateur vortex. Le sérum dilué peut être laissé à température ambiante pendant 60 minutes maximum avant l'analyse.

INCUBATION DES ÉCHANTILLONS

Pipeter en double 100 µl/puits de diluant (Dil) comme un blanc, de contrôle positif (CP), de contrôle négatif (CN) et de sérum du patient (P) dilué conformément au schéma ci-dessous. Laisser incuber pendant 60 à 70 minutes à +37 °C avec le couvercle.

Voie classique

	1	2	3
A	Dil CP	P2	
B	Dil CP	P2	
C	CP	etc	
D	CP		
E	CN		
F	CN		
G	P1		
H	P1		

APRÈS INCUBATION DU SÉRUM

Vider les puits et laver 3 fois avec 300 µl de solution de lavage, en remplissant et en vidant les puits à chaque fois. Après le dernier lavage, vider les puits en tapotant la barrette sur un papier absorbant.

AJOUT DU CONJUGUÉ

Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits. Laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante (+20-25 °C).

APRÈS INCUBATION DU CONJUGUÉ

Laver 3 fois comme précédemment.

AJOUT DE LA SOLUTION SUBSTRAT

Ajouter 100 µl de solution substrat dans chaque puits, laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante (+20-25 °C). Mesurer l'absorbance à 405 nm sur un lecteur de microplaque. (Il est possible d'utiliser de l'EDTA 5 mM comme solution d'arrêt, à 100 µl/puits. Mesurer l'absorbance des puits dans les 60 minutes.)

CALCUL DU RÉSULTAT

Soustraire l'absorbance du blanc (diluant) des absorbances du CN, du CP et des échantillons. L'absorbance du contrôle positif doit être >1,0 et l'absorbance du contrôle négatif < 0.2 après soustraction du blanc.

Calculer les valeurs DO405 nm moyennes pour l'échantillon, le CP et le CN, et calculer le pourcentage d'activité du complément de la façon suivante : $(\text{Échantillon-CN})/(\text{CP-CN}) \times 100$. Les contrôles négatif et positif sont destinés à surveiller toute détérioration significative des réactifs. Le contrôle positif ne garantira pas la précision de la valeur seuil du test. Il est recommandé que chaque laboratoire définisse son propre niveau de référence et sa propre valeur seuil pour les déficits.

Si l'un des contrôles n'est pas dans sa plage respective, le test doit être considéré comme invalide et doit être répété.

CONTRÔLE QUALITÉ

Le CoA inclus dans cette trousse est spécifique au lot et doit être utilisé pour vérifier les résultats obtenus par votre laboratoire. Les résultats figurant sur le CoA sont indiqués à titre de recommandation uniquement. Il se peut que les résultats obtenus par votre laboratoire soient différents.

LIMITES

Le taux du complément d'un patient particulier ne peut pas servir à mesurer la gravité d'une maladie, car ce taux peut varier d'un patient à l'autre. Ainsi, il est difficile d'obtenir une normalisation absolue des résultats.

Ce test ne doit pas être interprété à lui seul pour prendre des décisions relatives au traitement clinique, mais il doit être utilisé en combinaison avec les symptômes cliniques et les résultats d'autres tests disponibles. Aucun traitement ne doit être initié en se basant sur le résultat du test de complément. Toute initiation ou modification d'un traitement ne doit pas s'appuyer sur les seuls changements des taux du complément, mais plutôt sur un examen clinique minutieux.

RÉSULTATS ATTENDUS

Lorsque l'on observe des taux réduits de certains composants du complément ou de la fonction du complément, les cliniciens doivent envisager un déficit ou un processus immunologique en cours, entraînant une dégradation accrue des composants et une baisse des taux de complément.

Pour l'analyse qualitative, il a été déterminé que la distribution normale à +/- 2ET était de 69 à 129 % du contrôle positif (voir tableau 1). Les résultats situés dans cette plage indiquent un fonctionnement normal de la voie classique. Il est recommandé que chaque laboratoire confirme ou établisse sa propre plage de référence pour la population concernée.

Une valeur inférieure à la plage de 69 à 129 % indique soit une activation accrue, entraînant la consommation de la capacité de la voie classique du complément, soit une faible activité génétiquement déterminée.

Les valeurs inférieures à 5 % suggèrent fortement un déficit complet, causé soit par une activation excessive, soit par un déficit héréditaire de la voie classique. Pour déterminer quel(s) facteur(s) du complément provoque(nt) la baisse d'activité, une analyse plus approfondie des protéines du complément s'impose.

Un résultat négatif, autrement dit la suspicion d'un déficit, doit toujours être vérifié par le test d'un nouvel échantillon, qui doit être manipulé avec soin pour s'assurer qu'aucune activation in vitro du complément n'a eu lieu.

L'augmentation des taux du complément est généralement une expression non spécifique d'une réponse de phase aiguë.

Le test de la voie classique du système de complément Wieslab® peut être utile pour la détection des déficits en complément liés aux voies classiques, comme indiqué dans le tableau ci-dessous : Une évaluation fonctionnelle plus complète et plus approfondie de l'ensemble des trois voies du complément peut être réalisée en utilisant le criblage du système de complément Wieslab®.

Voie classique	Voie MBL	Voie alterne	Déficit possible
Positive	Positive	Positive	Aucun
Négative	Positive	Positive	C1q, C1r, C1s
Positive	Positive	Négative	Properdine, Facteur B, D
Positive	Négative	Positive	MBL, MASP2
Négative	Négative	Négative	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Négative	Négative	Positive	C4, C2 ou combinaison

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

120 sérums de dons de sang ont été testés et la plage de référence normale a été calculée. Les valeurs étaient exprimées en % du contrôle positif. Voir Figure 1 et Tableau 1. Aucun don de sang n'était inférieur à 40 %.

FIGURE 1.

CP Application qualitative

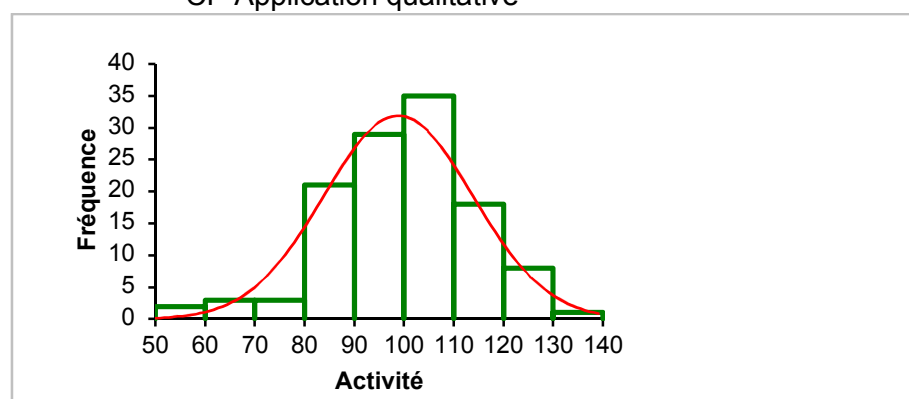


TABLEAU 1.

	n	Moyenne (%)	± 2 ET (%)	Médiane (%)
Voie classique	120	99	69-129*	100

*) Il s'agit d'un calcul statistique qui ne garantit pas un véritable seuil.

Il est recommandé que chaque laboratoire définisse son propre niveau de référence et sa propre valeur seuil pour le déficit suspecté.

TABLEAU 2.

Des sérums présentant des déficits en complément connus ont été testés dans l'essai et les résultats suivants ont été obtenus. Tous les sérums déficitaires ont été détectés dans l'essai et ont donné des valeurs inférieures à 5 % (**).

Déficit	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Nombre de patients	5	1	1	1	2	2
Nombre de sérums déficitaires détectés	5	1	1	1	2	2

**) Voir « M.A. Seelen et. al, Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. J Immunol Meth 2005, 296, 187-198 », pour des tests approfondis d'échantillons de patient déficitaires testés par application qualitative

Appauvrissement	C1q	C3	C4	C5	C7
Nombre de sérums appauvris	2	1	1	1	1
Nombre d'appauvrissements détectés	2	1	1	1	1

TABLEAU 3. La précision inter-essais pour l'application qualitative a été déterminée en testant trois échantillons en double. Des résultats ont été obtenus pour six analyses différentes.

	CP P1	CP P2	CP P3
Mean value %	98	92	21
SD	4.3	3.9	1.7
CV%	4	4	8

TABLEAU 4. La précision intra-essai pour l'application qualitative a été déterminée en testant un échantillon dans 40 puits.

Essai	Valeur moyenne en %	ET	% CV
CP	85	2.9	3

PROCÉDURE – APPLICATION SEMI-QUANTITATIVE

L'application semi-quantitative diffère de l'application qualitative en ce qu'une courbe d'étalonnage est tracée en diluant le CP de la trousse donnant une courbe d'étalonnage avec une activité de 100, 75, 50, 25 et 12,5 %. Retirer uniquement le nombre de puits nécessaires pour les tests et refermer soigneusement l'emballage en aluminium. Laisser toutes les solutions s'équilibrer à température ambiante (20-25 °C) avant analyse. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots.

PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE LAVAGE

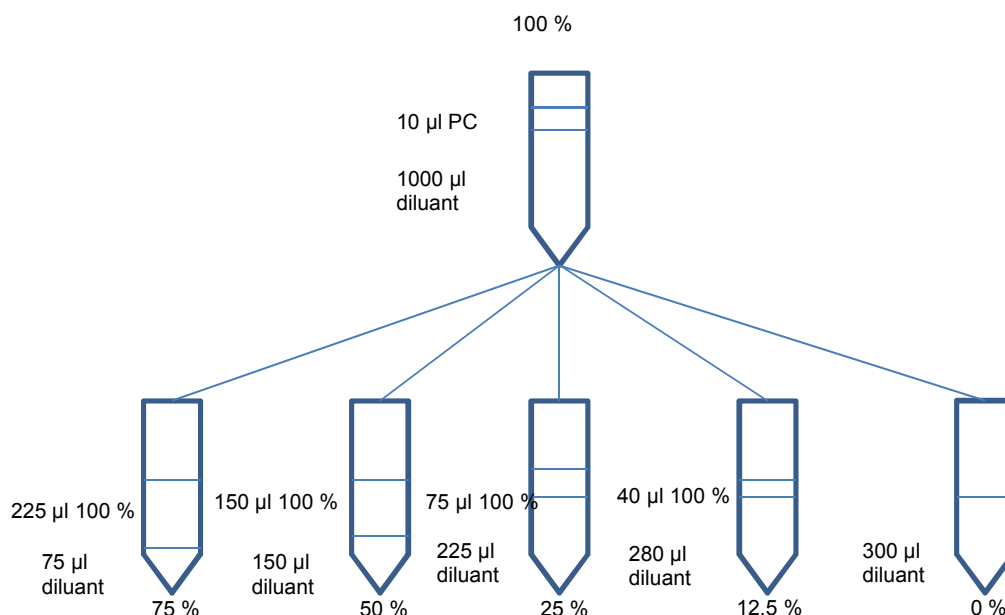
En cas d'observation de cristaux de sel dans le flacon contenant la solution de lavage concentrée, placer le flacon dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à dissolution complète des cristaux avant de procéder à la dilution de la solution de lavage.

Diluer 30 ml de la solution de lavage concentrée 30x dans 870 ml d'eau distillée. Lorsqu'elle est conservée entre 2 et 8 °C, la solution de lavage diluée est stable jusqu'à la date de péremption de la trousse.

RECONSTITUTION DU CONTRÔLE POSITIF ET DILUTION POUR UTILISATION COMME ÉTALON

Tapoter doucement pour faire descendre toute la matière lyophilisée au fond du flacon et retirer le bouchon. Ajouter immédiatement 200 µl d'eau distillée directement à la matière lyophilisée. Remettre le bouchon. Laisser reposer le flacon sur de la glace pendant 5 minutes, puis l'agiter délicatement ou le faire tourbillonner de temps en temps jusqu'à dissolution complète. Le contrôle positif reconstitué peut être conservé jusqu'à 4 heures avant utilisation s'il est conservé entre 2 et 8 °C ou sur de la glace. Il peut être congelé à -70 °C et décongelé une seule fois.

Pour la dilution du contrôle positif reconstitué en étalons, voir l'illustration ci-dessous.



L'étalon peut être laissé à température ambiante jusqu'à 1 heure avant utilisation. L'étalon doit être fraîchement préparé et ne peut pas être conservé à -20°C après dilution en vue d'une utilisation ultérieure.

RECONSTITUTION DU CONTRÔLE D'ACTIVITÉ (CA)

Tapoter doucement pour faire descendre toute la matière lyophilisée au fond du flacon et retirer le bouchon. Ajouter immédiatement le volume d'eau distillé indiqué sur l'étiquette du CoA/étiquette du CA directement à la matière lyophilisée. Remettre le bouchon. Laisser reposer le flacon sur de la glace pendant 5 minutes, puis l'agiter ou le faire tourbillonner délicatement jusqu'à dissolution complète. Diluer le contrôle reconstitué de la même manière que l'échantillon de sérum du patient. Le contrôle d'activité reconstitué peut être conservé jusqu'à 4 heures avant de utilisation s'il est conservée entre 2 et 8 °C ou sur de la glace. Il peut être conservé à -70 °C et décongelé une seule fois.

SÉRUM

Décongeler partiellement les sérums congelés en les plaçant dans un bain d'eau à 37 °C et en remuant doucement. Une fois qu'ils sont partiellement décongelés, placer les tubes dans un bain de glace et les laisser sur la glace jusqu'à ce qu'ils soient totalement décongelés. Mélanger brièvement sur un agitateur vortex.

DILUTION DU SÉRUM ET DU CONTRÔLE D'ACTIVITÉ

Diluer le sérum 1/101 avec le diluant CP, étiquette bleue, (500 µl de diluant + 5 µl de sérum) et bien mélanger mais délicatement sur un agitateur vortex. Le sérum dilué et le contrôle d'activité peuvent être laissés à température ambiante pendant 60 minutes maximum avant l'analyse.

INCUBATION DES ÉCHANTILLONS

Pipeter en double 100 µl/puits d'étalon (100 %-0 %), de contrôle négatif (CN) et de contrôle d'activité (CA) et de sérum du patient (P) dilué conformément au tableau ci-dessous. Laisser incuber pendant 60 à 70 minutes à +37 °C avec le couvercle.

Voie classique

	1	2	3
A	100 %	12,5 %	P1
B	100 %	12,5 %	P1
C	75 %	0 %	P2
D	75 %	0 %	P2
E	50 %	CN	etc
F	50 %	CN	
G	25 %	CA	
H	25 %	CA	

APRÈS INCUBATION DU SÉRUM

Vider les puits et laver 3 fois avec 300 µl de solution de lavage, en remplissant et en vidant les puits à chaque fois. Après le dernier lavage, vider les puits en tapotant la barrette sur un papier absorbant.

AJOUT DU CONJUGUÉ

Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits. Laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante (+20-25 °C).

APRÈS INCUBATION DU CONJUGUÉ

Laver 3 fois comme précédemment.

AJOUT DE LA SOLUTION SUBSTRAT

Ajouter 100 µl de solution substrat dans chaque puits, laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante (+20-25 °C). Mesurer l'absorbance à 405 nm sur un lecteur de microplaque. (Il est possible d'utiliser de l'EDTA 5 mM comme solution d'arrêt, à 100 µl/puits. Mesurer l'absorbance des puits dans les 60 minutes.)

CALCUL DU RÉSULTAT

Une logistique d'ajustement de courbe à 4 paramètres (Marquardt) est recommandée. Soustraire l'absorbance de l'étalon 0 % de toutes les valeurs DO.

L'absorbance de l'étalon 100 % doit être > 1,0, l'absorbance du CN < 0.2 et l'activité du CA > 30 %.

Pour les cas où les valeurs d'échantillon obtenues sont supérieures à l'étalon 100 % le plus élevé, les échantillons peuvent être dilués à 1/201 et retestés.

Noter que la valeur d'activité obtenue dans ce cas doit être ajustée en fonction de la dilution appliquée à l'échantillon.

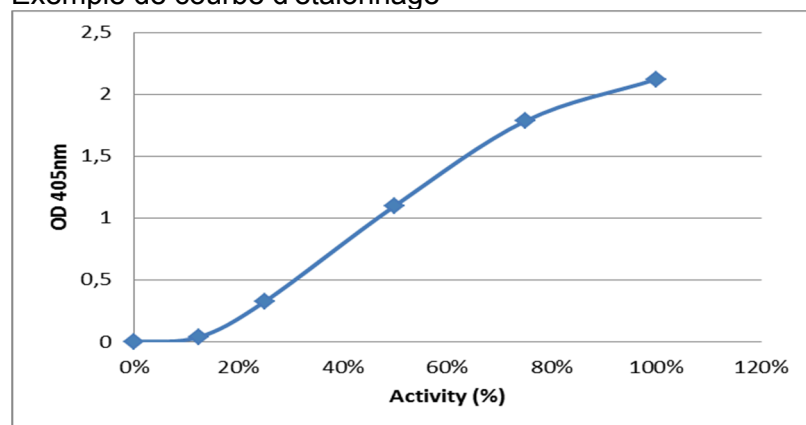
Si l'un des contrôles n'est pas dans sa plage respective, le test doit être considéré comme invalide et doit être répété.

Il est recommandé que chaque laboratoire définisse son propre niveau de référence et sa propre valeur seuil pour les déficits.

CONTRÔLE QUALITÉ

Le CoA inclus dans la trousse est spécifique au lot et doit être utilisé pour vérifier les résultats obtenus par notre laboratoire. Les résultats figurant sur le CoA sont indiqués à titre de recommandation uniquement. Il se peut que les résultats obtenus par votre laboratoire soient différents.

Exemple de courbe d'étalonnage



Remarque : L'illustration ci-dessus montre un exemple de courbe d'étalonnage semi-quantitative et ne doit pas être utilisée pour l'interprétation réelle de l'échantillon du patient.

LIMITES

Le taux complément d'un patient particulier ne peut pas servir à mesurer la gravité d'une maladie, car ce niveau peut varier d'un patient à l'autre. Ainsi, il est difficile d'obtenir une normalisation absolue des résultats.

Ce test ne doit pas être interprété à lui seul pour prendre des décisions relatives au traitement clinique, mais il doit être utilisé en combinaison avec les symptômes cliniques et les résultats d'autres tests disponibles. Aucun traitement ne doit être initié en se basant sur le résultat du test de complément. Toute initiation ou modification d'un traitement ne doit pas s'appuyer sur les seuls changements des taux du complément, mais plutôt sur un examen clinique minutieux.

RÉSULTATS ATTENDUS

Lorsque l'on observe des taux réduits de certains composants du complément ou de la fonction du complément, les cliniciens doivent envisager un déficit ou un processus immunologique en cours, entraînant une dégradation accrue des composants et une baisse des taux de complément. Pour l'analyse semi-quantitative, il a été déterminé que la distribution normale à $\pm 2ET$ était de 66 à 113 % du contrôle positif (voir tableau 5). Les résultats situés dans cette plage indiquent un fonctionnement normal de la voie classique. Il est recommandé que chaque laboratoire confirme ou établisse ses propres plages de référence pour la population concernée.

Une valeur inférieure à la plage de 66 à 113 % indique soit une activation accrue, entraînant la consommation de la capacité de la voie classique du complément, soit une faible activité génétiquement déterminée.

Les valeurs inférieures à 15 % suggèrent fortement un déficit complet, causé soit par une activation excessive, soit par un déficit héréditaire de la voie classique. Pour déterminer quel(s) facteur(s) du complément provoque(nt) la baisse d'activité, une analyse plus approfondie des protéines du complément s'impose.

Un résultat négatif, autrement dit la suspicion d'un déficit, doit toujours être vérifié par le test d'un nouvel échantillon, qui doit être manipulé avec soin pour s'assurer qu'aucune activation in vitro du complément n'a eu lieu.

L'augmentation des taux du complément est généralement une expression non spécifique d'une réponse de phase aiguë.

Le test de la voie classique du système de complément Wieslab® peut être utile pour la détection des déficits en complément liés aux voies classiques, comme indiqué dans le tableau ci-dessous : Une évaluation fonctionnelle plus complète et plus approfondie de l'ensemble des trois voies du complément peut être réalisée en utilisant le criblage du système de complément Wieslab®.

Voie classique	Voie MBL	Voie alterne	Déficit possible
Positive	Positive	Positive	Aucun
Négative	Positive	Positive	C1q, C1r, C1s
Positive	Positive	Négative	Properdine, Facteur B, D
Positive	Négative	Positive	MBL, MASP2
Négative	Négative	Négative	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Négative	Négative	Positive	C4, C2 ou combinaison

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

120 sérums de dons de sang ont été testés et la plage de référence normale a été calculée. Voir Figure 2 et Tableau 3. Aucun don de sang n'était inférieur à 40 %.

Plage de mesure de l'étalon : 12,5 % - 100 %

Limite de détection (LOD) = 8 %

FIGURE 2. CP semi-quantitative

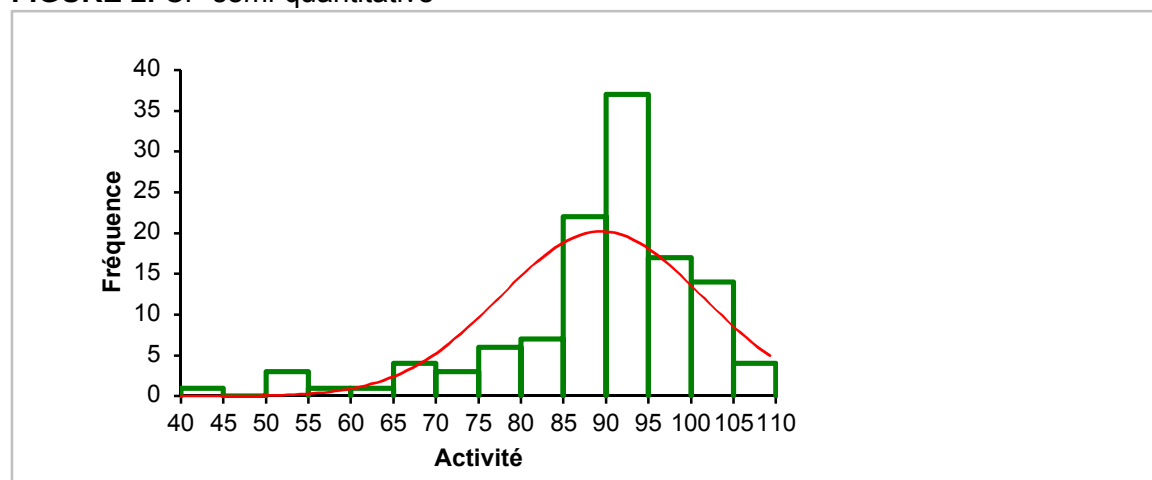


TABLEAU 5.

	n	Moyenne (%)	± 2 ET (%)	Médiane (%)
Application semi-quantitative	120	89	66-113*	92

Il s'agit d'un calcul statistique qui ne garantit pas un véritable seuil. Il est recommandé que chaque laboratoire définisse son propre niveau de référence et sa propre valeur seuil de déficit.

*) Y compris les échantillons dilués à 1/201 pour terminer sur la courbe

TABLEAU 6.

Des sérums présentant des déficits en complément connus et des sérums appauvris en facteur du complément spécifique ont été testés dans l'essai. Tous les sérums déficitaires/appauvris étaient faibles dans l'essai et ont donné des valeurs inférieures à 15 %.

Déficit	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Nombre de patients	5	1	1	1	2	2
Nombre de sérums déficitaires détectés	5	1	1	1	2	2

Appauvrissement	C1q	C3	C4	C5	C7
Nombre de sérums appauvris	2	1	1	1	1
Nombre d'appauvrissements détectés	2	1	1	1	1

TABLEAU 7. La précision inter-essais pour l'application semi-quantitative a été déterminée en testant sept échantillons dans huit répliques et à trois occasions différentes.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value							
%	71	73	69	72	25	35	31
SD	9	9	6	11	1	2	2
CV%	13%	13%	9%	15%	4%	5%	5%

TABLEAU 8. La précision intra-essai pour l'application semi-quantitative a été déterminée en testant sept échantillons différents dans huit répliques et à une seule occasion.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value							
%	79	76	72	83	24	34	30
SD	10	11	6	9	0	1	1
CV%	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

TABLEAU 9. La variation d'un lot à un autre pour l'application semi-quantitative a été déterminée en testant sept échantillons en double sur trois lots différents par trois personnes différentes.

Sample	1	2	3	4	5	6	7
Mean value (%)	8	73	85	24	37	74	78
SD	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
%CV	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

TABLEAU 10.

La récupération de dilution a été déterminée en testant cinq dilutions en série pour trois échantillons différents.

Échantillon	Dilution	Activité moyenne mesurée (%)	Activité théorique (%)	% récupération corrigé pour la dilution
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
Échantillon	Dilution	Activité moyenne mesurée (%)	Activité théorique (%)	% récupération corrigé pour la dilution
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
Échantillon	Dilution	Activité moyenne mesurée (%)	Activité théorique (%)	% récupération corrigé pour la dilution
3	1/100	84	84	100
	1/200	37	42	88
	1/400	21	21	100
	1/800	11	11	100
	1/1600	7	6	117












RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

Problème	Causes possibles	Solution
Valeurs des contrôles hors limites	Température, temps ou pipetage incorrects, les réactifs ne sont pas mélangés	Vérifier que le temps et la température étaient corrects. Répéter le test.
	Contamination croisée des contrôles	Pipeter avec soin.
	Le trajet optique n'est pas propre.	Vérifier la présence de saleté ou de bulles d'air dans les puits. Essuyer le dessous de la plaque et procéder à une nouvelle mesure.
	Les contrôles (contrôles positif et/ou d'activité) ne sont pas correctement reconstitués. Mauvaise dilution de l'étalon.	Vérifier les contrôles, en dissoudre un nouveau. Vérifier la préparation et faire une nouvelle dilution.
Tous les résultats de test sont négatifs	Un ou plusieurs réactifs n'ont pas été ajoutés, ou ont été ajoutés dans un ordre incorrect.	Vérifier à nouveau la procédure. Vérifier la présence de réactifs non utilisés. Répéter le test.
	La plaque revêtue d'antigène est inactive.	Vérifier la présence d'humidité dans les puits non utilisés. Essuyer le dessous de la plaque et procéder à une nouvelle mesure.
	Sérum inactif.	Diluer de nouveaux échantillons.
Tous les résultats de test sont jaunes.	Tampons ou réactifs contaminés.	Vérifier toutes les solutions pour la turbidité.
	Solution de lavage contaminée.	Utiliser un contenant propre. Vérifier la qualité de l'eau utilisée pour la préparation de la solution.
	Mauvaise dilution du sérum.	Répéter le test.
Précision médiocre.	CV de distribution de la pipette > 5 % ou échantillons non mélangés.	Vérifier l'étalonnage de la pipette. Utiliser une technique reproductible. Éviter les bulles d'air dans la pointe de la pipette.
	Le sérum ou les réactifs ne sont pas suffisamment mélangés ou non équilibrés à température ambiante.	Mélanger tous les réactifs délicatement mais complètement et équilibrer à température ambiante.
	L'ajout de réactif prend trop de temps, manque d'uniformité dans les intervalles de temps.	Employer une technique uniforme cohérente et utiliser un dispositif multi-pointes ou un distributeur automatique pour réduire le temps.
	Le trajet optique n'est pas propre.	Vérifier la présence de bulles d'air dans les puits. Essuyer le dessous de la plaque et procéder à une nouvelle mesure.
	Lavage non homogène, bulles d'air piégées, solution de lavage résiduelle dans les puits.	Vérifier que tous les puits sont remplis et aspirés de manière uniforme. Distribuer le liquide au-dessus de niveau du réactif dans les puits. Après le dernier lavage, vider les puits en tapotant la barrette sur un papier absorbant.

REFERENCES:

- Walport M. Complement (First of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1058-66.
- Walport M. Complement (Second of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1140-44.
- Roos A et al. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol* 2003; 39:655-68.
- Fredriksson GN et al. New procedure for detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. *J Immunol Meth* 1993; 166:263-70.
- Seelen MA et al. Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Meth* 2005; 296:187-98.
- Salvador-Morales C, Sim RB. *Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials*. 2013, 1st Ed, World Scientific Publishing (ISBN: 978-4390-25-5).
- Tudoran R & Kirschfink M. *Modern Complement analysis: indications, methods and outlook*. *LaboratoriumsMedizin* 2012; 36(3):--.
- Botto M et al. Complement in human disease: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol* 2009; 46:2774-83.
- Mollnes TE et al. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 2007; 44:3838-49.
- Nilsson B, Nilsson Ekdahl K. *Complement Diagnostics: Concepts, Indications, and Practical Guidelines*. *Clin Develop Immunol*; 2012, Art ID 962702.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Symbolforklaring. Forklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Numero de lote. Chargen-Nummer. Numerodi lotto. Partinummer. Lot nummer.Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Numero de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Numero catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Udløbsdato. Utløpsdato. Anvand före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature.Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefahrdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Las instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atension. Achtung. Attenzione. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
 96	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrekkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehaller tillreckligt för 96 tester.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnostico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniske produkter.

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno. Antigen. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Conjugato. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konz. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL -	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Negativ control. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
CONTROL + LYO	Lyophilized positive control. Contrôle positif lyophilisé. Control positivo liofilizado. Lyophilisierte Positivkontrolle. Controllo positivo liofilizzato. Frysetørret positiv kontrol. Lyofilisert positiv kontroll. Frystorkad positiv kontroll.
CONTROL AC LYO	Lyophilized activity control. Contrôle d'activité lyophilisé. Control de actividad liofilizado. Lyophilisierte Aktivitätskontrolle. Controllo dell'attività liofilizzata. Frysetørret aktivitetskontrol. Lyofilisert aktivitetskontroll. Lyofiliserad aktivitetskontroll.
CH REP	Swiss Representative. Représentant Suisse. Representante suizo. Schweizer Vertreter. Rappresentante svizzero. Schweizisk repræsentant. Sveitsisk representant. Schweizisk representant

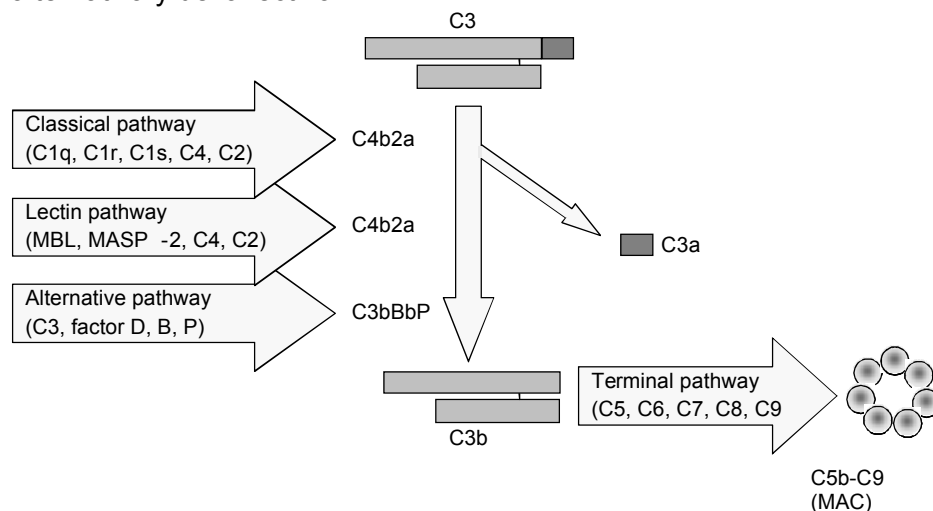
USO INDICADO

El sistema del complemento de Wieslab® de la vía clásica es un inmunoensayo enzimático para la determinación cualitativa y/o semi-cuantitativa de la vía clásica funcional del complemento en suero humano. El análisis debe ser llevado a cabo por profesionales de laboratorio con la formación adecuada.

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El sistema del complemento desempeña un papel fundamental en las enfermedades infecciosas, autoinmunes y crónicas. Hay tres vías de activación del complemento (fig. 1), denominadas clásica, alternativa y de la lectina.



La actividad deficiente del complemento pone a los humanos en riesgo de sufrir infecciones fulminantes repetitivas o graves y puede contribuir al desarrollo de enfermedades autoinmunes. La activación inapropiada del complemento contribuye a generar inflamación crónica y daños en los tejidos.

La activación in vitro de la secuencia del complemento produce el consumo de los componentes del complemento, lo que, a su vez, genera el descenso de su concentración. Por lo tanto, la determinación de las proteínas del complemento o de la actividad del complemento permite indicar si el sistema del complemento se ha activado por medio de un mecanismo inmunológico y/o patógeno. Las mediciones tanto funcionales como inmunoquímicas del complemento contribuyen a evaluar a los pacientes cuando se sospecha la presencia de una enfermedad activadora del complemento o la posibilidad de una deficiencia heredada. El nivel de la actividad del complemento evaluada mediante ensayos funcionales, como el del kit del complemento de Wieslab®, tiene en cuenta la velocidad de síntesis, la degradación y el consumo de los componentes, y proporciona una medida de la integridad de las vías, a diferencia de los métodos inmunoquímicos, que miden específicamente la concentración de los distintos componentes del complemento.

PRINCIPIO DEL ENSAYO DE LA VÍA CLÁSICA DEL COMPLEMENTO DE WIESLAB®

El ensayo de la vía clásica del complemento de Wieslab® combina los principios del ensayo hemolítico para la activación del complemento con el uso de anticuerpos específicos marcados para el neoantígeno que se produce como resultado de la activación del complemento. La cantidad de neoantígeno generada es proporcional a la actividad funcional de las vías del complemento.

En el kit de componentes del complemento, los pocillos de las tiras de microtitulación están recubiertos con activadores específicos de la vía clásica. Esto, junto con la composición del tampón de dilución y el nivel de dilución del suero de paciente permiten garantizar que solo se activará la vía clásica.

Durante la incubación del suero de paciente en los pocillos, el complemento se activa por la acción del recubrimiento específico. A continuación se lavan los pocillos y se detecta la cantidad de complejo de C5b-9 formado en la superficie de la placa mediante un anticuerpo específico marcado con fosfatasa alcalina en el neoantígeno C5b-9 generado durante la formación del complejo de ataque a membrana (MAC por sus siglas en inglés).

Tras un paso de lavado posterior, se obtiene la detección de anticuerpos específicos mediante incubación en una solución de sustrato de fosfatasa alcalina. La cantidad de activación del complemento se corresponde con la intensidad del color y se mide en términos de absorbancia (densidad óptica u OD por sus siglas en inglés).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Los componentes del suero humano utilizado en la preparación de los controles de este kit han sido analizados y encontrado negativos respecto a la presencia de anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH 1 y 2), de la hepatitis C (VHC) y del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, conforme a los métodos aprobados por la FDA estadounidense. No obstante y dado que ningún método puede garantizar totalmente la ausencia del virus del VIH, del VHC, de la hepatitis B o de cualquier otro agente infeccioso, todas las muestras y reactivos de origen humano deben ser considerados y manipulados como agentes potencialmente capaces de transmitir enfermedades infecciosas.

Los centros de control de enfermedades y los institutos de salud y prevención nacionales recomiendan manipular los agentes infecciosos aplicando un nivel de bioseguridad tipo 2.

Todas las soluciones contienen ProClin 300 como conservante. Jamás pipetee con la boca ni permita que los reactivos o las muestras de paciente entren en contacto con la piel. Los reactivos que contienen ProClin pueden causar irritaciones. Evite el contacto con la piel y los ojos. En caso de contacto, lave la zona afectada con agua abundante.

Svar Life Science cuenta con fichas de datos de seguridad de todos los componentes peligrosos contenidos en este kit, disponibles a demanda.

Solución de lavado conc. 30x.



Atención

Contiene: Masa de reacción de 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
 H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
 P261: Evite respirar el aerosol.
 P273: Evitar su liberación al medio ambiente.
 P280: Llevar guantes de protección.
 P333+313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

Diluyente para vía clásica, conjugado, control negativo, solución de sustrato

EUH208 Contiene: Masa de reacción de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1) Puede provocar una reacción alérgica.
 EUH210 Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad.

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Para obtener las muestras de sangre utilice una técnica de punción venosa aséptica; para las muestras de suero siga los procedimientos estándar establecidos. Se recomienda utilizar un mínimo de 5 ml de sangre entera. Deje coagular la sangre en tubos de suero durante 60-65 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). Centrifugue las muestras de sangre y transfiera el suero sin células a un tubo limpio. Manipule los sueros correctamente para evitar la activación in vitro del complemento. Congele los sueros a -70 °C o temperatura inferior en tubos sellados herméticamente si se van a guardar durante un tiempo prolongado o a transportar en hielo seco. Las muestras solo pueden congelarse y descongelarse una vez.

No utilice sueros que aparezcan ictericos, lipémicos ni hemolizados. No utilice sueros inactivados por calor. No utilice plasma. El CLSI proporciona recomendaciones para el almacenamiento de muestras

de sangre (Procedimientos estándar aprobados para la manipulación y el proceso de muestras de sangre, H18A, 1990).

COMPONENTES DEL KIT Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

- Un bastidor con tiras separadas de pocillos (12 x 8) sin color recubiertos con IgM humana, sellados en un paquete de aluminio con una bolsa de desecante.
- 2 x 35 ml de diluyente de CP (Dil CP), marcado con color azul.
- 13 ml de conjugado conteniendo anticuerpos frente a C5b-9 (color azul) marcados con fosfatasa alcalina.
- 13 ml de solución de sustrato lista para utilizar.
- 30 ml de solución de lavado con concentración 30 veces superior a la normal (30x).
- 0.2 ml de control negativo (NC) conteniendo suero humano (para ser diluido y utilizado como muestra de suero de paciente).
- Control positivo (PC) liofilizado conteniendo suero humano secado y congelado, para ser reconstituido en 0.2 ml de agua destilada, consulte la sección "Reconstitución del control positivo", más adelante.

Control de actividad (AC) liofilizado para utilizar en aplicación semi-cuantitativa, conteniendo suero humano secado y congelado (con origen distinto al utilizado para PC), consulte la sección "Reconstitución del control de actividad", en el procedimiento para aplicación semi-cuantitativa.

Los controles positivo y de actividad deben almacenarse a una temperatura de -20 °C inmediatamente después de su recepción.

Tenga en cuenta lo siguiente: El volumen de reconstitución del control de actividad (AC) aparece indicado en el Certificado de análisis (CoA) (XXX µl) y en la etiqueta del control.

Todos los reactivos del kit están listos para utilizar salvo la solución de lavado y los controles. Con excepción del control positivo y del control de actividad, todos los reactivos deben almacenarse a una temperatura de 2-8 °C. Una vez reconstituidos, tanto el control positivo como el control de actividad deben almacenarse a -70 °C y descongelarse una vez.

MATERIALES O EQUIPOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Lector de microplacas con filtro 405 nm.
- Pipetas de precisión con puntas desechables.
- Lavador para tiras, tejido absorbente, tubos y un temporizador.

PROCEDIMIENTO – APLICACIÓN CUALITATIVA

Desprenda solo el número de pocillos necesarios para el análisis y cierre de nuevo el paquete de aluminio cuidadosa y herméticamente. Deje que las soluciones alcancen la temperatura ambiente (20-25 °C) antes de realizar el ensayo. No mezcle reactivos de lotes distintos.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE LAVADO

Si observa cristales de sal en el frasco con solución de lavado concentrada, coloque el frasco en un baño de agua a 37 °C hasta que los cristales se hayan disueltos, antes de la dilución de la solución de lavado.

Diluya 30 ml de solución de lavado con concentración 30x en 870 ml de agua destilada. Cuando se almacena a una temperatura de 2-8 °C, la solución de lavado diluida permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.

RECONSTITUCIÓN DEL CONTROL POSITIVO

Golpee ligeramente todo el material liofilizado para que descienda al fondo del frasco y retire el tapón. Añada de inmediato 200 µl de agua destilada directamente al material liofilizado. Vuelva a colocar el tapón. Deje reposar el frasco en hielo durante 5 minutos y agítelo con suavidad, u ocasionalmente en vórtex, hasta su total disolución. Diluya el control reconstituido con el mismo procedimiento que ha utilizado para la muestra de suero de paciente. El control positivo reconstituido se puede almacenar hasta 4 horas antes de utilizarlo siempre que se mantenga a una temperatura de 2-8 °C o en hielo. Debe almacenarse a -70 °C y puede descongelarse una vez.

SUERO

Descongele parcialmente el suero congelado; para ello, introdúzcalo unos instantes en un baño con agua a 37 °C mientras lo agita con suavidad. Inmediatamente después, coloque los tubos parcialmente descongelados en un baño con hielo y deje que se descongelen por completo. Agite con suavidad o en un mezclador vórtex.

DILUCIÓN DEL SUERO

Diluya el suero 1/101 con diluyente CP, etiqueta azul, (500 µl de diluyente + 5 µl de suero) y mezcle a fondo pero suavemente en vórtex. El suero diluido puede permanecer a temperatura ambiente durante un máximo de 60 minutos antes del análisis.

INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS

Pipetee en duplicado 100 µl/pocillo de diluyente (Dil) para utilizar como blanco, control positivo (PC), control negativo (NC) y suero diluido de paciente (P) como se indica en el diagrama siguiente. Tape e incube durante 60-70 minutos a +37 °C.

Vía clásica

	1	2	3
A	Dil CP	P2	
B	Dil CP	P2	
C	PC	etc	
D	PC		
E	NC		
F	NC		
G	P1		
H	P1		

TRAS LA INCUBACIÓN DEL SUERO

Vacíe los pocillos y lave 3 veces con 300 µl de solución de lavado; rellene y vacíe los pocillos cada vez. Después del último lavado, vacíe los pocillos golpeando las tiras con suavidad sobre un tejido absorbente.

ADICIÓN DEL CONJUGADO

Añada 100 µl de conjugado a cada pocillo. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (+20-25 °C).

TRAS LA INCUBACIÓN DEL CONJUGADO

Lave 3 veces como se indica anteriormente.

ADICIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SUSTRATO

Añada 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo; incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (+20-25 °C). Lea la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas. (como solución de parada puede utilizar 5 mM EDTA, 100 µl/pocillo. Lea la absorbancia de los pocillos al cabo de 60 minutos).

CÁLCULO DEL RESULTADO

Reste la absorbancia del blanco (Dil) de las absorbancias del control negativo (NC), del control positivo (PC) y de las muestras. Después de restarle el blanco, la absorbancia del control positivo debe ser $> 1,0$ y la del control negativo $< 0,2$.

Calcule los valores OD405 nm medios para la muestra, el PC y el NC, y calcule el porcentaje de la actividad del complemento como se indica a continuación: $(\text{Muestra-NC})/(\text{PC-NC}) \times 100$. Los controles negativo y positivo están indicados para detectar fallos importantes del reactivo. El control positivo no garantiza la precisión del valor de corte del ensayo. Cada laboratorio debe establecer niveles de referencia y valores de corte propios para subsanar las deficiencias.

Si alguno de los controles queda fuera de los rangos respectivos, el análisis será considerado no válido y deberá repetirse.

CONTROL DE CALIDAD

El CoA incluido en este kit es específico de un lote y debe utilizarse para verificar los resultados obtenidos en cada laboratorio. Los resultados indicados en el CoA se incluyen solo a modo de guía, y pueden ser diferentes a los obtenidos por su laboratorio.

LIMITACIONES

El nivel del complemento de un paciente concreto no puede utilizarse para medir la gravedad de una enfermedad, ya que es un valor que puede variar de un paciente a otro. Por lo tanto, es difícil obtener valores estándares absolutos de los resultados.

Las decisiones para la aplicación de terapias clínicas no pueden tomarse únicamente a partir de los resultados de la prueba, y deberán utilizarse junto con los síntomas clínicos y los resultados de otros ensayos disponibles. No debe iniciarse ninguna terapia basada en el resultado del análisis del complemento. El inicio o los cambios de un tratamiento no deben estar basados únicamente en los cambios de los niveles del complemento, sino en una rigurosa observación clínica.

RESULTADOS ESPERADOS

Cuando se detecta una reducción en los niveles de los componentes o en la función del complemento, los médicos deben considerar la existencia de una deficiencia o un proceso inmunológico, causante del incremento de la descomposición de componentes y del descenso de los niveles del complemento.

La distribución normal en $\pm 2\text{SD}$ para el ensayo cualitativo se ha determinado como la comprendida entre el 69 y el 129% del control positivo; consulte la Tabla 1. Los resultados que quedan dentro de este rango indican una funcionalidad normal de la vía clásica. Se recomienda que cada laboratorio confirme o establezca un rango de referencia propio para la población a la que atiende.

Un valor por debajo del rango del 69-129% indica, bien un aumento en la activación, causante del consumo de la capacidad de la vía clásica del complemento, o bien una actividad baja determinada genéticamente.

Los valores inferiores al 5% revelan claramente una deficiencia completa causada por una activación excesiva o una deficiencia heredada en la vía clásica. Para establecer los factores del complemento causantes del descenso es necesario realizar más análisis de actividad de las proteínas del complemento.

Se recomienda comprobar siempre los resultados negativos, es decir, una sospecha de deficiencia; para ello, debe analizarse cuidadosamente una muestra nueva para tener la certeza de que no se ha producido la activación in vitro del complemento.

Por lo general, el aumento de los niveles del complemento no es la expresión específica de una respuesta de fase aguda.

La vía clásica del sistema del complemento de Wieslab® puede ser útil para detectar deficiencias del complemento relacionadas con las vías clásicas, tal y como se indica en la tabla siguiente: Para obtener una evaluación funcional más completa y detallada de las tres vías del complemento, utilice Cribado del sistema del complemento de Wieslab®.

Vía clásica	Vía MBL	Vía alternativa	Posible deficiencia
Positivo	Positivo	Positivo	Ninguno
Negativo	Positivo	Positivo	C1q, C1r, C1s
Positivo	Positivo	Negativo	Properdina, Factor B, D
Positivo	Negativo	Positivo	MBL, MASP2
Negativo	Negativo	Negativo	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativo	Negativo	Positivo	C4, C2 o combinación

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se analizaron 120 sueros de donantes de sangre y se calculó el rango de referencia normal. Los valores se expresan como porcentaje del control positivo. Consulte la Figura 1 y la Tabla 1. Ningún donante de sangre estuvo por debajo del 40%.

FIGURA 1.

CP - Aplicación cualitativa

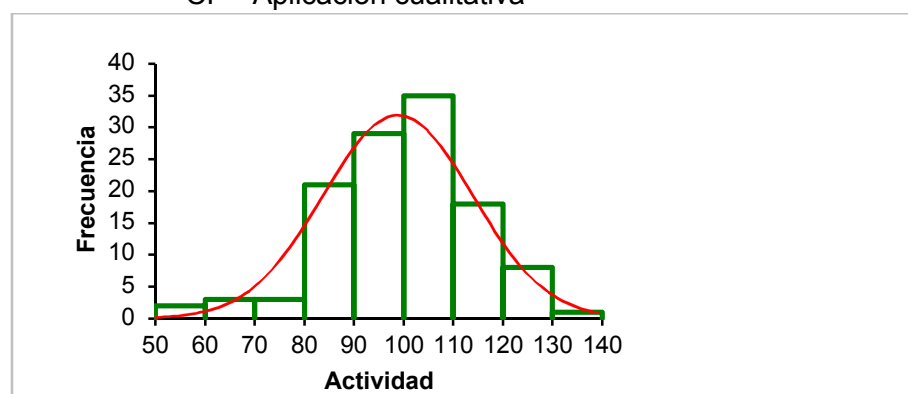


TABLA 1.

	n	Media (%)	± 2 DS (%)	Media (%)
Vía clásica	120	99	69-129*	100

*) Es un cálculo estadístico y no garantiza un valor de corte real.

Cada laboratorio debe establecer niveles de referencia y valores de corte propios para subsanar las posibles deficiencias.

TABLA 2.

En el ensayo se analizaron sueros con deficiencias del complemento conocidas y se obtuvieron los resultados siguientes. En el ensayo se detectaron todos los sueros deficientes que ofrecieron valores inferiores al 5%**).

Deficiencia	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Número de pacientes	5	1	1	1	2	2
Número de sueros deficientes detectados	5	1	1	1	2	2

***) Consulte "M.A. Seelen et. al, Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. J Immunol Meth 2005, 296, 187-198", para obtener más información sobre muestras de pacientes con deficiencias analizadas con la aplicación cualitativa

Reducción	C1q	C3	C4	C5	C7
Número de sueros reducidos	2	1	1	1	1
Número de reducciones detectadas	2	1	1	1	1

TABLA 3. Precisión inter ensayo para la aplicación cualitativa: se determinó analizando tres muestras en duplicado. Los resultados se obtuvieron para seis series diferentes.

	CP P1	CP P2	CP P3
Mean value			
%	98	92	21
SD	4.3	3.9	1.7
CV%	4	4	8

TABLA 4. Precisión intra ensayo para la aplicación cualitativa: se determinó analizando una muestra en 40 pocillos.

Ensayo	Valor medio %	DS	CV %
CP	85	2,9	3

PROCEDIMIENTO – APLICACIÓN SEMI-CUANTITATIVA

La aplicación semi-cuantitativa se distingue de la cualitativa en que se crea una curva de calibración diluyendo el PC del kit, obteniéndose una curva de calibración con una actividad del 100, 75, 50, 25 y 12,5%. Desprenda solo el número de pocillos necesarios para el análisis y cierre de nuevo el paquete de aluminio cuidadosa y herméticamente. Deje que las soluciones alcancen la temperatura ambiente (20-25 °C) antes de realizar el ensayo. No mezcle reactivos de lotes distintos.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE LAVADO

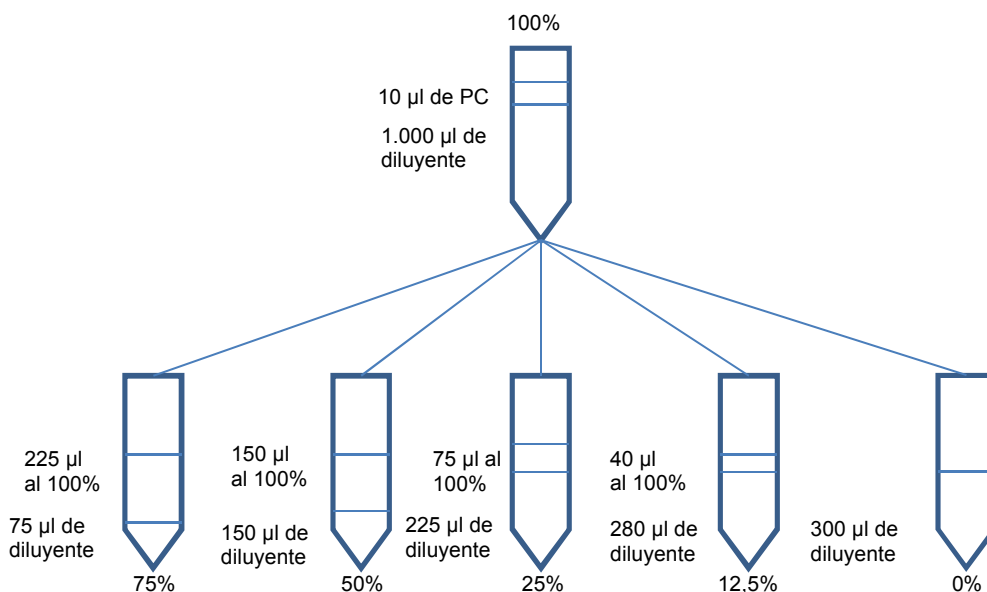
Si observa cristales de sal en el frasco con solución de lavado concentrada, coloque el frasco en un baño de agua a 37 °C hasta que los cristales se hayan disueltos, antes de la dilución de la solución de lavado.

Diluya 30 ml de solución de lavado con concentración 30x en 870 ml de agua destilada. Cuando se almacena a una temperatura de 2-8 °C, la solución de lavado diluida permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.

RECONSTITUCIÓN Y DILUCIÓN DEL CONTROL POSITIVO PARA UTILIZARLO COMO CALIBRADOR

Golpee ligeramente todo el material liofilizado para que descienda al fondo del frasco y retire el tapón. Añada de inmediato 200 µl de agua destilada directamente al material liofilizado. Vuelva a colocar el tapón. Deje reposar el frasco en hielo durante 5 minutos y agítelo con suavidad, u ocasionalmente en vórtex, hasta su total disolución. El control positivo reconstituido se puede almacenar hasta 4 horas antes de utilizarlo siempre que se mantenga a una temperatura de 2-8 °C o en hielo. También puede congelarse a -70 °C y descongelarse una vez.

Para diluir el control positivo reconstituido, consulte la figura siguiente.



El calibrador puede dejarse a temperatura ambiente hasta 1 hora antes de usarlo. El calibrador debe prepararse en cada ocasión; una vez diluido no es posible almacenarlo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para utilizarlo más adelante.

RECONSTITUCIÓN DEL CONTROL DE ACTIVIDAD (AC)

Golpee ligeramente todo el material liofilizado para que descienda al fondo del frasco y retire el tapón. Añada de inmediato el volumen de agua destilada indicado en la etiqueta Certificado de análisis/AC directamente al material liofilizado. Vuelva a colocar el tapón. Deje reposar el frasco en hielo durante 5 minutos y agítelo con suavidad o en vórtex hasta su total disolución. Diluya el control reconstituido con el mismo procedimiento que ha utilizado para la muestra de suero de paciente. El control de actividad positivo reconstituido se puede almacenar hasta 4 horas antes de utilizarlo siempre que se mantenga a una temperatura de $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ o en hielo. También puede almacenarse a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongelarse una vez.

SUERO

Descongele parcialmente el suero congelado; para ello, introdúzcalo unos instantes en un baño con agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mientras lo agita con suavidad. Inmediatamente después, coloque los tubos parcialmente descongelados en un baño con hielo y deje que se descongelen por completo. Mezcle brevemente o en un mezclador vórtex.

DILUCIÓN DEL SUERO Y DEL CONTROL DE ACTIVIDAD

Diluya el suero 1/101 con diluyente CP, etiqueta azul, (500 µl de diluyente + 5 µl de suero) y mezcle a fondo pero suavemente en vórtex. El suero diluido y el control de actividad pueden permanecer a temperatura ambiente durante un máximo de 60 minutos antes del análisis.

INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS

Pipetee en duplicado 100 µl/pocillo de calibrador (100%-0%), control negativo (NC), control de actividad (AC) y suero diluido de paciente (P) como se indica en el diagrama siguiente. Tape e incube durante 60-70 minutos a $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vía clásica

	1	2	3
A	100%	12,5%	P1
B	100%	12,5%	P1
C	75%	0%	P2
D	75%	0%	P2
E	50%	NC	etc
F	50%	NC	
G	25%	AC	
H	25%	AC	

TRAS LA INCUBACIÓN DEL SUERO

Vacíe los pocillos y lave 3 veces con 300 µl de solución de lavado; rellene y vacíe los pocillos cada vez. Después del último lavado, vacíe los pocillos golpeando las tiras con suavidad sobre un tejido absorbente.

ADICIÓN DEL CONJUGADO

Añada 100 µl de conjugado a cada pocillo. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (+20-25 °C).

TRAS LA INCUBACIÓN DEL CONJUGADO

Lave 3 veces como se indica anteriormente.

ADICIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SUSTRATO

Añada 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo; incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (+20-25 °C). Lea la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas. (como solución de parada puede utilizar 5 mM EDTA, 100 µl/pocillo. Lea la absorbancia de los pocillos al cabo de 60 minutos).

CÁLCULO DEL RESULTADO

Se recomienda el uso de una curva de ajuste con 4 parámetros logísticos (Marquardt). Reste la absorbancia del calibrador 0% de todos los valores de OD.

La absorbancia del calibrador 100% debería ser > 1,0, la absorbancia del NC < 0,2 y la actividad del AC > 30%.

Cuando los valores de las muestras obtenidos sean mayores que los del calibrador más alto, 100%, las muestras se pueden diluir en una proporción 1/201 y analizarse de nuevo.

No obstante, el valor de actividad obtenido en este caso deberá ajustarse conforme a la dilución de muestras que se haya aplicado.

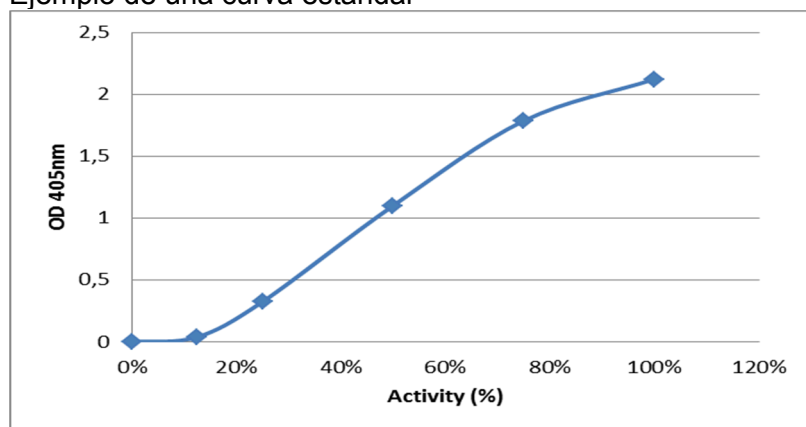
Si alguno de los controles queda fuera de los rangos respectivos, la prueba será considerada no válida y deberá repetirse.

Cada laboratorio debe establecer niveles de referencia y valores de corte propios para subsanar las deficiencias.

CONTROL DE CALIDAD

El CoA incluido en el kit es específico de un lote y debe utilizarse para verificar los resultados obtenidos en cada laboratorio. Los resultados indicados en el CoA se incluyen solo a modo de guía y pueden ser diferentes a los obtenidos por su laboratorio.

Ejemplo de una curva estándar



Tenga en cuenta lo siguiente: La figura anterior muestra un ejemplo de una curva estándar semi-cuantitativa y no debe utilizarse como la interpretación real de una muestra de paciente.

LIMITACIONES

El nivel del complemento de un paciente no puede utilizarse para medir la gravedad de una enfermedad, ya que es un valor que puede variar de un paciente a otro. Por lo tanto, es difícil obtener valores estándares absolutos de los resultados.

Las decisiones para la aplicación de terapias clínicas no pueden tomarse únicamente a partir de los resultados de la prueba, y deberán utilizarse junto con los síntomas clínicos y los resultados de otros ensayos disponibles. No debe iniciarse ninguna terapia basada en el resultado del análisis del complemento. El inicio o los cambios de un tratamiento no deben estar basados únicamente en los cambios de los niveles del complemento, sino en una rigurosa observación clínica.

RESULTADOS ESPERADOS

Cuando se detecta una reducción en los niveles de los componentes o en la función del complemento, los médicos deben considerar la existencia de una deficiencia o un proceso inmunológico, causante del incremento de la descomposición de componentes y del descenso de los niveles del complemento. La distribución normal en ± 2 DS para el ensayo semi-cualitativo se ha determinado como la comprendida entre el 66 y el 113% del control positivo; consulte la Tabla 5. Los resultados que quedan dentro de este rango indican una funcionalidad normal de la vía clásica. Se recomienda que cada laboratorio confirme o establezca un rango de referencia propio para la población a la que atiende. Un valor por debajo del rango del 66-113% indica, bien un aumento en la activación, causante del consumo de la capacidad de la vía clásica del complemento, o bien una actividad baja determinada genéticamente.

Los valores inferiores al 15% revelan claramente un deficiencia completa causada por una activación excesiva o una deficiencia heredada en la vía clásica. Para establecer los factores del complemento causantes del descenso es necesario realizar más análisis de actividad de las proteínas del complemento.

Se recomienda comprobar siempre los resultados negativos, es decir, una sospecha de deficiencia; para ello, debe analizarse cuidadosamente una muestra nueva para tener la certeza de que no se ha producido la activación in vitro del complemento.

Por lo general, el aumento de los niveles del complemento no es la expresión específica de una respuesta de fase aguda.

La vía clásica del sistema del complemento de Wieslab® puede ser útil para detectar deficiencias del complemento relacionadas con las vías clásicas, tal y como se indica en la tabla siguiente. Para obtener una evaluación funcional más completa y detallada de las tres vías del complemento, utilice Cribado del sistema del complemento de Wieslab®.

Vía clásica	Vía MBL	Vía alternativa	Posible deficiencia
Positivo	Positivo	Positivo	Ninguno
Negativo	Positivo	Positivo	C1q, C1r, C1s
Positivo	Positivo	Negativo	Properdina, Factor B, D
Positivo	Negativo	Positivo	MBL, MASP2
Negativo	Negativo	Negativo	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativo	Negativo	Positivo	C4, C2 o combinación

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se analizaron 120 sueros de donantes de sangre y se calculó el rango de referencia normal. Consulte la Figura 2 y la Tabla 3. Ningún donante de sangre estuvo por debajo del 40%.

Rango de medición del calibrador: 12,5% - 100%

Límite de detección (LOD) = 8%

Figura 2. CP - aplicación semi-cuantitativa

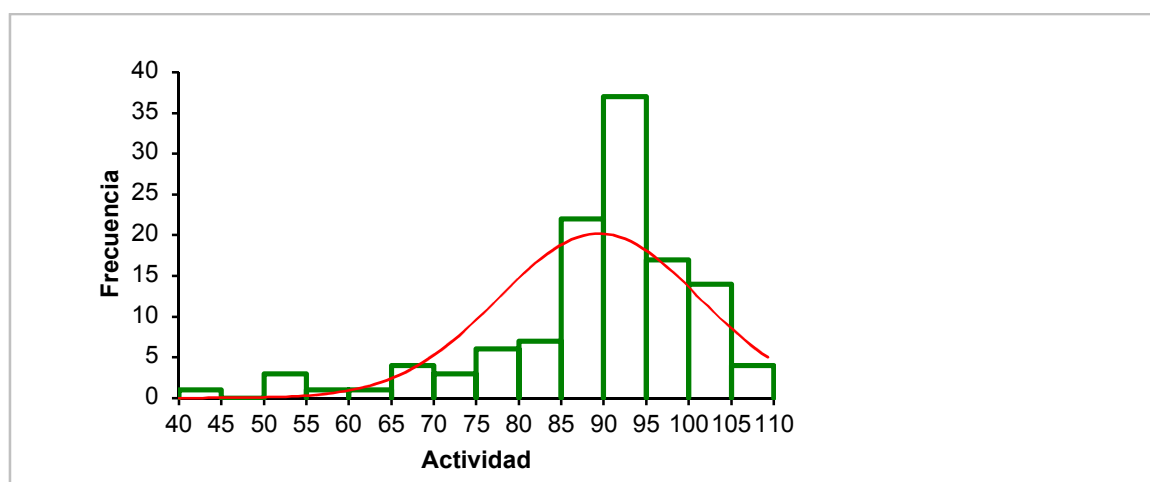


TABLA 5.

	n	Media (%)	± 2 DS (%)	Media (%)
Aplicación semi-cuantitativa	120	89	66-113*	92

Es un cálculo estadístico y no garantiza un valor de corte real. Cada laboratorio debe establecer niveles de referencia y valores de corte propios para subsanar las deficiencias.

*) Incluye las muestras diluidas en una proporción 1/201 hasta el final de la curva

TABLA 6.

En el ensayo se analizaron sueros con deficiencias del complemento conocidas y sueros reducidos con un factor del complemento específico. En el ensayo se detectaron todos los sueros deficientes/reducidos que ofrecieron valores inferiores al 15%.

Deficiencia	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Número de pacientes	5	1	1	1	2	2
Número de sueros deficientes detectados	5	1	1	1	2	2

Reducción	C1q	C3	C4	C5	C7
Número de sueros reducidos	2	1	1	1	1
Número de reducciones detectadas	2	1	1	1	1

TABLA 7. Precisión inter ensayo para la aplicación semi-cuantitativa: se determinó analizando siete muestras en ocho réplicas y en tres ocasiones distintas.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value							
%	71	73	69	72	25	35	31
SD	9	9	6	11	1	2	2
CV%	13%	13%	9%	15%	4%	5%	5%

TABLA 8. Precisión intra ensayo para la aplicación semi-cuantitativa: se determinó analizando siete muestras en ocho réplicas en una ocasión.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value							
%	79	76	72	83	24	34	30
SD	10	11	6	9	0	1	1
CV%	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

TABLA 9. Variación de lote a lote en la aplicación semi-cuantitativa: se determinó analizando siete muestras en duplicado en tres lotes distintos por tres personas diferentes.

Sample	1	2	3	4	5	6	7
Mean value (%)	8	73	85	24	37	74	78
SD	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
%CV	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

TABLA 10.

La recuperación de dilución se determinó analizando cinco series de diluciones para tres muestras diferentes.

Muestra	Dilución	Actividad media medida (%)	Actividad teórica (%)	Dilución corregida % de recuperación
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
Muestra	Dilución	Actividad media medida (%)	Actividad teórica (%)	Dilución corregida % de recuperación
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
Muestra	Dilución	Actividad media medida (%)	Actividad teórica (%)	Dilución corregida % de recuperación
3	1/100	84	84	100
	1/200	37	42	88
	1/400	21	21	100
	1/800	11	11	100
	1/1600	7	6	117












SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Causas posibles	Solución
Valores de control fuera de rango	La temperatura, el tiempo o el pipeteo no son correctos; los reactivos no se han mezclado	Asegúrese de que el tiempo y la temperatura sean correctos. Repita el análisis.
	Contaminación cruzada de los controles	Extreme el cuidado al pipetear.
	La vía óptica no está limpia.	Asegúrese de que los pocillos no presenten suciedad ni burbujas de aire. Limpie el fondo de la placa y repita la lectura.
	Los controles (positivo y/o de actividad) no se han reconstituido correctamente. La dilución del calibrador no es correcta.	Compruebe los controles, disuelva uno nuevo. Compruebe la preparación y realice una dilución nueva.
Los resultados de todas las pruebas son negativos	No se han añadido uno o varios reactivos, o se han añadido en una secuencia incorrecta.	Vuelva a comprobar el procedimiento. Asegúrese de que se han utilizado los reactivos adecuados. Repita el análisis.
	La placa recubierta de antígeno está inactiva.	Asegúrese de que los pocillos no utilizados no presenten humedad evidente. Limpie el fondo de la placa y repita la lectura.
	El suero está inactivo.	Diluya muestras nuevas.
Los resultados de todas las pruebas son amarillos.	Los tampones o los reactivos están contaminados.	Asegúrese de que ninguna solución aparece turbia.
	La solución de lavado está contaminada.	Utilice un recipiente limpio. Compruebe la calidad del agua utilizada para preparar la solución.
	La dilución del suero no es correcta.	Repita el análisis.
La precisión es escasa.	La pipeta suministra un CV > 5% o las muestras no se han mezclado.	Compruebe la calibración de la pipeta. Utilice técnicas reproducibles. Elimine las burbujas de aire de la punta de la pipeta.
	El suero o los reactivos no se han mezclado lo suficiente o no se han dejado reposar a temperatura ambiente.	Mezcle todos los reactivos a fondo y suavemente y déjelos reposar a temperatura ambiente.
	La adición del reactivo ha tardado demasiado o se ha realizado a intervalos de tiempo irregulares.	Desarrolle una técnica uniforme y utilice dispositivos con varias puntas o de dispensación automática para reducir el tiempo.
	La vía óptica no está limpia.	Compruebe la ausencia de burbujas de aire en los pocillos. Limpie el fondo de la placa y repita la lectura.
	El lavado no ha sido uniforme, hay burbujas de aire atrapadas o queda solución de lavado en los pocillos.	Asegúrese de que todos los pocillos se rellenan y se aspiran de manera uniforme. Dispense líquido por encima del nivel de reactivo en el pocillo. Después del último lavado, vacíe los pocillos golpeando las tiras con suavidad sobre un tejido absorbente.

REFERENCES:

- Walport M. Complement (First of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1058-66.
- Walport M. Complement (Second of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1140-44.
- Roos A et al. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol* 2003; 39:655-68.
- Fredriksson GN et al. New procedure for detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. *J Immunol Meth* 1993; 166:263-70.
- Seelen MA et al. Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Meth* 2005; 296:187-98.
- Salvador-Morales C, Sim RB. *Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials*. 2013, 1st Ed, World Scientific Publishing (ISBN: 978-4390-25-5).
- Tudoran R & Kirschfink M. *Modern Complement analysis: indications, methods and outlook*. *LaboratoriumsMedizin* 2012; 36(3):--.
- Botto M et al. Complement in human disease: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol* 2009; 46:2774-83.
- Mollnes TE et al. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 2007; 44:3838-49.
- Nilsson B, Nilsson Ekdahl K. *Complement Diagnostics: Concepts, Indications, and Practical Guidelines*. *Clin Develop Immunol*; 2012, Art ID 962702.

EXPLANATION OF SYMBOLS. L'EXPLICATION DE SYMBOLES. LA EXPLICACIÓN DE SIMBOLOS. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE. LA SPIEGAZIONE DI SIMBOLI. FORKLARING TIL SYMBOLER. SYMBOLFORKLARING. FÖRKLARINGAR TILL SYMBOLER.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numerodi lotto. Partinummer. Lot nummer.Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
 96	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 tester.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno. Antigen. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Conjugato. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konz. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL -	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Negativ control. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
CONTROL + LYO	Lyophilized positive control. Contrôle positif lyophilisé. Control positivo liofilizado. Lyophilisierte Positivkontrolle. Controllo positivo liofilizzato. Frysetørret positiv kontrol. Lyofilisert positiv kontroll. Frystorkad positiv kontroll.
CONTROL AC LYO	Lyophilized activity control. Contrôle d'activité lyophilisé. Control de actividad liofilizado. Lyophilisierte Aktivitätskontrolle. Controllo dell'attività liofilizzata. Frysetørret aktivitetskontrol. Lyofilisert aktivitetskontroll. Lyofiliserad aktivitetskontroll.
CH REP	Swiss Representative. Représentant Suisse. Representante suizo. Schweizer Vertreter. Rappresentante svizzero. Schweizisk repræsentant. Sveitsisk representant. Schweizisk representant

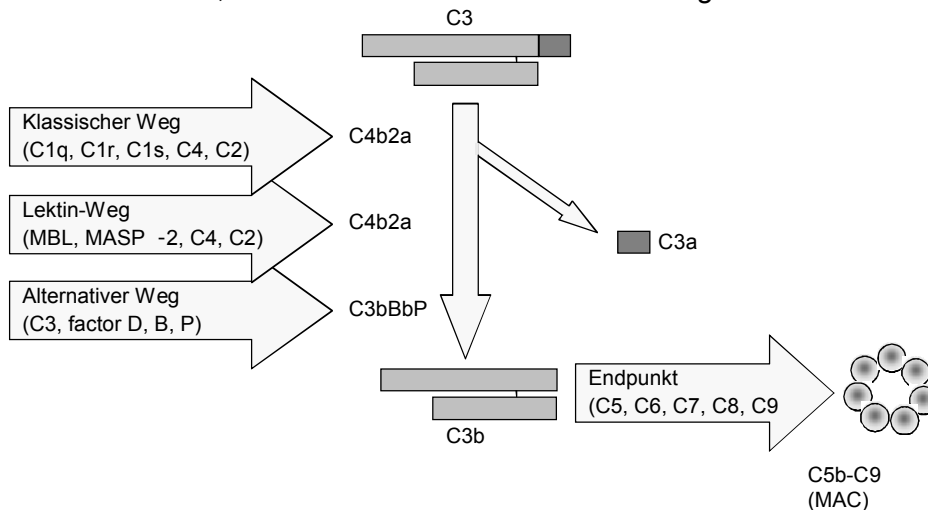
VERWENDUNGSZWECK

Der Wieslab® Complement system Classical pathway ist ein Enzymimmunoassay für die qualitative und/oder semi-quantitative Bestimmung des funktionellen klassischen Komplementwegs in menschlichem Serum. Die Analyse darf nur von ausgebildetem Laborpersonal durchgeführt werden.

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Das Komplementsystem spielt eine wichtige Rolle bei chronischen und autoimmunvermittelten Erkrankungen sowie bei Infektionen. Es gibt drei Wege der Komplementaktivierung (Abb. 1), nämlich den klassischen, den alternativen und den Lektin-Weg.



Eine eingeschränkte Komplementaktivität führt beim Menschen zu einer empfindlicheren Reaktion auf wiederholte heftige oder schwere Infektionen und kann Auswirkungen auf die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen haben. Eine nicht adäquate Aktivierung von Komplement führt zu chronischen Entzündungen sowie Gewebeschädigung.

Die in-vitro Aktivierung der Komplementkaskade führt zu einem Verbrauch von Komplementkomponenten, was wiederum zur Abnahme der Konzentrationen führt. Somit wird die Bestimmung der Komplement-Proteine oder der Komplementaktivität dazu benutzt, um einen Anhalt dafür zu bekommen, ob das Komplementsystem durch einen immunologischen oder/und pathologischen Mechanismus aktiviert wurde. Beide, funktionelle und immunochemische Komplement-Messungen werden verwendet, wenn bei Patienten der Verdacht auf eine Komplement-aktivierende Erkrankung oder auf einen vererbten Defekt besteht. Die Spiegel der Komplementaktivität, wie sie mit funktionellen Tests wie z.B. mit dem Wieslab® Complement Kit erhalten werden, berücksichtigen auch die Syntheserate, den Abbau und den Verbrauch von Komponenten, und stellen somit zusätzlich eine Aussage über die Integrität der Aktivierungswege zur Verfügung - im Gegensatz zu immunochemischen Methoden, die nur spezifische Konzentrationen der verschiedenen Komplementkomponenten messen.

PRINZIP DES WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM KIT

Der Wieslab® Complement system Classical pathway Kit kombiniert das Prinzip des hämolytischen Tests für Komplementaktivierung mit der Verwendung von markierten Antikörpern, die spezifisch sind für ein Neoepitop, das als Resultat der Komplementaktivierung gebildet wird. Die Menge des gebildeten Neoepitops ist proportional zur funktionellen Aktivität des Komplementwegs.

Im Komplement CP Kit sind die Vertiefungen (Wells) der Mikrotiterplatten-Streifen beschichtet mit spezifischen Aktivatoren des klassischen Wegs. In Kombination mit einer speziellen Verdünnungspuffer-Komposition und der dazugehörigen Patientenserum-Verdünnung wird sichergestellt, dass nur der klassische Weg aktiviert wird.

Während der Inkubation der verdünnten Patientenserum im Well wird das Komplementsystem durch die spezifische Beschichtung aktiviert. Die Wells werden dann gewaschen und die Menge an gebildetem C5b-9-Komplex wird nachgewiesen mittels eines mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörpers, der spezifisch das Neoepitop erkennt, welches während der MAC-Formation (Membrane Attack Complex) entsteht.

Nach einem weiteren Waschschrift werden die spezifischen Antikörper mittels einer Substratlösung für die alkalische Phosphatase nachgewiesen. Die Menge an Komplement-Aktivität korreliert mit der Farbintensität und wird anhand einer Absorptionsmessung als optische Dichte (OD) angegeben.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Die in diesem Kit zur Herstellung der Kontrollen verwendeten Humanserumkomponenten wurden auf Antikörper gegen das Humane Immundefizienz-Virus 1 und 2 (HIV 1 und 2), Hepatitis C (HCV) sowie auf Hepatitis B-Oberflächenantigen mit von der FDA genehmigten Verfahren getestet und als negativ befunden. Da generell kein Testverfahren eine vollständige Gewissheit bieten kann, dass HIV, HCV, Hepatitis B-Virus oder andere Infektionserreger nicht vorliegen, sollten Proben und Reagenzien humanen Ursprungs immer als potenziell infektiös behandelt werden.

Die „Centers for Disease Control and Prevention“ und „National Institutes of Health“ empfehlen, potenziell infektiöse Materialien nach Biosafety Level 2 zu behandeln.

Alle Lösungen enthalten Proclin 300 als Konservierungsmittel. Niemals mit dem Mund pipettieren oder zulassen, daß Reagenzien bzw. Patientenproben mit der Haut in Berührung kommen. Proclin-haltige Reagenzien können reizend wirken. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Im Falle eines Kontakts mit viel Wasser spülen.

Sicherheitsdatenblätter sind für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile auf Anfrage von Svar Life Science erhältlich.

Waschpuffer 30 x Konz.



WARNUNG

Enthält: Reaktionsmasse: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] und 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
 H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
 P261 Einatmen von Aerosol vermeiden.
 P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
 P280 Schutzhandschuhe tragen.
 P333+313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Verdünnungspuffer CP, Konjugat, Negativkontrolle, Substrat pNPP

EUH208 Enthält Reaktionsmasse: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] und 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
 EUH210 Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

PROBENGEWINNUNG

Blutproben mit einer aseptischen Venenpunktionmethode entnehmen und anhand üblicher Verfahren Serum gewinnen. Es wird mindestens eine Menge von 5 ml Vollblut empfohlen. Das Blut in Serumröhrchen 60-65 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 C) gerinnen lassen. Blutproben zentrifugieren und zellfreies Serum in ein sauberes Röhrchen überführen. Seren müssen vorschriftsgemäß behandelt werden, um eine in vitro Komplementaktivierung zu vermeiden. Für eine längere Lagerung Seren bei -70 °C oder kälter in fest verschlossenen Röhrchen einfrieren oder für den Transport auf Trockeneis lagern. Proben sollten nicht öfter als ein Mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Kein ikterisches, lipämisches bzw. hämolytisches Serum verwenden. Hitze-inaktiviertes Serum kann nicht verwendet werden. Plasma kann nicht verwendet werden. Das NCCLS hat Empfehlungen zur

Lagerung von Blutproben herausgebracht ("Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens", H18A, 1990).

KITKOMPONENTEN UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Ein Rahmen mit farblos einzeln abbrechbaren Wells (12x8), beschichtet mit humanem IgM; zusammen mit einem Trockenmittelbeutel in einem Folienbeutel eingeschweißt.
- 2 x 35 ml Verdünnungspuffer (Dil CP), blaues Etikett.
- 13 ml Konjugat, enthält mit alkalischer Phosphatase markierte Antikörper gegen C5b-9 (blaue Farbe).
- 13 ml Substratlösung, gebrauchsfertig.
- 30 ml Waschlösung, 30-fach konzentriert.
- 0.2 ml Negativkontrolle (NC), enthält menschliches Serum (wie Patientenserumprobe verdünnen).
- Lyophilisierte Positivkontrolle (PC), enthält gefriergetrocknetes Humanserum, Rekonstitution in 0.2 ml destilliertem Wasser, siehe "Rekonstitution der Positivkontrolle" weiter unten.
- Lyophilisierte Aktivitätskontrolle (AC) für den semi-quantitativen Gebrauch, enthält gefriergetrocknetes Humanserum (anderer Ursprung als die PC), siehe "Rekonstitution der Aktivitätskontrolle" unter "Vorgehensweise bei der semi-quantitativen Verwendung".

Positiv- und Aktivitätskontrolle müssen nach Erhalt bei -20 °C gelagert werden.

Achtung: Das Rekonstitutionsvolumen für die Aktivitätskontrolle ist im Analysenzertifikat (CoA) angegeben (XXX µl) sowie auf dem Etikett der Aktivitätskontrolle.

Bis auf die Waschlösung und die Kontrollen sind alle Kitreagenzien gebrauchsfertig. Außer der Positiv- und der Aktivitätskontrolle alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. Die rekonstituierten Positiv- und Aktivitätskontrollen sollten bei -70°C gelagert werden und können einmal aufgetaut werden.

NICHT MITGELIEFERTE, ABER ERFORDERLICHE MATERIALIEN BZW. GERÄTE

- Meßgerät für Mikrotiterplatten mit einem Filter für 405 nm.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen
- Waschgerät für Mikrotiterplatten-Streifen, saugfähige Papiertücher, Röhrchen und ein Kurzzeitwecker

DURCHFÜHRUNG – QUALITATIVE ANWENDUNG

Nur die Anzahl an Wells aus der Verpackung entnehmen, die zum Testen benötigt werden; anschließend die Aluminiumverpackung wieder sorgfältig verschließen. Vor dem Testansatz alle Lösungen auf Raumtemperatur (20-25 °C) bringen. Nicht die Reagenzien aus verschiedenen Chargen mischen.

HERSTELLUNG DER WASCHLÖSUNG

Falls sich in dem Röhrchen mit der konzentrierten Waschlösung Salzkristalle gebildet haben, dieses vor Verdünnung der Waschlösung in ein 37°C warmes Wasserbad stellen, bis sich die Salzkristalle aufgelöst haben.

30 ml der 30-fach konzentrierten Waschlösung mit 870 ml destilliertem Wasser verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei einer Lagerung von 2-8 °C bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar.

REKONSTITUTION DER POSITIVKONTROLLE

Das gesamte lyophilisierte Material sachte auf den Boden des Fläschchens klopfen und den Stopfen entfernen. Sofort 200 µl destilliertes Wasser direkt zum Lyophilisat geben. Mit dem Stopfen wieder verschließen. Das Fläschchen 5 Minuten auf Eis stehen lassen und dann vorsichtig mit der Hand oder dem Vortex mischen bis alles vollständig gelöst ist. Die rekonstituierte Kontrolle wie die Serumprobe eines Patienten verdünnen. Sie kann vor Gebrauch bis zu 4 Stunden bei 2-8 °C oder auf Eis aufbewahrt werden. Sie kann einmal bei -70 °C eingefroren und wieder aufgetaut werden.

SERUM

Das Serum zum teilweisen Auftauen kurz in ein 37 °C warmes Wasserbad geben und dabei vorsichtig schwenken. Nach dem teilweisen Auftauen die Röhrchen sofort in ein Eisbad stellen und dort bis zum vollständigen Auftauen auf Eis lassen. Auf einem Vortex kurz mischen.

SERUM-VERDÜNNUNG

Das Serum 1:101 mit dem Verdünnungspuffer CP (blaues Etikett) verdünnen: 500 µl Verdünnungspuffer + 5 µl Serum und gründlich aber vorsichtig mit einem Vortex mischen. Das verdünnte Serum kann vor dem Testansatz maximal 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen werden.

INKUBATION DER PROBEN

Anhand des Tabellenschemas unten jeweils 100 µl pro Well in Doppelbestimmungen Verdünnungspuffer (Dil) als Leerwert, Positivkontrolle (PC), Negativkontrolle (NC) und verdünntes Patientenserum (P) pipettieren. Abgedeckt für 60-70 Minuten bei 37 °C inkubieren.

Klassischer Weg

	1	2	3
A	Dil CP	P2	
B	Dil CP	P2	
C	PC	etc	
D	PC		
E	NC		
F	NC		
G	P1		
H	P1		

NACH DER SERUMINKUBATION

Alle Wells ausleeren und dreimal mit 300 µl Waschlösung waschen; dazu die Wells jedes Mal befüllen und dekantieren. Nach dem letzten Waschen die Wells durch Klopfen des Streifens auf saugfähigem Zellstoff sorgfältig ausleeren.

KONJUGAT HINZUFÜGEN

In jedes Well 100 µl Konjugat pipettieren. 30 Minuten bei Raumtemperatur (+20-25 °C) inkubieren.

NACH DER KONJUGATINKUBATION

Wie oben angegeben dreimal waschen.

SUBSTRATLÖSUNG HINZUFÜGEN

In jedes Well 100 µl Substrat pipettieren, 30 Minuten bei Raumtemperatur (+20-25 °C) inkubieren. Die optische Dichte bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Reader messen. (Als Stopplösung kann eine 5 mM EDTA-Lösung verwendet werden, 100 µl/Well. Die Messung der optischen Dichte der Wells innerhalb von 60 Minuten vornehmen.)

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die optische Dichte des Leerwerts (Verdünnungspuffer) von der NC, PC und den Proben abziehen. Die optische Dichte der Positivkontrolle sollte nach Abzug des Leerwerts $>1,0$ und die der Negativkontrolle $< 0,2$ sein.

Die Mittelwerte der OD 405nm für die Probe, die PC und die NC berechnen und dann den Prozentsatz der Komplementaktivität wie folgt ermitteln: $(\text{Probe} - \text{NC})/(\text{PC} - \text{NC}) \times 100$. Die Negativ- und die Positivkontrolle dienen zur Überwachung von relevanten Mängeln der Reagenzien. Die Positivkontrolle ist nicht zur Überprüfung der Präzision am Cut-off-Bereich geeignet. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenz- und Cut-off-Werte für Komplement-Defekte festlegt.

Falls eine der Kontrollen nicht innerhalb des angegebenen Bereichs liegt, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Das Analysenzertifikat (CoA) im Kit ist chargenspezifisch und dient der Überprüfung der in Ihrem Labor gemessenen Werte. Die im Analysenzertifikat angegebenen Ergebnisse dürfen nur als Richtwerte verstanden werden. Die in Ihrem Labor erzielten Ergebnisse können abweichen.

EINSCHRÄNKUNGEN

Der individuelle Komplementspiegel eines Patienten kann nicht als Maßstab für die Schwere der Erkrankung verwendet werden, da er von Patient zu Patient variieren kann. Daher ist es schwierig, eine absolute Standardisierung der Ergebnisse zu erhalten.

Dieser Test sollte nicht als alleinige Grundlage für klinische Therapie-Entscheidungen dienen, sondern sollte immer zusammen mit klinischen Symptomen und Ergebnissen anderer verfügbarer Tests eingesetzt werden. Auf der Grundlage des Komplement-Testergebnisses sollte keine Therapie begonnen werden. Eine Behandlung sollte nicht auf alleiniger Basis von Veränderungen in den Komplementspiegeln begonnen oder geändert werden, sondern eher aufgrund sorgfältiger klinischer Beobachtung erfolgen.

ERWARTETE ERGEBNISSE

Wenn erniedrigte Spiegel von Komplementkomponenten oder der Komplementfunktion gefunden werden, wird von Klinikern entweder eine Defizienz oder ein andauernder immunologischer Prozess vermutet, der zu einem erhöhten Zerfall von Komponenten und damit zur Erniedrigung der Komplementspiegel führt.

Als Normalverteilung mit 2SD wurde für den qualitativen Test ein Bereich von 69 – 129% in Bezug auf die Positivkontrolle ermittelt, siehe Tabelle 1. Ergebnisse innerhalb dieses Bereichs weisen auf eine normale Funktion des klassischen Wegs hin. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich für seine Patientenklientel ermittelt.

Ein Wert unterhalb des Bereichs von 69-129% deutet entweder auf eine erhöhte Aktivierung – was zum Verbrauch von Komponenten des klassischen Wegs führt – oder auf eine genetisch bedingte niedrige Aktivität hin.

Werte unterhalb von 5% legen sehr stark eine komplette Defizienz nahe – entweder verursacht durch extreme Aktivierung oder durch einen vererbten Defekt im klassischen Weg. Um festzustellen, welche Komplementfaktor(en) die geringe Aktivität verursachen, ist eine weitere Untersuchung der Komplementproteine erforderlich.

Ein negatives Ergebnis, d.h. Verdacht auf einen Defekt, sollte immer durch sorgfältige Testung einer neuen Probe überprüft werden, um sicherzustellen, dass keine in-vitro Aktivierung von Komplement stattgefunden hat.

Erhöhte Komplementspiegel sind normalerweise ein unspezifischer Ausdruck der Akute-Phase-Reaktion.

Der Wieslab® Complement System Classical Pathway kann für die Bestimmung von Komplement-Defekten in Bezug auf den klassischen Weg hilfreich sein (siehe nachfolgende Tabelle). Eine vollständigere und mehr in die Tiefe gehende funktionelle Untersuchung aller drei Komplement-Wege kann mit dem Wieslab® Complement system Screen Test erreicht werden.

Klassischer Weg	MBL-Weg	Alternativer Weg	Mögliche Defekte
Positiv	Positiv	Positiv	Keiner
Negativ	Positiv	Positiv	C1q, C1r, C1s
Positiv	Positiv	Negativ	Properdin, Faktor B, D
Positiv	Negativ	Positiv	MBL, MASP2
Negativ	Negativ	Negativ	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativ	Negativ	Positiv	C4, C2 oder Kombination

LEISTUNGS-CHARAKTERISTIKA

120 Seren von Blutspendern wurden getestet und der Normbereich ermittelt. Die Werte werden in % der Positiv-Kontrolle angegeben (siehe Abbildung 1 und Tabelle 1). Kein Blutspender lag unter 40 %.

ABBILDUNG 1.

CP Qualitative Anwendung

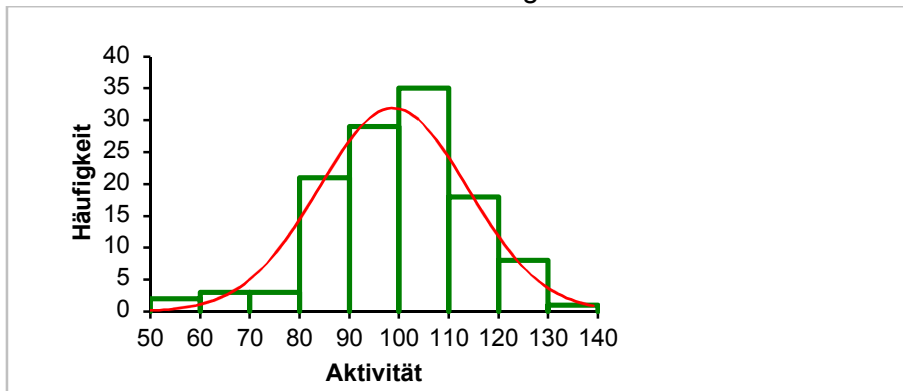


TABELLE 1.

	n	Mittelwert (%)	±2 SD (%)	Median (%)
Klassischer Weg	120	99	69 – 129*	100

*) Dies beruht auf einer statistischen Berechnung und garantiert keinen echten Cut-off. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenz- und Cut-off-Werte für einen vermuteten Defekt festlegt.

TABELLE 2

Seren mit bekannten Komplement-Defekten wurden im Assay getestet und folgende Ergebnisse erzielt. Alle defizienten Seren wurden in den Tests gefunden und ergaben Werte unter 5%**).

Defekt	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Anzahl der Patienten	5	1	1	1	2	2
Anzahl der gefundenen defekten Seren	5	1	1	1	2	2

**) Siehe "M.A. Seelen et. al, Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. J Immunol Meth 2005, 296, 187-198"; für eine weitergehende Testung der defizienten Patientenproben wurden die Proben mit der qualitative Anwendung untersucht

Depletion	C1q	C3	C4	C5	C7
Anzahl der depletierten Seren	2	1	1	1	1
Anzahl der gefundenen Depletionen	2	1	1	1	1

TABELLE 3. Die Interassay-Präzision für die qualitative Anwendung wurde mittels dreier Seren in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden aus sechs verschiedenen Testansätzen ermittelt.

	CP P1	CP P2	CP P3
Mittelwert %	98	92	21
SD	4,3	3,9	1,7
VK%	4	4	8

TABELLE 4. Die Intraassay-Präzision für die qualitative Anwendung wurde mit einer Probe in 40-fach Bestimmung ermittelt

Assay	Mittelwert %	SD	VK %
CP	85	2,9	3

DURCHFÜHRUNG – SEMI-QUANTITATIVE ANWENDUNG

Die semi-quantitative Anwendung unterscheidet sich dahingehend von der qualitativen, dass eine Standardkurve erstellt wird, die durch eine Verdünnung der Positivkontrolle im Kit zu einer Standardkurve mit 100, 75, 50, 25 und 12,5% Aktivität führt.

Nur die Anzahl an Wells aus der Verpackung entnehmen, die zum Testen benötigt werden; anschließend die Aluminiumverpackung wieder sorgfältig verschließen. Vor dem Testansatz alle Lösungen auf Raumtemperatur (20-25 °C) bringen. Nicht die Reagenzien aus verschiedenen Chargen mischen.

HERSTELLUNG DER WASCHLÖSUNG

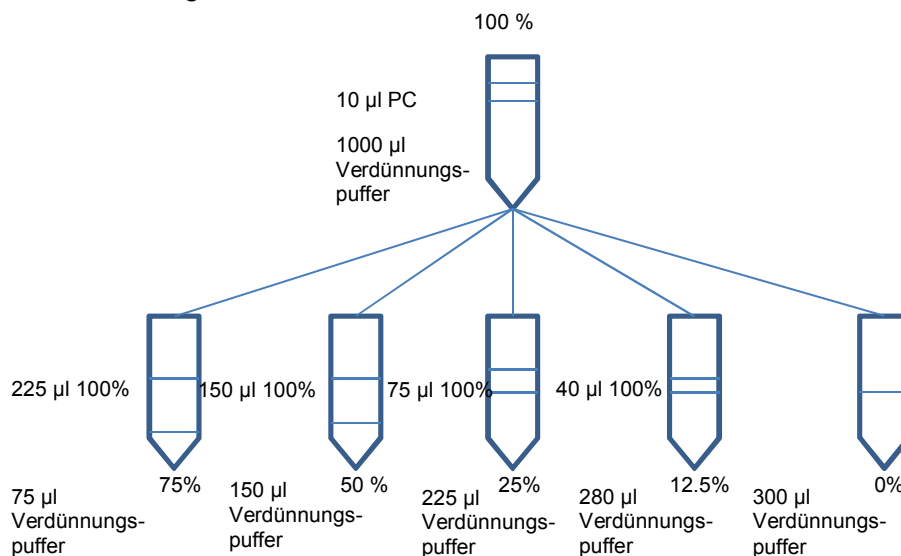
Falls sich in dem Röhrchen mit der konzentrierten Waschlösung Salzkristalle gebildet haben, dieses vor Verdünnung der Waschlösung in ein 37°C warmes Wasserbad stellen, bis sich die Salzkristalle aufgelöst haben.

30 ml der 30-fach konzentrierten Waschlösung mit 870 ml destilliertem Wasser verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei einer Lagerung von 2-8 °C bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar.

Rekonstitution der Positivkontrolle und Verdünnung für die Verwendung als Kalibrator

Das gesamte lyophilisierte Material sachte auf den Boden des Fläschchens klopfen und den Stopfen entfernen. Sofort 200 µl destilliertes Wasser direkt zum Lyophilisat geben. Mit dem Stopfen wieder verschließen. Das Fläschchen 5 Minuten auf Eis stehen lassen und dann vorsichtig mit der Hand oder dem Vortex mischen bis alles vollständig gelöst ist. Die rekonstituierte Kontrolle kann bis zum Gebrauch bis zu 4 Stunden bei 2-8 °C oder auf Eis aufbewahrt werden. Sie kann einmal bei -70 °C eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Die Verdünnung der rekonstituierten Positivkontrolle für die Verwendung als Kalibrator ist aus der nachfolgenden Darstellung zu ersehen:



Die Kalibratoren können bis zum Gebrauch 1 Stunde bei Raumtemperatur gelagert werden. Sie müssen frisch zubereitet werden und können nicht nach der Verdünnung zum weiteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt werden.

REKONSTITUTION DER AKTIVITÄTSKONTROLLE (AC)

Das gesamte lyophilisierte Material sachte auf den Boden des Fläschchens klopfen und den Stopfen entfernen. Sofort die im Analysenzertifikat bzw. auf dem Etikett angegebene Menge an destilliertem Wasser direkt zum Lyophilisat geben. Mit dem Stopfen wieder verschließen. Das Fläschchen 5 Minuten auf Eis stehen lassen und dann vorsichtig mit der Hand oder dem Vortex mischen bis alles vollständig gelöst ist. Die rekonstituierte Kontrolle wie Patientenserum verdünnen. Die rekonstituierte Aktivitätskontrolle kann bis zum Gebrauch bis zu 4 Stunden bei 2-8 °C oder auf Eis aufbewahrt werden. Sie kann bei -70 °C gelagert und einmal wieder aufgetaut werden.

SERUM

Das Serum zum teilweisen Auftauen kurz in ein 37 °C warmes Wasserbad geben und dabei vorsichtig schwenken. Nach dem teilweisen Auftauen die Röhrchen sofort in ein Eisbad stellen und dort bis zum vollständigen Auftauen auf Eis lassen. Auf einem Vortex kurz mischen.

VERDÜNNUNG VON SERUM UND AKTIVITÄTSKONTROLLE

Das Serum 1:101 mit dem Verdünnungspuffer CP (blaues Etikett) verdünnen: 500 µl Verdünnungspuffer + 5 µl Serum und gründlich aber vorsichtig mit einem Vortex mischen. Das verdünnte Serum kann vor dem Testansatz maximal 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen werden.

INKUBATION DER PROBEN

Anhand des Tabellenschemas unten jeweils 100 µl pro Well in Doppelbestimmungen Kalibratoren (100%-0%), Negativkontrolle (NC) und Aktivitätskontrolle (AC) sowie verdünntes Patientenserum (P) pipettieren. Abgedeckt für 60-70 Minuten bei 37 °C inkubieren.

Klassischer Weg

	1	2	3
A	100 %	12.5 %	P1
B	100 %	12.5 %	P1
C	75 %	0 %	P2
D	75 %	0%	P2
E	50 %	NC	etc
F	50 %	NC	
G	25 %	AC	
H	25 %	AC	

NACH DER SERUMINKUBATION

Alle Wells ausleeren und dreimal mit 300 µl Waschlösung waschen; dazu die Wells jedes Mal befüllen und dekantieren. Nach dem letzten Waschen die Wells durch Klopfen des Streifens auf saugfähigem Zellstoff sorgfältig ausleeren.

KONJUGAT HINZUFÜGEN

In jedes Well 100 µl Konjugat pipettieren. 30 Minuten bei Raumtemperatur (+20-25 °C) inkubieren.

NACH DER KONJUGATINKUBATION

Wie oben angegeben dreimal waschen.

SUBSTRATLÖSUNG HINZUFÜGEN

In jedes Well 100 µl Substrat pipettieren. 30 Minuten bei Raumtemperatur (+20-25 °C) inkubieren. Die Absorption (optische Dichte) bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Reader messen. (Als Stopplösung kann eine 5 mM EDTA Lösung verwendet werden, 100 µl/Well. Die Absorptionsmessung der Wells innerhalb von 60 Minuten vornehmen.)

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Als Kurvenanpassung wird die 4-Parameter-Logistik (Marquardt) empfohlen. Die Absorption des 0%-Kalibrators von allen OD-Werten abziehen.

Die Absorption des Kalibrators 100% sollte >1.0, die der Negativkontrolle < 0.2 und die der Aktivitätskontrolle >30% sein. Falls die gemessenen Werte von Proben höher liegen als der höchste Kalibratorwert 100%, können die Proben 1:201 verdünnt und erneut getestet werden. Bitte beachten, dass in diesem Fall der gemessene Wert der Aktivitätskontrolle entsprechend der Probenverdünnung angepasst werden muss.

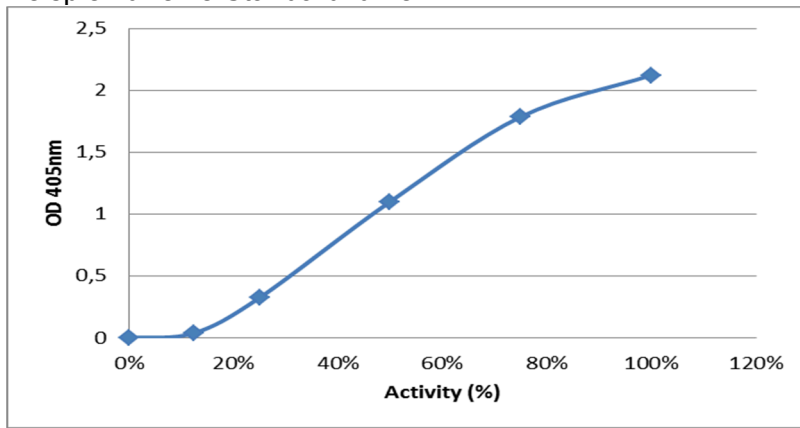
Falls eine der Kontrollen nicht innerhalb des angegebenen Bereichs liegt, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenz- und Cut-off-Werte für Defekte festlegt.

QUALITÄTSKONTROLLE

Das Analysenzertifikat (CoA) im Kit ist chargenspezifisch und dient der Überprüfung der in Ihrem Labor gemessenen Werte. Die im Analysenzertifikat angegebenen Ergebnisse dürfen nur als Richtwerte verstanden werden. Die in Ihrem Labor erzielten Ergebnisse können abweichen.

Beispiel für eine Standardkurve



Achtung: Die Grafik oben zeigt ein Beispiel für eine semi-quantitative Standardkurve und sollte nicht zur aktuellen Interpretation von Patientenseren verwendet werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

Der individuelle Komplementspiegel eines Patienten kann nicht als Maßstab für die Schwere der Erkrankung verwendet werden, da er von Patient zu Patient variieren kann. Daher ist es schwierig, eine absolute Standardisierung der Ergebnisse zu erhalten.

Dieser Test sollte nicht als alleinige Grundlage für klinische Therapie-Entscheidungen dienen, sondern sollte immer zusammen mit klinischen Symptomen und Ergebnissen anderer verfügbarer Tests eingesetzt werden. Auf der Grundlage des Komplement-Testergebnisses sollte keine Therapie begonnen werden. Eine Behandlung sollte nicht auf alleiniger Basis von Veränderungen in den Komplementspiegeln begonnen oder geändert werden, sondern eher aufgrund sorgfältiger klinischer Beobachtung erfolgen.

ERWARTETE ERGEBNISSE

Wenn erniedrigte Spiegel von Komplementkomponenten oder der Komplementfunktion gefunden werden, wird von Klinikern entweder eine Defizienz oder ein andauernder immunologischer Prozess vermutet, der zu einem erhöhten Zerfall von Komponenten und damit zur Erniedrigung der Komplementspiegel führt.

Als Normalverteilung mit 2SD wurde für den semi-quantitativen Test ein Bereich von 66 – 113% in Bezug auf die Positivkontrolle ermittelt, siehe Tabelle 5. Ergebnisse innerhalb dieses Bereichs weisen auf eine normale Funktion des klassischen Wegs hin. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich für seine Patientenclientel ermittelt.

Ein Wert unterhalb des Bereichs 66-113% deutet entweder auf eine erhöhte Aktivierung – was zum Verbrauch von Komponenten des klassischen Wegs führt – oder auf eine genetisch bedingte niedrige Aktivität hin.

Werte unterhalb von 15% legen sehr stark eine komplette Defizienz nahe – entweder verursacht durch extreme Aktivierung oder durch einen vererbten Defekt im klassischen Weg. Um festzustellen, welche Komplementfaktor(en) die geringe Aktivität verursachen, ist eine weitere Untersuchung der Komplementproteine erforderlich.

Ein negatives Ergebnis, d.h. Verdacht auf einen Defekt, sollte immer durch sorgfältige Testung einer neuen Probe überprüft werden, um sicherzustellen, dass keine in-vitro Aktivierung von Komplement stattgefunden hat.

Erhöhte Komplementspiegel sind normalerweise ein unspezifischer Ausdruck der Akute-Phase-Reaktion.

Der Wieslab® Complement System Classical Pathway kann für die Bestimmung von Komplement-Defekten in Bezug auf den klassischen Weg hilfreich sein (siehe nachfolgende Tabelle). Eine vollständigere und mehr in die Tiefe gehende funktionelle Untersuchung aller drei Komplement-Wege kann mit dem Wieslab® Complement system Screen Test erreicht werden.

Klassischer Weg	MBL-Weg	Alternativer Weg	Mögliche Defekte
Positiv	Positiv	Positiv	Keiner
Negativ	Positiv	Positiv	C1q, C1r, C1s
Positiv	Positiv	Negativ	Properdin, Faktor B, D
Positiv	Negativ	Positiv	MBL, MASP2
Negativ	Negativ	Negativ	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativ	Negativ	Positiv	C4, C2 oder Kombination

LEISTUNGS-CHARAKTERISTIKA

120 Seren von Blutspendern wurden getestet und der Normbereich ermittelt (siehe Abbildung 2 und Tabelle 3). Kein Blutspender lag unter 40 %.

Messbereich der Standardkurve: 12,5% - 100%

Detektionsgrenze (LOD) = 8%

Abbildung 2. CP Semi-quantitative Anwendung

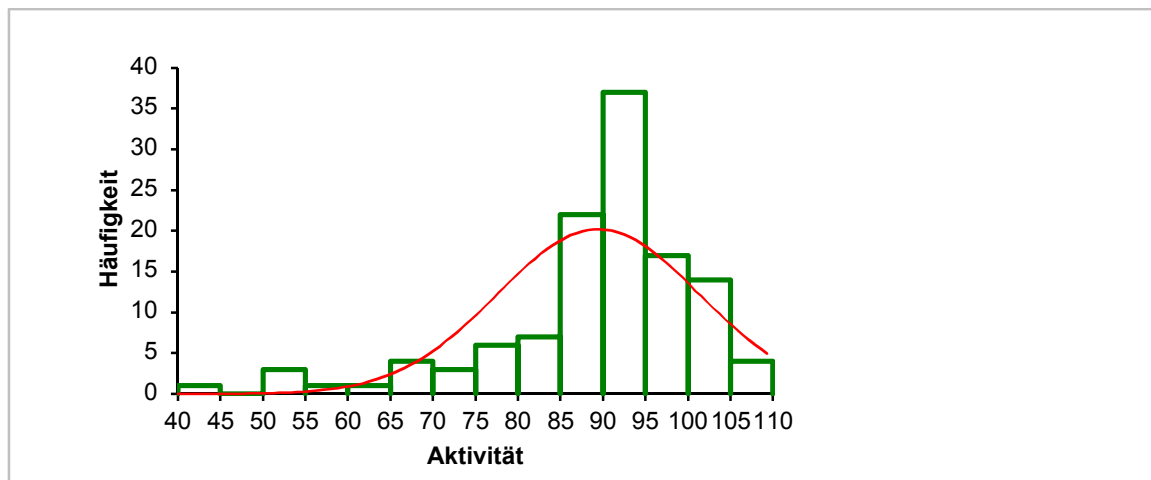


TABELLE 5.

	n	Mittelwert (%)	±2SD (%)	Median (%)
Semi-quantitative Anwendung	120	89	66-113*	92

Dies beruht auf einer statistischen Berechnung und garantiert keinen echten Cut-off.

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenz- und Cut-off-Werte für einen Defekt festlegt.

*) Inklusive Proben in Verdünnung 1:201, die außerhalb der Kurve lagen

TABELLE 6.

Seren mit bekannten Komplement-Defekten und Seren mit spezifisch depletierten Komplementfaktoren wurden im Assay getestet. Alle defizienten/depletierten Seren waren im Test niedrig und ergaben Werte unter 15%.

Defekt	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Anzahl der Patienten	5	1	1	1	2	2
Anzahl der gefundenen defekten Seren	5	1	1	1	2	2

Depletion	C1q	C3	C4	C5	C7
Anzahl der depletierten Seren	2	1	1	1	1
Anzahl der gefundenen Depletionen	2	1	1	1	1

TABELLE 7. Die Interassay-Präzision für die semi-quantitative Anwendung wurde mittels sieben Seren in Achtfachbestimmungen und drei verschiedenen Testansätzen ermittelt.

	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert %	71	73	69	72	25	35	31
SD	9	9	6	11	1	2	2
VK%	13%	13%	9%	15%	4%	5%	5%

TABELLE 8. Die Intraassay-Präzision für die semi-quantitative Anwendung wurde mittels sieben Seren in Achtfachbestimmungen in einem Testansatz ermittelt

	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert %	79	76	72	83	24	34	30
SD	10	11	6	9	0	1	1
VK%	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

TABELLE 9. Die Varianz von Kit-Chargen für die semi-quantitative Anwendung wurde mittels sieben Seren in Doppelbestimmung mit drei verschiedenen Chargen und drei verschiedenen Personen ermittelt.

Probe	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert (%)	8	73	85	24	37	74	78
SD	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
VK%	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

TABELLE 10. Die Verdünnungslinearität wurde durch Testung von fünf seriellen Verdünnungen mit drei verschiedenen Proben ermittelt.

Probe	Verdünnung	Mittelwert der gemessenen Aktivität (%)	Theoretische Aktivität (%)	% korrigierte Wiederfindung
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
Probe	Verdünnung	Mittelwert der gemessenen Aktivität (%)	Theoretische Aktivität (%)	% korrigierte Wiederfindung
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
Probe	Verdünnung	Mittelwert der gemessenen Aktivität (%)	Theoretische Aktivität (%)	% korrigierte Wiederfindung
3	1/100	84	84	100
	1/200	37	42	88
	1/400	21	21	100
	1/800	11	11	100
	1/1600	7	6	117












FEHLERSUCHE

Problem	Mögliche Ursachen	Lösung
Kontroll-Werte außerhalb des angegebenen Bereichs	Fehler bei Temperatur, Inkubationszeiten oder Pipettierung, Reagenzien wurden nicht gemischt	Zeitangaben und korrekte Temperatur überprüfen. Testansatz wiederholen.
	Kreuzkontamination der Kontrollen	Vorsichtig pipettieren
	Optische Messung nicht in Ordnung	Wells auf Verschmutzung oder Luftblasen überprüfen. Plattenboden abwischen und nochmals messen.
	Kontrollen (Positiv- und/oder Aktivitätskontrolle) wurden nicht korrekt aufgelöst	Kontrollen prüfen, neu auflösen. Herstellung prüfen und neu verdünnen.
Alle Testergebnisse sind negativ	Ein oder mehrere Reagenzien wurden nicht oder zum falschen Zeitpunkt zugegeben.	Prozedur nochmals überprüfen. Auf nicht-verwendete Reagenzien hin prüfen. Testansatz wiederholen.
	Antigenbeschichtete Platte inaktiv.	Unbenutzte Wells auf Feuchtigkeit hin untersuchen. Plattenboden abwischen und nochmals messen.
	Serum inaktiv.	Neue Proben verdünnen.
Alle Testergebnisse sind gelb	Kontaminierte Puffer oder Reagenzien.	Alle Lösungen auf Trübungen hin überprüfen.
	Waschlösung kontaminiert.	Saubere Behälter verwenden. Qualität des zur Herstellung verwendeten Wassers überprüfen.
	Nicht ordnungsgemäße Serenverdünnung.	Test wiederholen
Schlechte Präzision.	Pipette liefert VK's von >5 % oder die Proben wurden nicht gemischt.	Pipetten-Kalibrierung überprüfen. Reproduzierbare Technik verwenden. Luftblasen in der Pipettenspitze vermeiden.
	Serum oder Reagenzien wurden nicht genügend gemischt oder waren nicht auf Raumtemperatur.	Alle Reagenzien gründlich, aber vorsichtig mischen und auf Raumtemperatur bringen.
	Die Reagenzienzugabe dauert zu lange, Ungleichmäßigkeit der Zeitintervalle	Einheitliche Technik entwickeln und eine Multipette bzw. Autodispenser verwenden, um die Zeitspannen zu verkürzen.
	Optische Messung nicht in Ordnung	Wells auf Verschmutzung oder Luftblasen überprüfen. Plattenboden abwischen und nochmals messen.

REFERENCES:

- Walport M. Complement (First of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1058-66.
- Walport M. Complement (Second of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1140-44.
- Roos A et al. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol* 2003; 39:655-68.
- Fredriksson GN et al. New procedure for detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. *J Immunol Meth* 1993; 166:263-70.
- Seelen MA et al. Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Meth* 2005; 296:187-98.
- Salvador-Morales C, Sim RB. *Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials*. 2013, 1st Ed, World Scientific Publishing (ISBN: 978-4390-25-5).
- Tudoran R & Kirschfink M. *Modern Complement analysis: indications, methods and outlook*. *LaboratoriumsMedizin* 2012; 36(3):--.
- Botto M et al. Complement in human disease: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol* 2009; 46:2774-83.
- Mollnes TE et al. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 2007; 44:3838-49.
- Nilsson B, Nilsson Ekdahl K. *Complement Diagnostics: Concepts, Indications, and Practical Guidelines*. *Clin Develop Immunol*; 2012, Art ID 962702.

EXPLANATION OF SYMBOLS. L'EXPLICATION DE SYMBOLES. LA EXPLICACIÓN DE SIMBOLOS. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE. LA SPIEGAZIONE DI SIMBOLI. FORKLARING TIL SYMBOLER. SYMBOLFORKLARING. FÖRKLARINGAR TILL SYMBOLER.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numerodi lotto. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
 96	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 tester.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. verensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

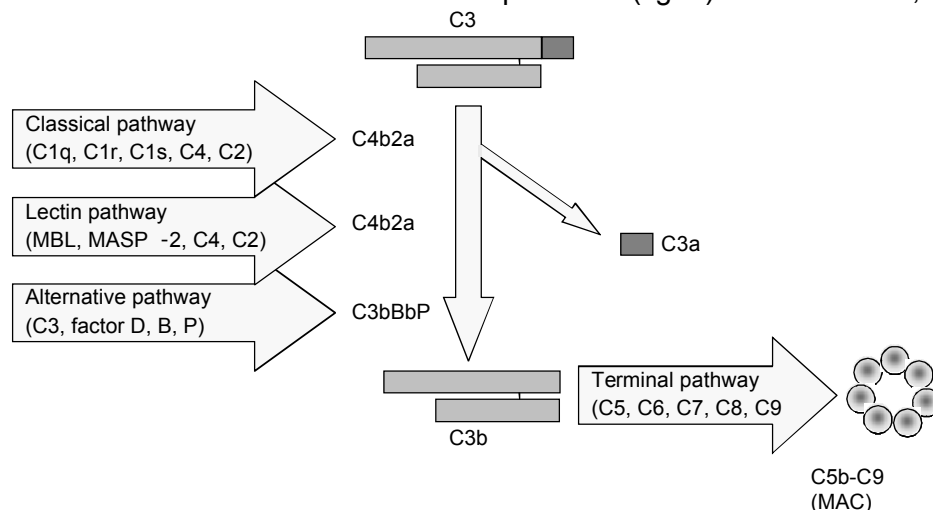
Ag	Antigen. Antigène. Antigeno. Antigen. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Conjugato. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konz. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL -	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Negativ control. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
CONTROL + LYO	Lyophilized positive control. Contrôle positif lyophilisé. Control positivo liofilizado. Lyophilisierte Positivkontrolle. Controllo positivo liofilizzato. Frysetørret positiv kontrol. Lyofilisert positiv kontroll. Frystorkad positiv kontroll.
CONTROL AC LYO	Lyophilized activity control. Contrôle d'activité lyophilisé. Control de actividad liofilizado. Lyophilisierte Aktivitätskontrolle. Controllo dell'attività liofilizzata. Frysetørret aktivitetskontrol. Lyofilisert aktivitetskontroll. Lyofiliserad aktivitetskontroll.
CH REP	Swiss Representative. Représentant Suisse. Representante suizo. Schweizer Vertreter. Rappresentante svizzero. Schweizisk repræsentant. Sveitsisk representant. Schweizisk representant

USO PREVISTO

Il Sistema Wieslab® Complement via classica è un saggio immunoenzimatico per la determinazione qualitativa e/o semi-quantitativa del complemento della via classica nel siero umano. Questo tipo di analisi deve essere condotta solo da personale esperto in tecniche di laboratorio.
PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il sistema del complemento svolge un ruolo essenziale nelle patologie croniche, autoimmuni e infettive. Esistono tre vie di attivazione del complemento (fig. 1): la via classica, la via alternativa e la via lectina.



Un'attività del complemento compromessa rende i soggetti più suscettibili a infezioni fulminanti ripetitive o gravi e può contribuire allo sviluppo di patologie autoimmuni. L'attivazione inappropriata del complemento contribuisce a infiammazioni croniche e a lesioni dei tessuti.

L'attivazione in vitro della sequenza del complemento porta al consumo di componenti del complemento che, a sua volta, porta alla riduzione della loro concentrazione. Pertanto, la determinazione delle proteine del complemento o dell'attività del complemento è utilizzata per indicare se il sistema del complemento è stato attivato da un meccanismo immunologico e/o patogeno. Per valutare i pazienti nel caso si sospetti una patologia con l'attivazione del complemento o si ritenga possibile un deficit ereditario, sono utilizzate entrambe le misurazioni funzionali e immunochimiche del complemento. Il livello di attività del complemento valutato mediante saggi funzionali come il kit Wieslab® Complement tiene in considerazione velocità di sintesi, deterioramento e consumo dei componenti e fornisce una misurazione dell'integrità delle vie, a differenza dei metodi immunochimici che misurano specificamente la concentrazione di vari componenti del complemento.

PRINCIPIO DEL SAGGIO DELLA VIA CLASSICA DI WIESLAB® COMPLEMENT

Il saggio Wieslab® Complement via classica combina i principi del saggio emolitico per l'attivazione del complemento all'uso di anticorpi marcati specifici per il neoantigene prodotti in seguito all'attivazione del complemento. La quantità di neoantigene generata è proporzionale all'attività funzionale delle vie del complemento.

Nel kit Complement CP, i pozzetti delle strip di microtitolazione sono rivestiti con attivatori specifici della via classica. Insieme alla composizione dei tamponi di diluizione dei campioni e al livello di diluizione sierica del paziente, viene in questo modo garantita l'attivazione della sola via classica.

Durante l'incubazione del siero diluito del paziente nei pozzetti, il complemento è attivato dal rivestimento specifico. I pozzetti sono quindi lavati e la quantità di complesso C5b-9 formatasi sulla superficie piatta è rilevata con un anticorpo specifico di fosfatasi alcalina marcato per il neoantigene C5b-9 formatosi durante la formazione del complesso di attacco alla membrana (MAC).

Gli anticorpi specifici vengono individuati dopo un'ulteriore fase di lavaggio mediante incubazione con una soluzione di substrato per la fosfatasi alcalina. La quantità di attivazione del complemento si correla all'intensità del colore ed è misurata in termini di assorbanza (OD: densità ottica).

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro.

I componenti del siero umano, usati per preparare i controlli del kit, sono stati testati per la presenza di anticorpi rivolti contro il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 e di tipo 2 (HIV1&2), il virus dell'epatite C (HCV) e l'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBV) secondo metodi approvati dalla FDA e sono risultati negativi. Poiché nessun metodo di analisi può offrire la certezza assoluta dell'assenza dei virus HIV, HCV e HBV e di altri agenti infettivi, i campioni e i reagenti basati su prodotti di origine umana devono essere trattati come potenziale fonte di trasmissione di agenti infettivi.

I centri per il controllo e la prevenzione delle malattie e l'Istituto Nazionale della Sanità raccomandano l'adozione delle precauzioni previste dal livello di biosicurezza 2 durante l'uso di agenti potenzialmente infettivi.

Tutte le soluzioni contengono Proclin 300 come conservante. Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto con la cute da parte di reagenti o campioni provenienti dai pazienti. I reagenti contenenti Proclin possono essere irritanti; evitare ogni contatto con cute e occhi. In caso di contatto sciacquare abbondantemente con acqua.

La scheda tecnica di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuta in questo kit è disponibile su richiesta a Svar Life Science.

Soluzione di lavaggio (conc. 30X):**ATTENZIONE**

Contiene: Miscela di: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317: Può provocare una reazione allergica cutanea.
 H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
 P261: Evitare di respirare la polvere gli aerosol.
 P273: Non disperdere nell'ambiente.
 P280: Indossare guanti.
 P333+P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

Tampone di diluizione CP, Soluzione coniugata, Controllo negativo, Substrato pNPP:

EUH208: Contiene miscela di: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 247-500-7]; 2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1). Può provocare una reazione allergica.
 EUH210: Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta.

RACCOLTA CAMPIONI

I campioni di sangue devono essere prelevati asetticamente con prelievo venoso e il siero deve essere ottenuto seguendo le procedure standard. Si raccomanda di prelevare un minimo di 5 ml di sangue intero. Il sangue deve coagulare in provette da siero per 60-65 minuti a temperatura ambiente (20-25 °C). Centrifugare il sangue, quindi trasferire il siero privato della parte corpuscolata in una nuova provetta. I sieri devono essere trattati adeguatamente per prevenire in vitro l'attivazione del complemento. Devono essere conservati a -70 °C o a temperatura più bassa in provette adeguatamente sigillate per conservazione prolungata o per trasporto in ghiaccio secco. I campioni non devono essere congelati e scongelati più di una volta.

Evitare di usare sieri provenienti da pazienti con ittero, iperlipemia o emolizzati. Non possono essere usati sieri inattivati dal calore. Il plasma non può essere utilizzato. Il CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) fornisce raccomandazioni su come conservare i campioni di sangue (Procedure standard approvate per la manipolazione e il processamento dei campioni di sangue, H18A, 1990).

COMPONENTI DEL KIT E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

- Una griglia con pozzetti separati incolori (12x8) rivestiti con IgM umane, sigillati in un involucro di alluminio contenente un sacchetto da essiccamento.
- 2 x 35 ml di diluente CP (Dil CP), marcato in blu.
- 13 ml di anticorpo anti-C5b-9 coniugato con fosfatasi alcalina (colore blu).
- 13 ml di soluzione substrato pronta all'uso.
- 30 ml di soluzione di lavaggio concentrata 30x.
- 0,2 ml di controllo negativo (NC) contenente siero umano (da diluire allo stesso modo dei sieri di pazienti).
- Controllo positivo liofilizzato (PC) contenente siero umano liofilizzato, da ricostituire in 0,2 ml di acqua distillata, vedere "Ricostituzione del controllo positivo".
- Controllo dell'attività liofilizzata (AC) per l'applicazione semi-quantitativa, contenente siero umano essiccato congelato (origine diversa dal PC), vedere "Ricostituzione del controllo dell'attività" nella procedura per l'applicazione semi-quantitativa.
- Il controllo positivo e il controllo dell'attività devono essere conservati a - 20°C immediatamente al loro arrivo.

Notare: Il volume di ricostituzione per l'AC è indicato nel Certificato di Analisi (CoA) (XXX µl) e sull'etichetta del AC.

Tutti i reagenti del kit sono pronti all'uso ad eccezione della soluzione di lavaggio e dei controlli. I reagenti devono essere conservati a 2-8°C, fatta eccezione per il controllo positivo e il controllo dell'attività. Il controllo positivo ricostituito e il controllo dell'attività devono essere conservati a - 70°C e possono essere scongelati una volta.

MATERIALI E ATTREZZATURE NECESSARI MA NON FORNITI

- Lettore per micropiastra con filtro a 405 nm.
- Pipette di precisione con puntali monouso.
- Sistema di lavaggio per le strip, carta assorbente, provette e un timer.

PROCEDURA – APPLICAZIONE QUALITATIVA

Estrarre dalla confezione solo il numero di pozzetti necessari per la reazione e richiudere la confezione di alluminio con cura. Portare le soluzioni a temperatura ambiente (20-25°C) prima di cominciare l'analisi. Non miscelare tra loro reagenti da lotti diversi.

PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVAGGIO

Se nella fiala della soluzione di lavaggio concentrata si osserva la formazione di cristalli di sale, scaldare la fiala a bagnomaria a una temperatura di 37°C fino allo scioglimento di tutti i cristalli prima della diluizione della soluzione di lavaggio.

Diluire 30 ml di soluzione di lavaggio concentrata 30x in 870 ml di acqua distillata. Se conservata a 2-8°C, la soluzione di lavaggio diluita è stabile fino alla data di scadenza del kit.

RICOSTITUZIONE DEL CONTROLLO POSITIVO

Far depositare delicatamente tutto il materiale liofilizzato sul fondo della provetta e togliere il tappo. Aggiungere immediatamente 200 µl di acqua distillata direttamente al materiale liofilizzato. Rimettere il tappo. Lasciare la provetta nel ghiaccio per 5 minuti, quindi agitare o vortexare delicatamente di tanto in tanto fino alla completa dissoluzione. Diluire il controllo ricostituito allo stesso modo di un campione di siero del paziente. Il controllo positivo ricostituito può essere conservato fino a 4 ore prima dell'uso se conservato a 2-8°C o in ghiaccio. Deve essere conservato a - 70°C e scongelato una volta sola.

SIERO

Scongelare parzialmente i sieri congelati ponendoli per breve tempo in un bagno di acqua a 37°C e miscelando delicatamente. Dopo lo scongelamento parziale collocare le provette in un bagno di ghiaccio e lasciarle nel ghiaccio fino allo scongelamento totale. Miscelare brevemente in un miscelatore vortex.

DILUIZIONE DEL SIERO

Diluire il siero 1/101 con il diluente CP, marcato in blu, (500 µl diluente + 5 µl siero) e miscelare bene, ma delicatamente, in un vortex. Il siero diluito può essere lasciato a temperatura ambiente per un massimo di 60 minuti prima di cominciare il test.

INCUBAZIONE DEI CAMPIONI

Pipettare 100 µl per pozzetto, in duplicato, di diluente (Dil), da utilizzare come bianco, di controllo positivo (PC), di controllo negativo (NC) e di siero di paziente diluito (P) in base al diagramma seguente. Incubare per 60-70 minuti a + 37°C con il coperchio.

Via classica

	1	2	3
A	Dil CP	P2	
B	Dil CP	P2	
C	PC	ecc.	
D	PC		
E	NC		
F	NC		
G	P1		
H	P1		

DOPO L'INCUBAZIONE DEL SIERO

Svuotare i pozzetti e lavare per tre volte con 300 µl di soluzione di lavaggio, riempiendo e svuotando i pozzetti ogni volta. Dopo l'ultimo lavaggio, svuotare i pozzetti picchiando leggermente la strip su carta assorbente.

AGGIUNTA DEL CONIUGATO

Aggiungere 100 µl di coniugato ad ogni pozzetto. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (+20-25°C).

DOPO L'INCUBAZIONE DEL CONIUGATO

Lavare 3 volte come prima.

AGGIUNTA DELLA SOLUZIONE SUBSTRATO

Aggiungere 100 µl di soluzione substrato ad ogni pozzetto, incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (+20-25°C). Leggere i valori di assorbanza a 405 nm con un lettore per micropiastra. (Per bloccare la reazione può essere usato EDTA 5 mM, 100 µl/pozzetto. Leggere l'assorbanza dei pozzetti entro 60 minuti).

CALCOLO DEI RISULTATI

Sottrarre l'assorbanza del bianco (diluente) dall'assorbanza del NC, del PC e dei campioni. L'assorbanza del controllo positivo deve risultare > 1 e l'assorbanza del controllo negativo < 0,2 dopo la sottrazione del bianco.

Calcolare i valori medi di OD a 405 nm per campione, PC e NC e calcolare la % di attività del complemento come segue: $(\text{campione-NC})/(\text{PC-NC}) \times 100$. I controlli negativo e positivo sono stati concepiti per monitorare un sostanziale malfunzionamento dei reagenti. Il controllo positivo non può assicurare precisione se ci si trova al limite di sensibilità del saggio. Si consiglia ad ogni laboratorio di stabilire i propri livelli di riferimento e valori soglia per i deficit. Qualora uno dei controlli non sia entro il range rispettivo, il test deve essere considerato non valido e va ripetuto.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il CoA incluso in questo kit è specifico per il lotto e deve essere utilizzato per verificare i risultati ottenuti dal vostro laboratorio. I risultati indicati sul CoA devono essere utilizzati solo come riferimento. I risultati ottenuti dal vostro laboratorio possono differire.

LIMITI DI UTILIZZO

I livelli individuali di proteine del complemento non possono essere usati come una misura della severità della patologia, poiché essa può variare da paziente a paziente. È perciò difficile ottenere una standardizzazione assoluta dei risultati.

Non è opportuno affidarsi al solo test per decidere una terapia, ma si dovrebbero valutare i sintomi clinici ed i risultati di altri esami di laboratorio. Non si dovrebbe iniziare una terapia sulla base dei risultati del test. Inizio o cambiamenti nella terapia non dovrebbero essere basati su variazioni dei livelli di complemento, ma piuttosto su attente valutazioni cliniche.

RISULTATI ATTESI

Quando si riscontrano livelli ridotti dei componenti del complemento o della funzione del complemento, i medici ipotizzano un deficit o un processo immunologico in corso, tali da portare ad un'aumentata distruzione dei componenti e alla diminuzione dei livelli di complemento.

Per il saggio qualitativo, la distribuzione normale entro 2SD, è stata determinata tra il 69 e il 129% del controllo positivo, vedere la Tabella 1. I risultati all'interno di questo range indicano una funzionalità normale della via classica. Si raccomanda ad ogni laboratorio di confermare o stabilire i propri valori di riferimento nella popolazione su cui opera.

Un valore al di sotto del range 69-129% può indicare un aumento dell'attivazione, risultante nel consumo della capacità della via classica del complemento, oppure un'attività bassa su base genetica. Valori inferiori al 5% sono fortemente suggestivi di un deficit completo causato o da un'attivazione eccessiva o da un deficit ereditario nella via classica. Per stabilire quale(i) fattore(i) di complemento causi(ino) la riduzione dell'attività, sono necessarie ulteriori analisi delle proteine del complemento. Un risultato negativo, come il sospetto di un deficit, deve essere sempre verificato testando un nuovo campione, manipolato attentamente, per garantire che non si sia verificata una attivazione del complemento in vitro.

Livelli aumentati del complemento sono generalmente un'espressione non specifica di una risposta di fase acuta.

Il sistema Wieslab® Complement via classica può essere utile per l'individuazione dei deficit del complemento correlati alla via classica, indicati nella tabella seguente: una valutazione funzionale più completa e approfondita di tutte le vie del complemento può essere ottenuta utilizzando la schermata del sistema Wieslab® Complement.

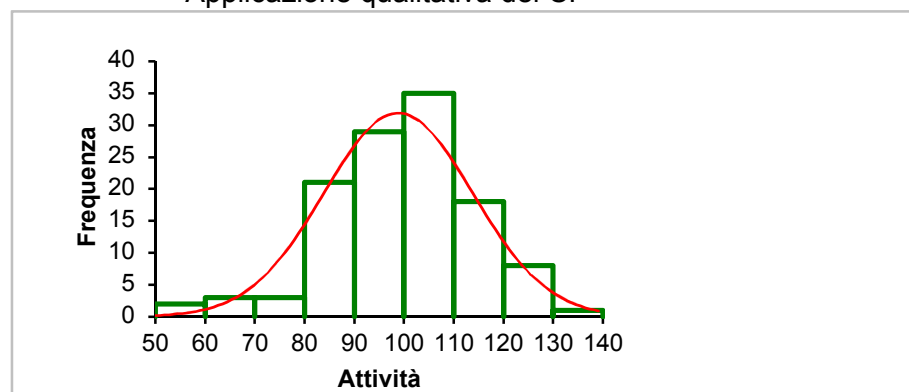
Via classica	Via lectina legante il mannosio (MBL)	Via alternativa	Possibile deficit
Positiva	Positiva	Positiva	Nessuno
Negativa	Positiva	Positiva	C1q, C1r, C1s
Positiva	Positiva	Negativa	Properdina, Fattore B, D
Positiva	Negativa	Positiva	MBL, MASP2
Negativa	Negativa	Negativa	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativa	Negativa	Positiva	C4, C2 o combinazione

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sono stati analizzati 120 sieri provenienti da donatori di sangue ed è stato calcolato il range di riferimento normale. I valori sono stati espressi in % del controllo positivo. Vedere la Figura 1 e la Tabella 1. Nessun donatore di sangue era inferiore al 40%.

FIGURA 1.

Applicazione qualitativa del CP

**TABELLA 1.**

	n	Media (%)	$\pm 2SD$ (%)	Mediana (%)
Via classica	120	99	69-129*	100

*)Questo è un calcolo statistico e non garantirà un valore soglia (cut-off) effettivo.

Si raccomanda ad ogni laboratorio di stabilire il proprio livello di riferimento e valore soglia in caso di sospetto di deficit.

TABELLA 2.

In questo saggio sono stati analizzati i sieri con deficit noti del complemento e sono stati ottenuti i seguenti risultati. Sono stati individuati nel saggio tutti i sieri deficitari e hanno prodotto valori inferiori al 5%**).

Deficit	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Numero di pazienti	5	1	1	1	2	2
Numero di sieri deficitari individuati	5	1	1	1	2	2

***) Vedere "M.A. Seelen et. al, Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. J Immunol Meth 2005, 296, 187-198", per test estesi di campioni deficitari di pazienti con applicazione qualitativa

Deplezioni	C1q	C3	C4	C5	C7
Numero di sieri depleti	2	1	1	1	1
Numero di deplezioni individuate	2	1	1	1	1

TABELLA 3. La precisione inter-dosaggio per l'applicazione qualitativa è stata determinata testando tre campioni in duplicato. I risultati sono stati ottenuti per sei sessioni diverse.

	CP P1	CP P2	CP P3
Mean value %	98	92	21
SD	4.3	3.9	1.7
CV%	4	4	8

TABELLA 4. La precisione intra-dosaggio per l'applicazione qualitativa è stata determinata testando un campione in 40 pozzetti.

Saggio	Valore medio %	SD	CV %
CP	85	2,9	3

PROCEDURA – APPLICAZIONE SEMI-QUANTITATIVA

L'applicazione semi-quantitativa differisce da quella qualitativa in quanto viene eseguita una curva di calibrazione diluendo il PC del kit ed ottenendo una curva di calibrazione con attività di 100, 75, 50, 25 e 12,5%. Estrarre dalla confezione solo il numero di pozzetti necessari per la reazione e richiudere la confezione di alluminio con cura. Portare le soluzioni a temperatura ambiente (20-25 °C) prima di cominciare l'analisi. Non miscelare tra loro reagenti da lotti diversi.

PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVAGGIO

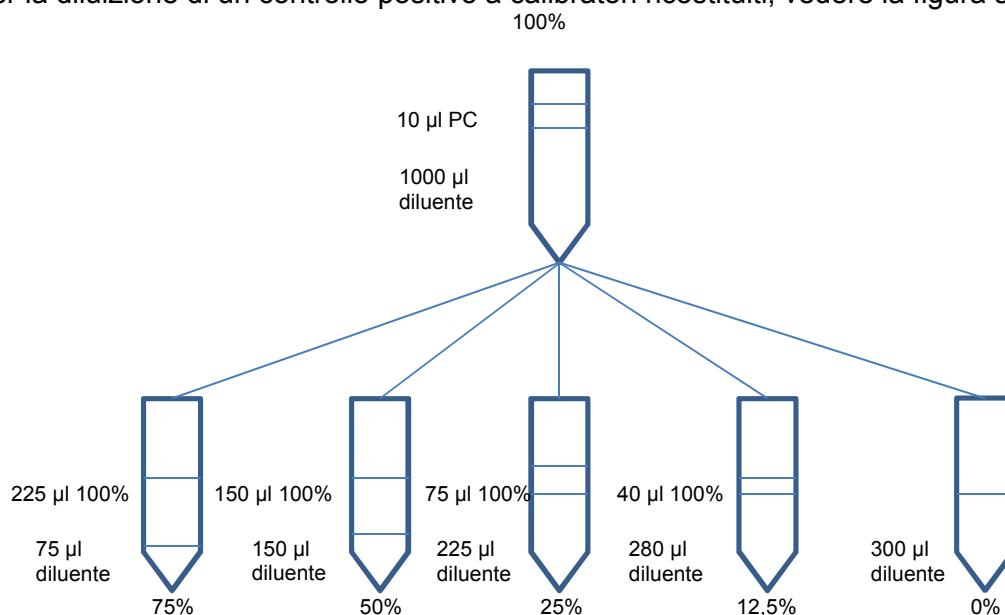
Se nella fiala della soluzione di lavaggio concentrata si osserva la formazione di cristalli di sale, scaldare la fiala a bagnomaria a una temperatura di 37°C fino allo scioglimento di tutti i cristalli prima della diluizione della soluzione di lavaggio.

Diluire 30 ml di soluzione di lavaggio concentrata 30x in 870 ml di acqua distillata. Se conservata a 2-8°C, la soluzione di lavaggio diluita è stabile fino alla data di scadenza del kit.

RICOSTITUZIONE DEL CONTROLLO POSITIVO E DILUIZIONE PER L'USO COME CALIBRATORE

Far depositare delicatamente tutto il materiale liofilizzato sul fondo della provetta e togliere il tappo. Aggiungere immediatamente 200 µl di acqua distillata direttamente al materiale liofilizzato. Rimettere il tappo. Lasciare la provetta nel ghiaccio per 5 minuti, quindi agitare o vortexare delicatamente di tanto in tanto fino alla completa dissoluzione. Il controllo positivo ricostituito può essere conservato fino a 4 ore prima dell'uso se conservato a 2-8°C o in ghiaccio. Può essere congelato a -70°C e scongelato una volta.

Per la diluizione di un controllo positivo a calibratori ricostituiti, vedere la figura seguente.



Il calibratore può essere lasciato a temperatura ambiente fino ad 1 ora prima dell'uso. Il calibratore deve essere preparato fresco e non può essere conservato a -20 °C dopo la diluizione per l'uso successivo.

RICOSTITUZIONE DEL CONTROLLO DELL'ATTIVITÀ (AC)

Far depositare delicatamente tutto il materiale liofilizzato sul fondo della provetta e togliere il tappo. Aggiungere immediatamente il volume di acqua distillata indicato nell'etichetta del CoA /AC direttamente al materiale liofilizzato. Rimettere il tappo. Lasciare riposare la provetta in ghiaccio per 5 minuti, e agitare o vortexare delicatamente fino alla completa dissoluzione. Diluire il controllo ricostituito allo stesso modo di un campione di siero del paziente. Il controllo dell'attività ricostituito può essere conservato fino a 4 ore prima dell'uso se tenuto a 2-8° °C o in ghiaccio. Può essere conservato a -70°C e scongelato una sola volta.

SIERO

Scongelare parzialmente i sieri congelati ponendoli per breve tempo in un bagno di acqua a 37°C e miscelando delicatamente. Dopo lo scongelamento parziale collocare le provette in un bagno di ghiaccio e lasciarle nel ghiaccio fino allo scongelamento totale. Miscelare brevemente in un miscelatore vortex.

DILUIZIONE DEL SIERO E DEL CONTROLLO DELL'ATTIVITÀ

Diluire il siero 1/101 con il diluente CP, marcato in blu, (500 µl diluente + 5 µl siero) e miscelare bene, ma delicatamente in un vortex. Il siero diluito e il controllo dell'attività possono essere lasciati a temperatura ambiente per un massimo di 60 minuti prima di cominciare il test.

INCUBAZIONE DEI CAMPIONI

Pipettare 100 µl/pozzetto, in duplicato, di calibratore (100%-0%), di controllo negativo (NC), di controllo dell'attività (AC) e di siero di paziente diluito (P) in base al diagramma seguente. Incubare per 60-70 minuti a + 37 °C con il coperchio.

Via classica

	1	2	3
A	100%	12,5%	P1
B	100%	12,5%	P1
C	75%	0%	P2
D	75%	0%	P2
E	50%	NC	ecc.
F	50%	NC	
G	25%	AC	
H	25%	AC	

DOPO L'INCUBAZIONE DEL SIERO

Svuotare i pozzetti e lavare per tre volte con 300 µl di soluzione di lavaggio, riempiendo e svuotando i pozzetti ogni volta. Dopo l'ultimo lavaggio, svuotare i pozzetti picchiando leggermente la strip su carta assorbente.

AGGIUNTA DEL CONIUGATO

Aggiungere 100 µl di coniugato ad ogni pozzetto. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (+20-25 °C).

DOPO L'INCUBAZIONE DEL CONIUGATO

Lavare 3 volte come prima.

AGGIUNTA DELLA SOLUZIONE SUBSTRATO

Aggiungere 100 µl di soluzione del substrato ad ogni pozzetto, incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (+20-25 °C). Leggere i valori di assorbanza a 405 nm con un lettore per micropiastra. (Per bloccare la reazione può essere usato EDTA 5 mM, 100 µl/pozzetto. Leggere l'assorbanza dei pozzetti entro 60 minuti).

CALCOLO DEI RISULTATI

Si raccomanda un adattamento della curva logistica a 4 parametri (Marquardt). Sottrarre l'assorbanza del calibratore 0% da tutti i valori OD.

L'assorbanza del calibratore 100% deve essere > 1,0, l'assorbanza del controllo negativo < 0,2 e l'attività del AC > 30%.

Nei casi nei quali i valori dei campioni ottenuti siano superiori al calibratore più alto 100%, i campioni possono essere diluiti nel rapporto 1/201 ed essere nuovamente analizzati.

Notare che in questo caso il valore di attività ottenuto deve essere regolato in base alla diluizione del campione applicata.

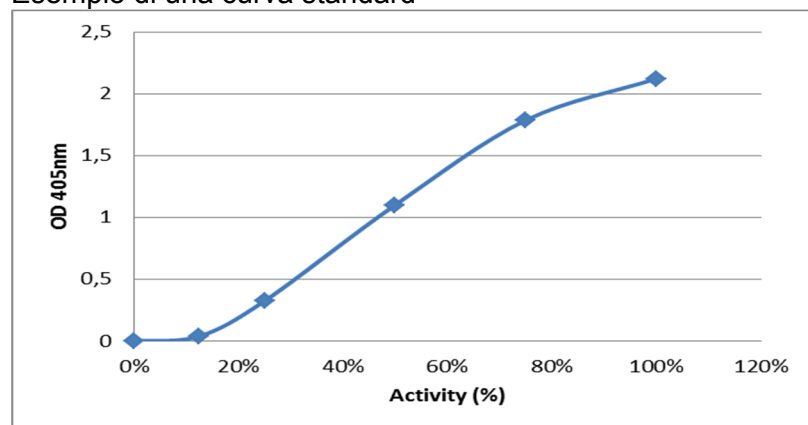
Qualora uno qualsiasi dei controlli non sia entro il proprio range, il test deve essere considerato non valido e va ripetuto.

Si consiglia ad ogni laboratorio di stabilire i propri livelli di riferimento e valori soglia per i deficit.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il CoA incluso nel kit è specifico per il lotto e deve essere utilizzato per verificare i risultati ottenuti dal nostro laboratorio. I risultati indicati sul CoA devono essere utilizzati solo come riferimento. I risultati ottenuti dal vostro laboratorio possono differire.

Esempio di una curva standard



Notare: La figura precedente mostra un esempio di curva semi-quantitativa standard e non deve essere utilizzata per l'interpretazione di campioni effettivi dei pazienti.

LIMITI DI UTILIZZO

I livelli individuali di proteine del complemento non possono essere usati come misura della severità della patologia, poiché essa può variare da paziente a paziente. È perciò difficile ottenere una standardizzazione assoluta dei risultati.

Non è opportuno affidarsi al solo test per decidere una terapia, ma si dovrebbero valutare i sintomi clinici ed i risultati di altri esami di laboratorio. Non si dovrebbe iniziare una terapia sulla base dei risultati del test. Inizio o cambiamenti nella terapia non dovrebbero essere basati su variazioni dei livelli di complemento, ma piuttosto su attente valutazioni cliniche.

RISULTATI ATTESI

Quando si riscontrano livelli ridotti dei componenti del complemento o della funzione del complemento, i medici ipotizzano un deficit o un processo immunologico in corso, tali da portare ad un'aumentata distruzione dei componenti e alla diminuzione dei livelli di complemento.

Per il saggio semi-quantitativo, la distribuzione normale entro 2SD, è stata determinata tra il 66 e il 113% del controllo positivo, vedere la Tabella 5. I risultati all'interno di questo range indicano una funzionalità normale della via classica. Si raccomanda ad ogni laboratorio di confermare o stabilire i propri valori di riferimento nella popolazione su cui opera.

Un valore al di sotto del range 66-113% può indicare un aumento dell'attivazione, risultante nel consumo della capacità della via classica del complemento oppure un'attività bassa su base genetica. Valori inferiori al 15% sono fortemente suggestivi di un deficit completo causato o da un'attivazione eccessiva o da un deficit ereditario nella via classica. Per stabilire quale(i) fattore(i) di complemento causi(ino) la riduzione dell'attività, sono necessarie ulteriori analisi delle proteine del complemento. Un risultato negativo, come il sospetto di un deficit, deve essere sempre verificato testando un nuovo campione, manipolato attentamente, per garantire che non si sia verificata una attivazione del complemento in vitro.

Livelli aumentati del complemento sono generalmente espressione non specifica di una risposta di fase acuta.

Il sistema Wieslab® Complement via classica può essere utile per l'individuazione dei deficit del complemento correlati alla via classica, indicati nella tabella seguente: una valutazione funzionale più completa e approfondita di tutte le vie del complemento può essere ottenuta utilizzando la schermata del sistema Wieslab® Complement.

Via classica	Via lectina legante il mannosio (MBL)	Via alternativa	Possibile deficit
Positiva	Positiva	Positiva	Nessuno
Negativa	Positiva	Positiva	C1q, C1r, C1s
Positiva	Positiva	Negativa	Properdina, Fattore B, D
Positiva	Negativa	Positiva	MBL, MASP2
Negativa	Negativa	Negativa	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativa	Negativa	Positiva	C4, C2 o combinazione

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sono stati analizzati 120 sieri provenienti da donatori di sangue ed è stato calcolato il range di riferimento normale. Vedere la Figura 2 e la Tabella 3. Nessun donatore di sangue è risultato inferiore al 40%.

Range di misurazione del calibratore: 12,5% - 100%

Limite di individuazione (LOD) = 8%

FIGURA 2. Controllo positivo semi-quantitativo

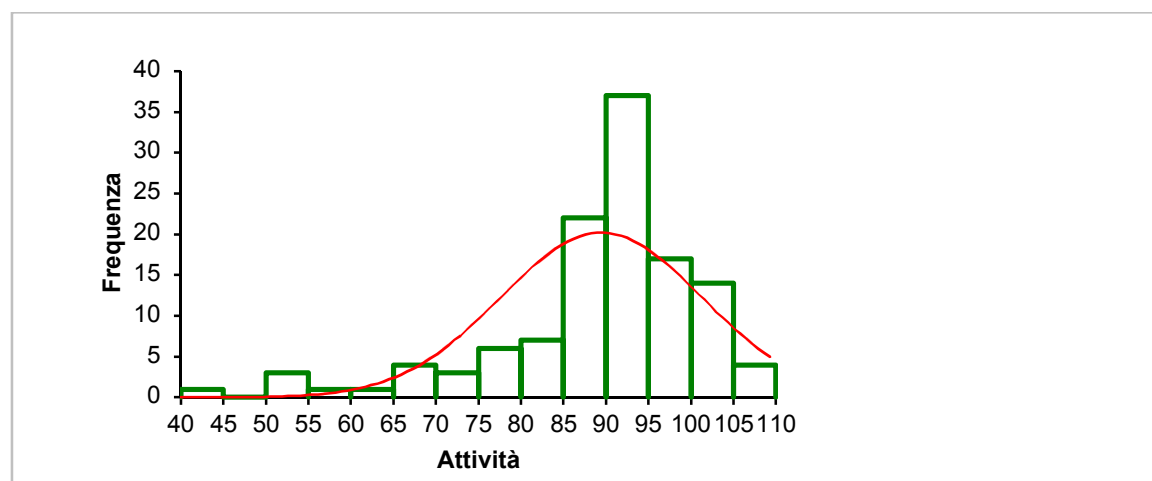


TABELLA 5.

	n	Media (%)	$\pm 2SD$ (%)	Mediana (%)
Applicazione semi-quantitativa	120	89	66-113*	92

Questo è un calcolo statistico e non garantirà un valore soglia (cut-off) effettivo. Si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire il proprio livello di riferimento e valore soglia per i deficit.

*) Compresi i campioni 1/201 che finiscono sulla curva

TABELLA 6.

Nel saggio vengono analizzati sieri con deficit noti del complemento e sieri depleti del fattore specifico del complemento. Nel saggio tutti i sieri deficitari/depleti sono risultati bassi ed hanno prodotto valori inferiori al 15%.

Deficit	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Numero di pazienti	5	1	1	1	2	2
Numero di sieri deficitari individuati	5	1	1	1	2	2

Deplezioni	C1q	C3	C4	C5	C7
Numero di sieri depleti	2	1	1	1	1
Numero di deplezioni individuate	2	1	1	1	1

TABELLA 7. La precisione inter-dosaggio per l'applicazione semi-quantitativa è stata determinata testando sette campioni in otto replicati in tre diverse occasioni.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value							
%	71	73	69	72	25	35	31
SD	9	9	6	11	1	2	2
CV%	13%	13%	9%	15%	4%	5%	5%

TABELLA 8. La precisione intra-dosaggio per l'applicazione semi-quantitativa è stata determinata testando sette campioni in otto replicati in una sola occasione.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value							
%	79	76	72	83	24	34	30
SD	10	11	6	9	0	1	1
CV%	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

TABELLA 9. L'applicazione semi-quantitativa con variazione tra un lotto e l'altro è stata determinata analizzando sette campioni in duplicato in tre lotti diversi da parte di tre persone diverse.

Sample	1	2	3	4	5	6	7
Mean value (%)	8	73	85	24	37	74	78
SD	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
%CV	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

TABELLA 10.

Il recupero della diluizione è stato determinato analizzando cinque diluizioni seriali per tre campioni diversi.

Campione	Diluizione	Attività media misurata (%)	Attività teorica (%)	Recupero della diluizione corretta %
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
Campione	Diluizione	Attività media misurata (%)	Attività teorica (%)	Recupero della diluizione corretta %
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
Campione	Diluizione	Attività media misurata (%)	Attività teorica (%)	Recupero della diluizione corretta %
3	1/100	84	84	100
	1/200	37	42	88
	1/400	21	21	100
	1/800	11	11	100
	1/1600	7	6	117












RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Problema	Possibili cause	Soluzione
Valori di controllo al di fuori del range	Temperatura, tempi o pipettamento non corretti, i reagenti non sono miscelati	Verificare la correttezza di tempi e temperatura. Ripetere il test.
	Contaminazione incrociata dei controlli	Pipettare attentamente.
	La via ottica non è pulita.	Verificare che nei pozzetti non siano presenti sporco o bolle di aria. Pulire il fondo della piastra e ripetere la lettura.
	I controlli (positivi e/o dell'attività) non sono ricostituiti correttamente. Diluizione errata del calibratore.	Verificare i controlli, effettuare una nuova dissoluzione. Controllare la preparazione ed effettuare una nuova diluizione.
Tutti i risultati del test sono negativi	Uno o più reagenti non sono aggiunti o sono aggiunti in sequenza errata.	Ricontrollare la procedura. Controllare i reagenti inutilizzati. Ripetere il test.
	La piastra rivestita con antigene è inattiva.	Controllare la formazione di umidità evidente nei pozzetti inutilizzati. Pulire il fondo della piastra e ripetere la lettura.
	Siero inattivo.	Diluire i nuovi campioni.
Tutti i risultati dei test sono gialli.	Tamponi o reagenti contaminati.	Controllare la torbidità delle soluzioni.
	Soluzione di lavaggio contaminata.	Usare un contenitore pulito. Controllare la qualità dell'acqua utilizzata per la preparazione della soluzione.
	Diluizione errata del siero.	Ripetere il test.
Precisione scarsa.	CV erogazione pipetta > 5% o campioni non miscelati.	Controllare la calibrazione della pipetta. Utilizzare una tecnica riproducibile. Evitare la presenza di bolle di aria nel puntale della pipetta.
	Il siero o i reagenti non sono sufficientemente miscelati o non sono equilibrati a temperatura ambiente.	Miscelare delicatamente, ma attentamente tutti i reagenti ed equilibrare a temperatura ambiente.
	L'aggiunta di reagenti richiede troppo tempo, variabilità degli intervalli dei tempi.	Sviluppare una tecnica uniforme e costante e utilizzare dispositivi con più puntali o un erogatore automatico per ridurre i tempi.
	Via ottica non pulita.	Verificare che non siano presenti bolle d'aria nei pozzetti. Pulire il fondo della piastra e ripetere la lettura.
	Lavaggio non uniforme, intrappolamento di bolle, residui di soluzione di lavaggio pozzetti.	Verificare che tutti i pozzetti siano pieni e che l'aspirazione sia uniforme. Distribuire il liquido sopra il livello di reagente nel pozzetto. Dopo l'ultimo lavaggio, svuotare i pozzetti picchiando leggermente la strip su carta assorbente.

REFERENCES:

- Walport M. Complement (First of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1058-66.
- Walport M. Complement (Second of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1140-44.
- Roos A et al. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol* 2003; 39:655-68.
- Fredriksson GN et al. New procedure for detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. *J Immunol Meth* 1993; 166:263-70.
- Seelen MA et al. Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Meth* 2005; 296:187-98.
- Salvador-Morales C, Sim RB. *Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials*. 2013, 1st Ed, World Scientific Publishing (ISBN: 978-4390-25-5).
- Tudoran R & Kirschfink M. *Modern Complement analysis: indications, methods and outlook*. *LaboratoriumsMedizin* 2012; 36(3):--.
- Botto M et al. Complement in human disease: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol* 2009; 46:2774-83.
- Mollnes TE et al. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 2007; 44:3838-49.
- Nilsson B, Nilsson Ekdahl K. *Complement Diagnostics: Concepts, Indications, and Practical Guidelines*. *Clin Develop Immunol*; 2012, Art ID 962702.

EXPLANATION OF SYMBOLS. L'EXPLICATION DE SYMBOLES. LA EXPLICACIÓN DE SIMBOLOS. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE. LA SPIEGAZIONE DI SIMBOLI. FORKLARING TIL SYMBOLER. SYMBOLFORKLARING. FÖRKLARINGAR TILL SYMBOLER.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numerodi lotto. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 tester.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

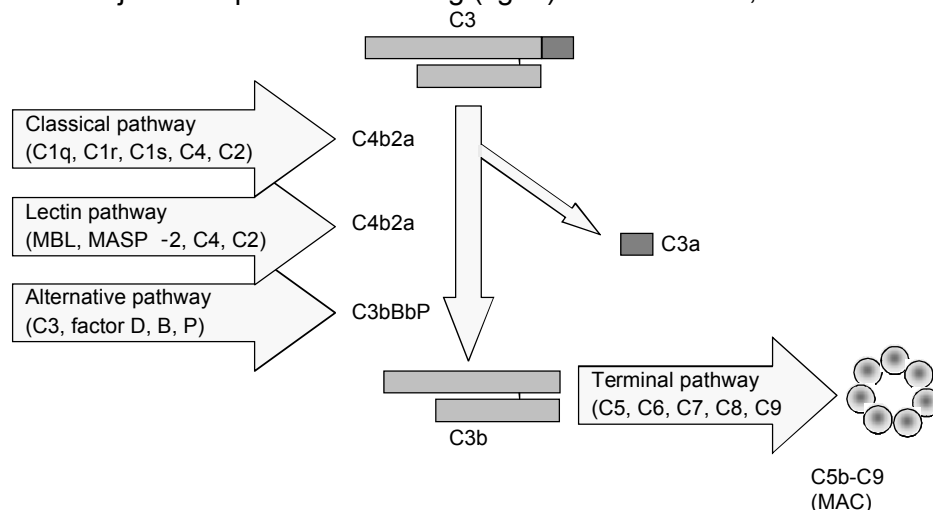
Ag	Antigen. Antigène. Antigeno. Antigen. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Conjugato. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konz. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL -	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Negativ control. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
CONTROL + LYO	Lyophilized positive control. Contrôle positif lyophilisé. Control positivo liofilizado. Lyophilisierte Positivkontrolle. Controllo positivo liofilizzato. Frysetørret positiv kontrol. Lyofilisert positiv kontroll. Frystorkad positiv kontroll.
CONTROL AC LYO	Lyophilized activity control. Contrôle d'activité lyophilisé. Control de actividad liofilizado. Lyophilisierte Aktivitätskontrolle. Controllo dell'attività liofilizzata. Frysetørret aktivitetskontrol. Lyofilisert aktivitetskontroll. Lyofiliserad aktivitetskontroll.
CH REP	Swiss Representative. Représentant Suisse. Representante suizo. Schweizer Vertreter. Rappresentante svizzero. Schweizisk repræsentant. Sveitsisk representant. Schweizisk representant

TILSIGTET BRUG

Wieslab®-komplementsystemets klassiske aktiveringsvej er en enzymimmunanalyse til kvalitativ og/eller semi-kvantitativ bestemmelse af funktionel klassisk komplementaktiveringsvej i humant serum. Analysen skal udføres af uddannet laboratoriepersonale.
KUN TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUG.

RESUMÉ OG FORKLARING

Komplementsystemet spiller en afgørende rolle i kroniske autoimmune og smitsomme sygdomme. Der er tre veje til komplementaktivering (fig. 1): den klassiske, den alternative og lektinvejen.



Nedsat komplementaktivitet gør mennesker modtagelige for tilbagevendende fulminante eller alvorlige infektioner og kan bidrage til udvikling af autoimmun sygdom. Ukorrekt aktivering af komplement bidrager til kronisk inflammation og vævsskader.

In vitro-aktivering af komplementsekvensen medfører forbrug af komplementkomponenter, som igen fører til en reduktion af deres koncentration. Bestemmelsen af komplementproteiner eller komplementaktivitet bruges således til at angive, om komplementsystemet er blevet aktiveret af en immunologisk og/eller patogen mekanisme. Der anvendes både funktionelle og immunkemiske målinger til at evaluere patienter, når der er mistanke om en komplementaktiverende sygdom eller mulighed for en nedarvet mangel. Det evaluerede niveau af komplementaktivitet, der måles med funktionelle analyser, f.eks. Wieslab®-komplementkittet, tager højde for syntesehastighed, nedbrydning og forbrug af komponenter og giver en måling af aktiveringsvejenes integritet i modsætning til immunkemiske metoder, som specifikt måler koncentrationen af forskellige komplementkomponenter.

PRINCIP FOR WIESLAB®-ANALYSEN AF KOMPLEMENTSYSTEMETS KLASSISKE AKTIVERINGSVEJ

Wieslab®-analysen af komplementsystemets klassiske aktiveringsvej kombinerer principper fra den hæmolytisk analyse for komplementaktivering med brug af mærkede antistoffer, som er specifikke for neoantigen, der er dannet som følge af komplementaktivering. Den mængde neoantigen, der dannes, er proportional med komplementaktiveringsvejenes funktionelle aktivitet.

I komplement-CP-kittet brønden på mikrotitreringsstrippene belagt med specifikke med den klassiske aktiveringsvejs aktivatører. Kombineret med sammensætningen af prøvefortyndingsbufferen og patientserummets fortyndingsniveau sikrer dette, at kun den klassiske aktiveringsvej aktiveres.

Under inkubationen af det fortyndede patientserum i brøndene aktiveres komplement af den specifikke belægning. Derefter vaskes brøndene, og mængden af C5b-9-komplekset, der er dannet på pladens overflade, detekteres med et specifikt alkalisk fosfatase-mærket antistof mod C5b-9-neoantigenet, som er dannet under dannelsen af MAC (membranangrebskompleks).

Efter endnu et vasketrin opnås der detektion af specifikke antistoffer ved inkubation med alkalisk fosfatase-substratopløsning. Mængden af komplementaktivering korrelerer med farveintensiteten og måles i form af absorbans (optisk densitet (OD)).

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER**- TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUG.**

- De humane serumkomponenter, der anvendes til klargøring af kontrollerne i kittet, er testet for forekomst af antistoffer mod human immundefektvirus 1 og 2 (HIV 1 og 2), hepatitis C (HCV) samt hepatitis B-overfladeantigen med FDA-godkendte metoder og konstateret negative. Ingen testmetode kan give fuldstændig garanti for, at HIV-, HCV- og hepatitis B-virus eller andre smittefarlige stoffer ikke er til stede, og derfor skal prøver og menneskebaserede reagenser håndteres som potentielle kilder til smittefarlige stoffer.
- Centers for Disease Control and Prevention og National Institutes of Health har anbefalet, at potentielle smittefarlige stoffer håndteres på Biosafety Level 2.
- Alle opløsninger indeholder ProClin 300 som konserveringsmiddel. Brug aldrig mundpipette, og undgå, at reagenser og patientprøver kommer i kontakt med hud. Reagenser, der indeholder, ProClin kan irritere. Undgå kontakt med hud og øjne. Skyl grundigt med vand i tilfælde af kontakt.
- Sikkerhedsdataark for alle farlige komponenter i dette kit fås på anmodning hos Svar Life Science.

-
Vaskebuffert (30x Conc.)

**ADVARSEL**

Indeholder: Blanding af: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317: Kan forårsage allergisk hudreaktion.
 H412: Skadelig for vandlevende organismer med langvarige virkninger.
 P261: Undgå indånding af spray.
 P273: Undgå udledning til miljøet.
 P280: Bær beskyttelseshandsker
 P333+313: Ved hudirritation eller udslæt: Søg lægehjælp.

Fortynderbuffer CP, Konjugat opløsning, Negativ kontrol, Substrat opløsning

EUH208 Indeholder: Blanding af: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1). Kan give en allergisk reaction
 EUH210 Sikkerhedsdatablad fås på forespørgsel.

PRØVETAGNING

Blodprøver skal tages ved hjælp af aseptisk venepunkturteknik, og serum opnås ved hjælp af standardprocedurer. Et minimum på 5 ml fuldblod anbefales. Lad blodet størkne i serumglas i 60-65 minutter ved stuetemperatur (20-25° C). Centrifuger blodprøver, og overfør cellefrit serum til et rent glas. Sera skal håndteres korrekt for at forhindre in vitro-komplementaktivering. Sera skal nedfryses ved -70° C eller derunder i forseglede glas ved længerevarende opbevaring eller transport på tøris. Prøver må ikke nedfryses og optøs mere end én gang.

Brug ikke sera, der er ikteriske, lipemiske og hæmolyserede. Varmeinaktiverede sera må ikke bruges. Plasma må ikke bruges. CLSI giver anbefalinger til opbevaring af blodprøver (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

KITKOMPONENTER OG OPBEVARING AF REAGENSER

- Én ramme med farveløse afrivelige brønde (12x8) belagt med humant IgM, forsejlet i en foliepakke med tørremiddel.
- 2 x 35 ml fortynder-CP (Dil CP), mærket med blå.
- 13 ml konjugat med alkalisk fosfatase-mærkede antistoffer mod C5b-9 (blå).
- 13 ml substratopløsning klar til brug.
- 30 ml vaskeopløsning koncentreret 30 gange.
- 0.2 ml negativ kontrol (NC) med humant serum (skal fortyndes som til et patientserumprøve).

- Frysetørret positiv kontrol (PC), som indeholder nedfrosset humant serum, der skal rekonstitueres i 0.2 ml destilleret vand – se "Rekonstituering af positiv kontrol" nedenfor.
- Frysetørret aktivitetskontrol (AC) til semikvantitativ anvendelse, som indeholder frysetørret humant serum (anden oprindelse end PC) – se "Rekonstituering af aktivitetskontrol" under proceduren for semikvantitativ anvendelse.

Den positive kontrol og aktivitetskontrollen skal opbevares ved -20° C ved ankomsten.

Bemærk: Rekonstitueringsvolumenet for AC er angivet på analysecertifikatet (CoA) (XXX µl) og på AC-etiketten.

Alle reagenser i kittet er klar til brug undtagen vaskeopløsningen og kontrollerne. Reagenserne skal opbevares ved 2-8° C undtagen den positive kontrol og aktivitetskontrollen. Den rekonstituerede positive kontrol og aktivitetskontrol skal opbevares ved -70° C og må optøs én gang.

NØDVENDIGE, MEN IKKE MEDFØLGENDE MATERIALER OG USTYR

- Mikropladelæser med filter 405 nm.
- Præcisionspipetter med engangsspidsler.
- Opvaskemaskine til strips, absorberende klude, glas og en timer.

PROCEDURE – KVALITATIV ANVENDELSE

Fjern kun det antal brønde, der skal bruges til testen, og luk aluminiumspakken grundigt til igen. Lad alle opløsninger udlignes til stuetemperatur (20-25° C) inden analysen. Bland ikke reagenser mellem lot.

KLARGØRING AF VASKEOPLØSNINGEN

Hvis der observeres saltkrystal udfælding i flasken med koncentreret vaskeopløsning, skal flasken placeres i et 37°C vandbad indtil krystallerne er opløst. Derefter fortyndes vaskeopløsningen. Fortynd 30 ml af den 30x koncentrerede vaskeopløsning i 870 ml destilleret vand. Når den opbevares ved 2-8° C er den fortyndede vaskeopløsning stabil til og med kittets udløbsdato.

REKONSTITUERING AF POSITIV KONTROL

Bank forsigtigt alt frysetørret materiale ned i bunden af glasset, og tag hættten af. Tilsæt med det samme 200 µl destilleret vand direkte til det frysetørrede materiale. Sæt hættten på igen. Lad glasset stå på is i 5 minutter, og ryst eller vortex det derefter forsigtigt, indtil indholdet er helt opløst. Fortynd den rekonstituerede kontrol på samme måde som en patientserumprøve. Den rekonstituerede positive kontrol kan opbevares i op til 4 timer før brug ved 2-8° C eller på is. Den skal opbevares ved -70° C og må optøs én gang.

SERUM

Optø frosne sera delvist ved at anbringe dem kortvarigt i et vandbad, der er 37° C varmt, og blande forsigtigt. Efter delvis optøning skal glassene med det samme anbringes i et isbad og forblive på is, indtil de er helt optøede. Bland kortvarigt på en vortexblander.

FORTYNDING AF SERUM

Fortynd serummet 1/101 med fortynder-CP, blå etikette, (500 µl fortynder + 5 µl serum), og bland grundigt men forsigtigt på en vortexblander. Det fortyndede serum må opbevares ved stuetemperatur i maks. 60 minutter inden analysen.

INKUBATION AF PRØVER

Pipettér 100 µl/brønd i to eksemplarer af fortynderen (Dil) som en blindprøve, positiv kontrol (PC), negativ kontrol (NC) og fortyndet patientserum (P) i henhold til diagrammet nedenfor. Inkuber i 60-70 minutter ved +37 °C med låg på.

Klassisk aktiveringsvej

	1	2	3
A	Dil CP	P2	
B	Dil CP	P2	
C	PC	osv.	
D	PC		
E	NC		
F	NC		
G	P1		
H	P1		

EFTER SERUMINKUBATION

Tøm brøndene, og vask dem 3 gange med 300 µl vaskeopløsning. Fyld og tøm brøndene hver gang. Efter sidste vask tømmes brøndene ved at banke strippen let på en absorberende klud.

TILSÆTNING AF KONJUGAT

Tilsæt 100 µl konjugat i hver brønd. Inkuber i 30 minutter ved stuetemperatur (+20-25° C).

EFTER KONJUGATINKUBATION

Vask 3 gange som tidligere.

Tilsætning af substratopløsning

Tilsæt 100 µl substratopløsning i hver brønd, inkuber i 30 minutter ved stuetemperatur (+20-25° C).

Aflæs absorbansen ved 405 nm på en mikropladelæser. (5 mM EDTA kan anvendes som stopopløsning,

100 µl/brønd. Aflæs brøndenes absorbans inden for 60 minutter).

BEREGNING AF RESULTAT

Træk blindprøvens (fortynderens) absorbans fra NC'ens, PC'ens og prøvernes absorbans. Den positive kontrols absorbans bør være >1.0 og den negative kontrols absorbans < 0.2 efter subtrahering af blindprøven.

Beregn de gennemsnitlige OD405nm-værdier for prøven, PC'en og NC'en, og beregn den procentuelle komplementaktivitet på følgende måde: $(\text{prøve-NC})/(\text{PC-NC}) \times 100$. Den negative og den positive kontrol er beregnet til overvågning for væsentlige reagensfejl. Den positive kontrol sikrer ikke nøjagtighed ved analysens cut-off. Det anbefales, at hvert laboratorium fastlægger sit eget referenceniveau og sin egen cut-off-værdi for mangler.

Hvis nogen af kontrollerne ikke er inden for deres respektive område, skal testen betragtes som ugyldig og gentages.

KVALITETSKONTROL

Det CoA, der følger med dette kit, er lotspecifikt og skal anvendes til verificering af de resultater, laboratoriet opnår. De resultater, der er angivet på CoA'et, er kun vejledende. Laboratoriets resultater kan afvige fra disse.

BEGRÆNSNINGER

Den enkelte patients komplementniveau kan ikke bruges som målestok for sygdomsgrad, da det kan variere fra patient til patient. Det er således svært at opnå en absolut standardisering af resultaterne. Testen bør ikke udgøre det eneste grundlag for beslutninger vedrørende klinisk behandling, men skal anvendes i kombination med kliniske symptomer og resultaterne af andre tilgængelige test. Der bør ikke påbegyndes behandling på grundlag af komplementanalyseresultatet. Påbegyndelse eller ændringer i behandlingen bør ikke baseres på ændringer i komplementniveauer alene, men snarere på omhyggelig klinisk observation.

FORVENTEDE RESULTATER

Når der konstateres reducerede niveauer af komplementkomponenter eller komplementfunktion, overvejer klinikere muligheden af en mangel eller en igangværende immunologisk proces, der fører til øget nedbrydning af komponenter og nedsatte komplementniveauer.

Den almindelige fordeling inden for 2SD er, for den kvalitative analyse, fastlagt til 69-129 % af den positive kontrol – se tabel 1. Resultater i dette område indikerer normal funktionalitet i den klassiske

aktiveringsvej. Det anbefales, at hvert laboratorium bekræfter eller fastlægger sit eget referenceområde for sin population.

En værdi under området på 69-129 % indikerer enten øget aktivering, hvilket medfører forbrug af den klassiske komplementaktiveringsvejs kapacitet, eller en genetisk bestemt lav aktivitet. Værdier under 5 % tyder kraftigt på en fuldstændig mangel, som enten skyldes for høj aktivering eller en nedarvet mangel i den klassiske aktiveringsvej. Det kræver yderligere analyser af komplementproteiner at bestemme, hvilke komplementfaktorer der forårsager den nedsatte aktivitet. Et negativt resultat, dvs. mistanke om en mangel, bør altid verificeres ved at teste en ny, omhyggeligt håndteret prøve, så det sikres, at der ikke har fundet in vitro-komplementaktivering sted. Forhøjede komplementniveauer er normalt et ikke-specifikt udtryk for en akut faserespons.

Wieslab®-komplementsystemets klassiske aktiveringsvej kan være praktisk til detektion af komplementmangler, som er relateret til de klassiske aktiveringsveje i tabellen nedenfor: Der kan opnås en mere fuldkommen og grundig funktionel vurdering af alle tre komplementaktiveringsveje ved hjælp af Wieslab® Complement system Screen.

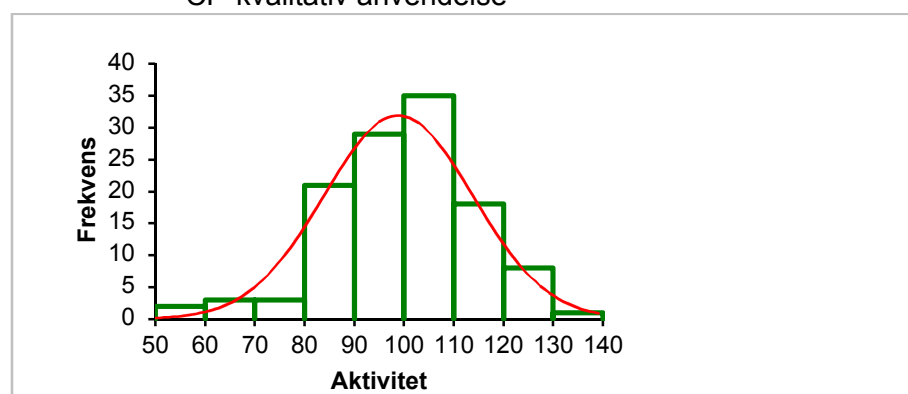
Klassisk aktiveringsvej	MBL-aktiveringsvej	Alternativ aktiveringsvej	Mulig mangel
Positiv	Positiv	Positiv	Ingen
Negativ	Positiv	Positiv	C1q, C1r, C1s
Positiv	Positiv	Negativ	Properdin, faktor B, D
Positiv	Negativ	Positiv	MBL, MASP2
Negativ	Negativ	Negativ	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativ	Negativ	Positiv	C4, C2 eller en kombination

Specifikationer for funktionsevne

Der blev testet 120 sera fra bloddonorer, og det almindelige referenceområde blev beregnet. Værdierne blev udtrykt i % af den positive kontrol. Se Figur 1 og Tabel 1. Ingen af bloddonorerne var under 40 %.

FIGUR 1.

CP-kvalitativ anvendelse



TABEL 1.

	n	Gennemsnit (%)	±2SD (%)	Median (%)
Klassisk aktiveringsvej	120	99	69-129*	100

*) Dette er en statistisk beregning og garanterer ikke et ægte cut-off.

Det anbefales, at hvert laboratorium fastlægger sit eget referenceniveau og sin egen cut-off-værdi for formodet mangel.

TABEL 2.

I analysen blev der testet sera med kendte mangler, og følgende resultater blev opnået: Alle sera med mangler blev detekteret i analysen og gav værdier på under 5 %**).

Mangel	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Antal patienter	5	1	1	1	2	2
Antal sera med mangler detekteret	5	1	1	1	2	2

***) Se "M.A. Seelen et. al, Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. J Immunol Meth 2005, 296, 187-198" vedrørende udvidede test af patientprøver med mangler, testet med kvalitativ anvendelse

Udtømning	C1q	C3	C4	C5	C7
Antal udtømte sera	2	1	1	1	1
Antal detekterede udtømninger	2	1	1	1	1

TABEL 3. Nøjagtigheden mellem analyser for kvalitativ anvendelse blev bestemt ved at teste tre prøver i to eksemplarer. Der blev opnået resultater for seks forskellige kørsler.

	CP P1	CP P2	CP P3
Mean value %	98	92	21
SD	4.3	3.9	1.7
CV%	4	4	8

TABEL 4. Nøjagtigheden inden for analyser for kvalitativ anvendelse blev bestemt ved at teste én prøve i 40 brønde.

Analyse	Gennemsnitsværdi %	SD	CV %
CP	85	2,9	3

PROCEDURE – SEMIKVANTITATIV ANVENDELSE

Den semikvantitative anvendelse er adskiller sig fra den kvalitative ved, at der via fortynding af kittets PC dannes en kalibreringskurve med 100, 75, 50, 25 og 12,5 % aktivitet. Fjern kun det antal brønde, der skal bruges til testen, og luk aluminiumspakken grundigt til igen. Lad alle opløsninger udlignes til stuetemperatur (20-25° C) inden analysen. Bland ikke reagenser mellem lot.

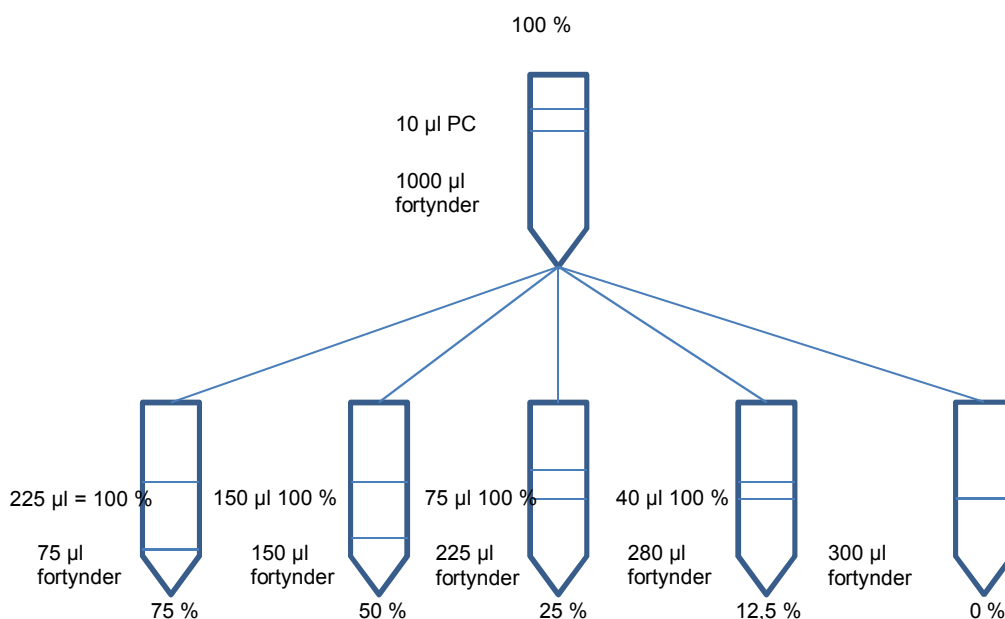
KLARGØRING AF VASKEOPLØSNINGEN

Hvis der observeres saltkrystal udfælding i flasken med koncentreret vaskeopløsning, skal flasken placeres i et 37°C vandbad indtil krystallerne er opløste. Derefter fortyndes vaskeopløsningen. Fortynd 30 ml af den 30x koncentrerede vaskeopløsning i 870 ml destilleret vand. Når den opbevares ved 2-8 °C er den fortyndede vaskeopløsning stabil til og med kittets udløbsdato.

Rekonstituering af positiv kontrol og fortynding til anvendelse som kalibrator

Bank forsigtigt alt frysetørret materiale ned i bunden af glasset, og tag hættten af. Tilsæt med det samme 200 µl destilleret vand direkte til det frysetørrede materiale. Sæt hættten på igen. Lad glasset stå på is i 5 minutter, og ryst eller vortex det derefter forsigtigt, indtil indholdet er helt opløst. Den rekonstituerede positive kontrol kan opbevares i op til 4 timer før brug ved 2-8° C eller på is. Den kan nedfryses ved -70° C og må optøs én gang.

Se billedet nedenfor vedrørende fortynding af rekonstitueret positiv kontrol til kalibratorer.



Kalibratoren kan opbevares ved stuetemperatur i op til 1 t før brug. Kalibratoren skal være frisk og må ikke opbevares ved -20°C efter fortynding til senere brug.

Rekonstituering af aktivitetskontrol (AC)

Bank forsigtigt alt frysetørret materiale ned i bunden af glasset, og tag hættten af. Tilsæt med det samme den mængde destilleret vand, der er angivet på CoA'et/AC-etiketten, direkte til det frysetørrede materiale. Sæt hættten på igen. Lad glasset være på is i 5 minutter, og ryst eller vortex det derefter forsigtigt, indtil indholdet er helt opløst. Fortynd den rekonstituerede kontrol på samme måde som en patientserumprøve. Den rekonstituerede aktivitetskontrol kan opbevares i op til 4 timer før brug ved $2-8^{\circ}\text{C}$ eller på is. Den kan opbevares ved -70°C og må optøs én gang.

SERUM

Optø frosne sera delvist ved at anbringe dem kortvarigt i et vandbad, der er 37°C varmt, og blande forsigtigt. Efter delvis optøning skal glassene med det samme anbringes i et isbad og forblive på is, indtil de er helt optøede. Bland kortvarigt på en vortexblender.

FORTYNDING AF SERUM OG AKTIVITETSKONTROLLEN

Fortynd serummet 1/101 med fortynder-CP, blå etikette, (500 µl fortynder + 5 µl serum), og bland grundigt men forsigtigt på en vortexblender. Det fortyndede serum og aktivitetskontrollen må opbevares ved stuetemperatur i maks. 60 minutter inden analysen.

INKUBATION AF PRØVER

Pipettér 100 µl/brønd i to eksemplarer af kalibratoren (100 %-0 %), negativ kontrol (NC), aktivitetskontrol (AC) og fortyndet patientserum (P) i henhold til diagrammet nedenfor. Inkuber i 60-70 minutter ved $+37^{\circ}\text{C}$ med låg på.

Klassisk aktiveringsvej

	1	2	3
A	100 %	12,5 %	P1
B	100 %	12,5 %	P1
C	75 %	0 %	P2
D	75 %	0 %	P2
E	50 %	NC	osv.
F	50 %	NC	
G	25 %	AC	
H	25 %	AC	

EFTER SERUMINKUBATION

Tøm brøndene, og vask dem 3 gange med 300 µl vaskeopløsning. Fyld og tøm brøndene hver gang. Efter sidste vask tømmes brøndene ved at banke strippen let på en absorberende klud.

TILSÆTNING AF KONJUGAT

Tilsæt 100 µl konjugat i hver brønd. Inkuber i 30 minutter ved stuetemperatur (+20-25° C).

EFTER KONJUGATINKUBATION

Vask 3 gange som tidligere.

TILSÆTNING AF SUBSTRATLOPLØSNING

Tilsæt 100 µl substratopløsning i hver brønd, inkuber i 30 minutter ved stuetemperatur (+20-25° C). Aflæs absorbansen ved 405 nm på en mikropladelæser. (5 mM EDTA kan anvendes som stopopløsning, 100 µl/brønd. Aflæs brøndenes absorbans inden for 60 minutter).

BEREGNING AF RESULTAT

Kurvetilpasset logistik med 4 parametre (Marquardt) anbefales. Træk 0 %-kalibratorens absorbans fra alle OD-værdier.

100 %-kalibratorens absorbans bør være > 1.0, NC-absorbansen < 0.2 og AC-aktiviteten > 30 %.

I tilfælde, hvor de opnåede prøvевærdier er højere end den højeste 100 %-kalibrator, kan prøverne fortyndes 1/201 og gentestes.

Bemærk, at den opnåede aktivitsværdi i dette tilfælde skal justeres i overensstemmelse med den anvendte prøvefortynding.

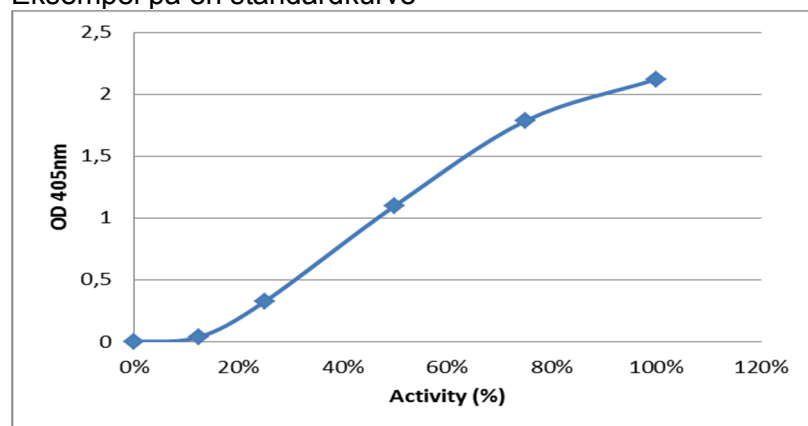
Hvis nogen af kontrollerne ikke er inden for deres respektive område, skal testen betragtes som ugyldig og gentages.

Det anbefales, at hvert laboratorium fastlægger sit eget referenceniveau og sin egen cut-off-værdi for mangler.

KVALITETSKONTROL

Det CoA, der følger med kittet, er lottspecifikt og skal anvendes til verificering af de resultater, laboratoriet opnår. De resultater, der er angivet på CoA'et, er kun vejledende. Laboratoriets resultater kan afvige fra disse.

Eksempel på en standardkurve



Bemærk: Figuren ovenfor viser et eksempel på en semikvantitativ standardkurve og må ikke anvendes til fortolkning af faktiske patientprøver.

BEGRÆNSNINGER

Den enkelte patients komplementniveau kan ikke bruges som målestok for sygdomsgrad, da det kan variere fra patient til patient. Det er således svært at opnå en absolut standardisering af resultaterne. Testen bør ikke udgøre det eneste grundlag for beslutninger vedrørende klinisk behandling, men skal anvendes i kombination med kliniske symptomer og resultaterne af andre tilgængelige test. Der bør ikke påbegyndes behandling på grundlag af komplementanalyseresultatet. Påbegyndelse eller ændringer i behandlingen bør ikke baseres på ændringer i komplementniveauer alene, men snarere på omhyggelig klinisk observation.

FORVENTEDE RESULTATER

Når der konstateres reducerede niveauer af komplementkomponenter eller komplementfunktion, overvejer klinikere muligheden af en mangel eller en igangværende immunologisk proces, der fører til øget nedbrydning af komponenter og nedsatte komplementniveauer.

Den almindelige fordeling inden for 2SD er, for den kvantitative analyse, fastlagt til 66-113 % af den positive kontrol – se tabel 5. Resultater i dette område indikerer normal funktionalitet i den klassiske aktiveringsvej. Det anbefales, at hvert laboratorium bekræfter eller fastlægger sine egne referenceområder for sin population.

En værdi under området på 66-113 % indikerer enten øget aktivering, hvilket medfører forbrug af den klassiske komplementaktiveringsvejs kapacitet, eller en genetisk bestemt lav aktivitet.

Værdier under 15 % tyder kraftigt på en fuldstændig mangel, som enten skyldes for høj aktivering eller en nedarvet mangel i den klassiske aktiveringsvej. Det kræver yderligere analyser af komplementproteiner at bestemme, hvilke komplementfaktorer der forårsager den nedsatte aktivitet.

Et negativt resultat, dvs. mistanke om en mangel, bør altid verificeres ved at teste en ny, omhyggeligt håndteret prøve, så det sikres, at der ikke har fundet in vitro-komplementaktivering sted.

Forhøjede komplementniveauer er normalt et ikke-specifikt udtryk for en akut faserespons.

Wieslab®-komplementsystemets klassiske aktiveringsvej kan være praktisk til detektion af komplementmangler, som er relateret til de klassiske aktiveringsveje i tabellen nedenfor: Der kan opnås en mere fuldkommen og grundig funktionel vurdering af alle tre komplementaktiveringsveje ved hjælp af Wieslab® Complement system Screen.

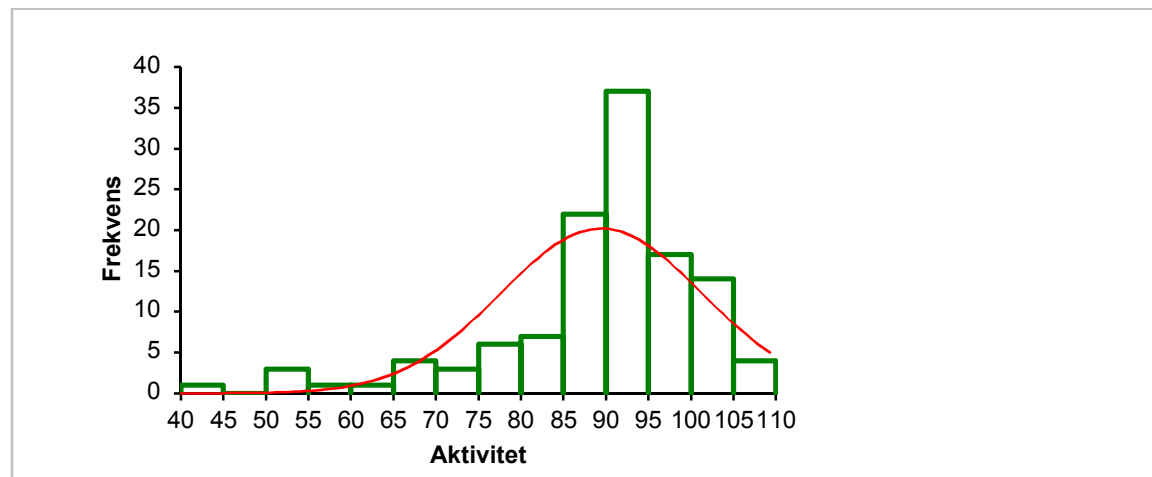
Klassisk aktiveringsvej	MBL-aktiveringsvej	Alternativ aktiveringsvej	Mulig mangel
Positiv	Positiv	Positiv	Ingen
Negativ	Positiv	Positiv	C1q, C1r, C1s
Positiv	Positiv	Negativ	Properdin, faktor B, D
Positiv	Negativ	Positiv	MBL, MASP2
Negativ	Negativ	Negativ	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativ	Negativ	Positiv	C4, C2 eller en kombination

SPECIFIKATIONER FOR FUNKTIONSEVNE

Der blev testet 120 sera fra bloddonorer, og det almindelige referenceområde blev beregnet. Se Figur 2 og Tabel 3. Ingen af bloddonorerne var under 40 %.

Måleområde for kalibrator: 12,5 % - 100 %

Detektionsgrænse (LOD) = 8 %

FIGUR 2. CP-semikvantitativ**TABEL 5.**

	n	Gennemsnit (%)	±2SD (%)	Median (%)
Semikvantitativ anvendelse	120	89	66-113*	92

Dette er en statistisk beregning og garanterer ikke et ægte cut-off. Det anbefales, at hvert laboratorium fastlægger sit eget referenceniveau og sin egen cut-off-værdi for mangel.

*) Herunder prøver, der er fortyndet 1/201 for at komme med på kurven

TABEL 6.

Der blev testet sera med kende komplementmangler og sera med specifik komplementfaktor i denne analyse. Alle udtømte sera/sera med mangler blev detekteret i analysen og gav værdier på under 15 %.

Mangel	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Antal patienter	5	1	1	1	2	2
Antal sera med mangler detekteret	5	1	1	1	2	2

Udtømning	C1q	C3	C4	C5	C7
Antal udtømte sera	2	1	1	1	1
Antal detekterede udtømminger	2	1	1	1	1

TABEL 7. Nøjagtigheden mellem analyser for semikvantitativ anvendelse blev bestemt ved at teste syv prøver i otte replikater ved tre forskellige lejligheder.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value							
%	71	73	69	72	25	35	31
SD	9	9	6	11	1	2	2
CV%	13%	13%	9%	15%	4%	5%	5%

TABEL 8. Nøjagtigheden inden for analyser for semikvantitativ anvendelse blev bestemt ved at teste syv forskellige prøver i otte replikater ved én lejlighed.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value							
%	79	76	72	83	24	34	30
SD	10	11	6	9	0	1	1
CV%	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

TABEL 9. Variationen mellem batches for semikvantitativ anvendelse blev bestemt ved at teste syv prøver i to eksemplarer på tre forskellige batches af tre forskellige personer.

Sample	1	2	3	4	5	6	7
Mean value (%)	8	73	85	24	37	74	78
SD	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
%CV	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

TABEL 10.

Genfinding af fortynding blev bestemt ved at teste fem seriefortyndinger for tre forskellige prøver.

Prøve	Fortynding	Gennemsnitlig målt aktivitet (%)	Teoretisk aktivitet (%)	Fortyndingskorrigeret % genfinding
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
Prøve	Fortynding	Gennemsnitlig målt aktivitet (%)	Teoretisk aktivitet (%)	Fortyndingskorrigeret % genfinding
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
Prøve	Fortynding	Gennemsnitlig målt aktivitet (%)	Teoretisk aktivitet (%)	Fortyndingskorrigeret % genfinding
3	1/100	84	84	100
	1/200	37	42	88
	1/400	21	21	100
	1/800	11	11	100
	1/1600	7	6	117












FEJLFINDING

Problem	Mulige årsager	Opløsning
Kontrolværdier uden for området	Forkert temperatur, timing eller pipettering, ublandede reagenser	Kontrollér, at tidspunkt og temperatur var korrekte. Gentag testen.
	Krydskontaminering af kontroller	Pipettér omhyggeligt.
	Den optiske bane er ikke ren.	Kontrollér, om der er snavs eller luftbobler i brøndene. Tør pladens bund af, og aflæs igen.
	Kontrollerne (den positive kontrol og/eller aktivitetskontrollen) er ikke korrekt rekonstituerede. Ukorrekt fortynding af kalibrator.	Kontrollér kontrollerne, opløs en ny. Kontrollér klargøringen, og foretag en ny fortynding.
Alle testresultater er negative	Ét eller flere reagenser er ikke tilsat, eller de er tilsat i forkert rækkefølge.	Kontrollér proceduren igen. Kontrollér, om der er ubrugte reagenser. Gentag testen.
	Antigenbelagt plade er inaktiv.	Kontrollér, om der er tydelig fugt i ubrugte brønde. Tør pladens bund af, og aflæs igen.
	Serum inaktivt.	Fortynd nye prøver.
Alle testresultater er gule.	Kontaminerede buffere eller reagenser.	Kontrollér alle opløsninger for uklarhed.
	Vaskeopløsningen er kontamineret.	Brug en ren beholder. Kontrollér kvaliteten af det vand, der bruges til klargøring af opløsningen.
	Ukorrekt fortynding af serum.	Gentag testen.
Ringe nøjagtighed.	Pipettetilførsels-CV >5 %, eller ublandede prøver.	Kontrollér kalibreringen af pipetten. Anvend en genskabelig teknik. Undgå luftbobler i pipettespidsen.
	Serum eller reagenser er ikke blandet tilstrækkeligt eller ikke udlignet til stuetemperatur.	Bland alle reagenser forsigtigt men grundigt, og udlign til stuetemperatur.
	Tilsætning af reagenser tager for lang tid, uoverensstemmelse i tidsintervaller.	Udarbejd en ensartet teknik, og anvend en enhed flere spidser eller en automatisk dispenser for at spare tid.
	Den optiske bane er ikke ren.	Kontrollér, om der er luftbobler i brøndene. Tør pladens bund af, og aflæs igen.
	Uensartet vask, indespærrede bobler, vaskeopløsningsrester i brøndene.	Kontrollér, at alle brønde er fyldt og aspireret ensartet. Dispensér væske over reagensets niveau i brønden. Efter sidste vask tømmes brøndene ved at banke strippen let på en absorberende klud.

REFERENCES:

- Walport M. Complement (First of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1058-66.
- Walport M. Complement (Second of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1140-44.
- Roos A et al. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol* 2003; 39:655-68.
- Fredriksson GN et al. New procedure for detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. *J Immunol Meth* 1993; 166:263-70.
- Seelen MA et al. Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Meth* 2005; 296:187-98.
- Salvador-Morales C, Sim RB. *Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials*. 2013, 1st Ed, World Scientific Publishing (ISBN: 978-4390-25-5).
- Tudoran R & Kirschfink M. *Modern Complement analysis: indications, methods and outlook*. *LaboratoriumsMedizin* 2012; 36(3):--.
- Botto M et al. Complement in human disease: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol* 2009; 46:2774-83.
- Mollnes TE et al. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 2007; 44:3838-49.
- Nilsson B, Nilsson Ekdahl K. *Complement Diagnostics: Concepts, Indications, and Practical Guidelines*. *Clin Develop Immunol*; 2012, Art ID 962702.

EXPLANATION OF SYMBOLS. L'EXPLICATION DE SYMBOLES. LA EXPLICACIÓN DE SIMBOLOS. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE. LA SPIEGAZIONE DI SIMBOLI. FORKLARING TIL SYMBOLER. SYMBOLFORKLARING. FÖRKLARINGAR TILL SYMBOLER.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numerodi lotto. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
 96	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 tester.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno. Antigen. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Conjugato. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konz. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL -	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Negativ control. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
CONTROL + LYO	Lyophilized positive control. Contrôle positif lyophilisé. Control positivo liofilizado. Lyophilisierte Positivkontrolle. Controllo positivo liofilizzato. Frysetørret positiv kontrol. Lyofilisert positiv kontroll. Frystorkad positiv kontroll.
CONTROL AC LYO	Lyophilized activity control. Contrôle d'activité lyophilisé. Control de actividad liofilizado. Lyophilisierte Aktivitätskontrolle. Controllo dell'attività liofilizzata. Frysetørret aktivitetskontrol. Lyofilisert aktivitetskontroll. Lyofiliserad aktivitetskontroll.
CH REP	Swiss Representative. Représentant Suisse. Representante suizo. Schweizer Vertreter. Rappresentante svizzero. Schweizisk repræsentant. Sveitsisk representant. Schweizisk representant

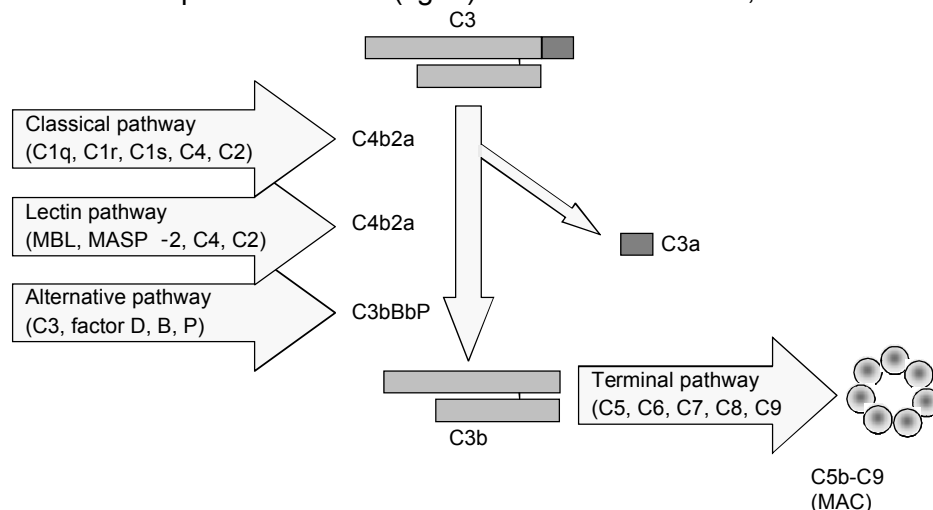
TILTENKT BRUK:

Wieslab® Complement-system klassisk vei er en enzymatisk immunoanalyse for kvalitativ og/eller semikvantitativ påvisning av funksjonell, klassisk komplementvei i humant serum. Analysen skal utføres av fagutdannet laboratoriepersonell.

KUN FOR BRUK TIL IN VITRO-DIAGNOSTIKK

SAMMENDRAG OG KONKLUSJONER

Komplementsystemet spiller en vesentlig rolle i kronisk, autoimmun og smittefarlig sykdom. Det er tre veier for komplementaktivitet (fig. 1): den klassiske veien, den alternative veien og lektinveien.



Nedsatt komplementaktivitet får mennesker til å bli mottakelige for gjentakende fulminante eller alvorlige infeksjoner, og kan bidra til utvikling av autoimmune sykdommer. Feilaktig aktivering av komplementet bidrar til kronisk betennelse og vevskader.

In vitro-aktivering av komplementsekvensen fører til fortæring av komplementkomponenter, som i sin tur fører til at deres konsentrasjoner reduseres. Derfor blir påvisningen av komplementproteiner eller komplementaktivitet brukt som indikasjon på om komplementsystemet er blitt aktivert av en immunologisk og/eller patogen mekanisme. Både funksjonelle og immunkjemiske komplementmålinger brukes for å evaluere pasientene når det foreligger mistanke om komplementaktiverende sykdom eller en arvelig mangel er mulig. Nivået av komplementaktivitet som evalueres gjennom funksjonsanalyser, for eksempel Wieslab® Complement-kitet, tar hensyn til graden av syntese, nedbrytning og fortæring av komponentene og tilbyr en måling av veienes integritet i motsetning til immunkjemiske metoder som spesifikt måler konsentrasjonen av ulike komplementkomponenter.

PRINSIPPET FOR ANALYSE MED WIESLAB® COMPLEMENT KLASSISK VEI

Analyse med Wieslab® Complement klassisk vei kombinerer prinsippene i hemolytisk analyse for komplementaktivering med bruken av merkede antistoffer, spesifikke for neoantigen som produseres som resultat av komplementaktivering. Mengden neoantigener som genereres er proporsjonal med komplementveienes funksjonelle aktivitet.

I Complement CP-kitet er brønnene til mikrotitreringsstrimlene belagt med den klassiske veiens spesifikke aktivatorer. I kombinasjon med prøvefortynningsbufferens sammensetning og pasientens nivå av fortynnet serum sikrer dette at det kun er den klassiske veien som aktiveres.

Mens det fortyndede pasientserumet inkuberes i brønnene, aktiveres komplementet av det spesifikke belegget. Deretter vaskes brønnene, og mengden C5b-9-kompleks som dannes på platens overflate registreres med et spesifikt alkalisk fosfatamerket antistoff til C5b-9-neoantigenet som dannes under MAC (Membrane Attack Complex)-formasjonen.

Etter et nytt vasketrinn oppnås registrering av spesifikke antistoffer gjennom inkubasjon med løsning av alkalisk fosfatasesubstrat. Mengden komplementaktivering korrelerer med fargeintensiteten og måles i absorbansvolum (optisk densitet (OD)).

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER**- FOR IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK.**

- De humane serumkomponentene som brukes i klargjøringen av kontrollene i kitet er testet for nærvær av antistoffer mot humant immunsviktivirus 1 og 2 (HIV 1 og 2), hepatitt C (HCV) og hepatitt B overflateantigen gjennom metoder godkjent av FDA, og påvist negative. Siden ingen testmetoder kan gi garanterte fullstendig at HIV-, HCV-, hepatitt B-virus eller andre smittestoffer er fraværende, skal prøver og humanbaserte reagenser håndteres som potensielt smittefarlige stoffer.
- Sentre for sykdomskontroll og forebygging og nasjonale helseinstitutter anbefaler at potensielle smittestoffer skal håndteres ved biosikkerhetsnivå 2.
- Alle løsninger som inneholder ProClin 300 som konserveringsmiddel. Du må aldri pipettere med munnen eller tillate at reagenser eller pasientprøver kommer i kontakt med huden. Reagenser som inneholder ProClin kan virke irriterende. Unngå kontakt med hud og øyne. I tilfelle kontakt, skyl med rikelig med vann.
- Sikkerhetsdatablad for alle farlige komponenter som dette kitet inneholder er tilgjengelige på forespørsel fra Svar Life Science.

Vaskeløsning (30x Conc.)**ADVARSEL**

Inneholder: Reaksjonsmasse av: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Kan forårsage allergisk hudreaktion
 H412 Skadelig for vannlevende organismer med langvarige effekter.
 P261 Unngå innånding av spray.
 P273 Avoid release to the environment.
 P280 Bruk vernehansker.
 P333 + P313 Ved hudirritation eller udslæt: Søg lægehjælp

Fortynnings-CP, Konjugat, Negativ kontroll, Substratløsning

EUH208 Inneholder: Reaksjonsmasse av: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1) Kan gi en allergisk reaksjon
 EUH210 Sikkerhetsdatablad tilgjengelig på forespørsel.

PRØVETAKING

Blodprøver skal samles inn med aseptisk venepunksjon og hentet serum ved hjelp av standardprosedyrer. Det anbefales minst 5 mL helblod. La blodet koagulere i serumrør i 60-65 minutter ved romtemperatur (20-25 °C). Sentrifuger blodprøvene, og overfør cellefritt serum til et rent rør. Sera må håndteres korrekt for å hindre in vitro komplementaktivering. Sera kan fryses ved -70 °C eller lavere i tette, forseglede rør for langvarig oppbevaring eller for transport på tørris. Prøvene skal ikke fryses og tines mer enn én gang.

Ikke bruk sera som er ikteriske, lipemiske eller hemolysert. Varme-inaktiverte prøver kan ikke brukes. Plasma kan ikke brukes. CLSI gir anbefalinger for oppbevaring av blodprøver (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

KOMPONENTER I KITET OG OPPBEVARING AV REAGENSER

- Et Brett med fargeløse avbrytbare brønner (12x8) belagt med humant IgM, forseglet i en foliepakke med en tørkepose.
- 2 x 35 mL fortynningsmiddel CP (Dil CP), merket blått.
- 13 mL konjugat som inneholder alkalisk fosfatasemerke antistoffer mot C5b-9 (blå farge).
- 13 mL substratløsning, klar til bruk.
- 30 mL vaskeløsning, 30x konsentrert.
- 0.2 mL negativ kontroll (NC) som inneholder humant serum (skal fortynnes som for pasientserumsprøve).
- Lyofilisert positiv kontroll (PC) som inneholder frysetørket humant serum, skal rekonstitueres i 0.2 mL destillert vann, se "Rekonstituering av positiv kontroll" nedenfor.
- Lyofilisert aktivitetskontroll (AC) for semikvantitativ bruk som inneholder frysetørket humant serum (annen opprinnelse enn PC), se "Rekonstituering av aktivitetskontroll" under prosedyre for semikvantitativ bruk.

Den positive kontrollen og aktivitetskontrollen skal oppbevares ved -20 °C etter levering.

Merk: Rekonstitueringsvolumet for AC er angitt i analysesertifikatet (CoA) (XXX µl) og på AC-etiketten. Alle reagenser i kitet er klare til bruk, unntatt vaskeløsningen og kontrollene. Reagensene skal oppbevares ved 2-8 °C, unntatt den positive kontrollen og aktivitetskontrollen. Den rekonstituerte positive kontrollen og aktivitetskontrollen skal oppbevares ved -70 °C og kan tines én gang.

MATERIALER ELLER UTSTYR SOM ER NØDVENDIG, MEN SOM IKKE MEDFØLGER

- Mikroplateleser med filter 405 nm.
- Presisjonspipetter med engangsspisser.
- Vasker for strimler, absorberende papir, rør og en tidtaker.

PROSEDYRE – KVALITATIV APPLIKASJON

Ta kun ut det antallet brønner som trengs for testing, og forsegle aluminiumspakken godt igjen. La alle løsningene romtempereres (20-25 °C) før analysen. Ikke bland reagenser fra ulike partier.

KLARGJØRING AV VASKELØSNING

Dersom det observeres saltkrystaller i flasken med konsentrert vaskeløsning, plasseres flasken i et vannbad på 37°C til krystallene har løst seg opp før vaskeløsningen fortynnes. Fortynn 30 mL av den 30x konsentrerte vaskeløsningen i 870 mL destillert vann. Ved oppbevaring ved 2-8 °C er den fortynnede vaskeløsningen stabil frem til utløpsdatoen på kitet.

REKONSTITUERING AV POSITIV KONTROLL

Bank alt lyofilisert materiale forsiktig ned til bunnen av ampullen, og fjern hetten. Tilsett øyeblikkelig 200 µL destillert vann direkte i det lyofiliserte materialet. Sett hetten på igjen. La ampullen stå på is i 5 minutter før den ristes eller roteres noen ganger, til alt er helt oppløst. Fortynn den rekonstituerte kontrollen på samme måte som en pasientserumsprøve. Den rekonstituerte positive kontrollen kan oppbevares i opptil 4 timer før bruk hvis den holdes ved 2-8 °C eller på is. Den skal oppbevares ved -70° C og kan tines én gang.

SERUM

La frosne sera tine delvis ved å sette dem i et vannbad på 37 °C i en liten stund, og rør forsiktig om. Etter delvis tining, sett rørene øyeblikkelig i et isbad og la dem ligge på is til de er fullstendig tint. Bland raskt på en vorteksblender.

FORTYNNING AV SERUM

Fortynn serumet 1/101 med Diluent CP, blå etikett, (500 µL diluent + 5 µL serum) og bland grundig, men forsiktig på en vorteksblender. Det fortynnede serumet kan holdes ved romtemperatur i maksimalt 60 minutter før analysen.

INKUBASJON AV PRØVER

Pipetter 100 µL/brønn i duplikat av diluent (Dil) som en blank, positiv kontroll (PC), negativ kontroll (NC) og fortynt pasientserum (P) i samsvar med diagrammet nedenfor. Inkuber i 60-70 minutter ved +37 °C med lokk.

Klassisk vei

	1	2	3
A	Dil CP	P2	
B	Dil CP	P2	
C	PC	osv.	
D	PC		
E	NC		
F	NC		
G	P1		
H	P1		

ETTER SERUMINKUBASJON

Tøm brønnene og vask 3 ganger med 300 µL vaskeløsning ved å fylle og tømme brønnene hver gang. Etter den siste vasken tømmes brønnene ved å banke strimmelen på absorberende papir.

TILSETTE KONJUGAT

Tilsett 100 µL konjugat i hver brønn. Inkuber i 30 minutter ved romtemperatur (+20-25 °C).

ETTER KONJUGATINKUBASJON

Vask 3 ganger som tidligere.

TILSETTE SUBSTRATLØSNING

Tilsett 100 µL substratløsning i hver brønn, inkuber i 30 minutter ved romtemperatur (+20-25 °C). Les absorbansen ved 405 nm på en mikroplateleser. (5 mM EDTA kan brukes som stoppeløsning, 100 µL/brønn. Les brønnenes absorbans innen 60 minutter.)

BEREGNING AV RESULTAT

Subtraher absorbansen til det blanke (fortynningsmidlet) fra absorbansene for NC, PC og prøvene. Absorbansen for den positive kontrollen skal være >1.0, og absorbansen for den negative kontrollen < 0.2 etter at det blanke er substrahert.

Beregn gjennomsnittlige OD405 nm-verdier for prøven, PC og NC, og beregn % komplementaktivitet som følger: $(\text{prøve-NC})/(\text{PC-NC}) \times 100$. De negative og positive kontrollene skal overvåke vesentlig reagenssvikt. Den positive kontrollen vil ikke sikre presisjon i analysens grenseverdier. Det anbefales at hvert laboratorium etablerer sitt eget referansenivå og sine grenseverdier for mangler.

Hvis noen av kontrollene ikke er innenfor sitt respektive område, må testen anses som ugyldig og gjentas.

KVALITETSKONTROLL

Analysesertifikatet som er inkludert i dette kitet er partispesifikt og skal brukes for å verifisere resultatene som oppnås i ditt laboratorium. Resultatene som er angitt på analysesertifikatet skal kun brukes veiledende. Resultatene som oppnås i ditt laboratorium, kan avvike.

BEGRENSNINGER

Den individuelle pasientens komplementnivå kan ikke brukes som mål på hvor alvorlig en sykdom er, siden dette kan variere fra pasient til pasient. Derfor er det vanskelig å oppnå en absolutt standardisering av resultatene.

Testen må ikke anses som eneste, pålitelige grunnlag for beslutninger om klinisk terapi, men skal brukes i kombinasjon med kliniske symptomer og resultater fra andre tilgjengelige tester. Det må ikke innledes noen behandling på grunnlag av resultatene fra komplementanalysen. Innledning eller endring av behandling skal ikke ene og alene basere seg på endringer i komplementnivåene, men heller på grundig klinisk observasjon.

FORVENTEDE RESULTATER

Hvis det oppdages reduserte nivåer av komplementkomponenter eller komplementfunksjon, skal en lege vurdere en mangel eller en pågående, immunologisk prosess som fører til økt svikt i komponenter og reduserte komplementnivåer.

For den kvalitative analysen har den normale fordelingen innen 2SD blitt fastslått til å være 69-129 % av den positive kontrollen, se tabell 1. Resultater innenfor dette området angir at den klassiske veien har normal funksjonalitet. Det anbefales at hvert laboratorium bekrefter eller etablerer egne referanseområder for den befolkningen de betjener.

En verdi under området 69-129 % angir enten økt aktivering, som fører til fortæring av kapasiteten i den klassiske komplementveien, eller en genetisk betinget lav aktivitet.

Verdier under 5 % er en sterk indikasjon på fullstendig mangel, som enten er forårsaket av overdreven aktivitet eller en arvet mangel i den klassiske veien. For å etablere hvilke(n) komplementfaktor(er) som forårsaker den reduserte aktiviteten, er det behov for ytterligere analyse av komplementproteinene. Et negativt resultat, dvs. mistanke om mangel, skal alltid verifiseres ved å teste en ny prøve, som er omhyggelig klargjort, for å sikre at det ikke utføres in vitro komplementaktivering. Økte komplementnivåer er vanligvis et uspesifikt uttrykk for en akutt fasereaksjon.

Wieslab® Complement-system klassisk vei kan være nyttig for deteksjon av komplementmangler knyttet til de klassiske veiene, som vist i tabellen nedenfor: En mer fullstendig og dyptgående funksjonell analyse av alle tre komplementveiene kan oppnås ved bruk av Wieslab® Complement system Screen.

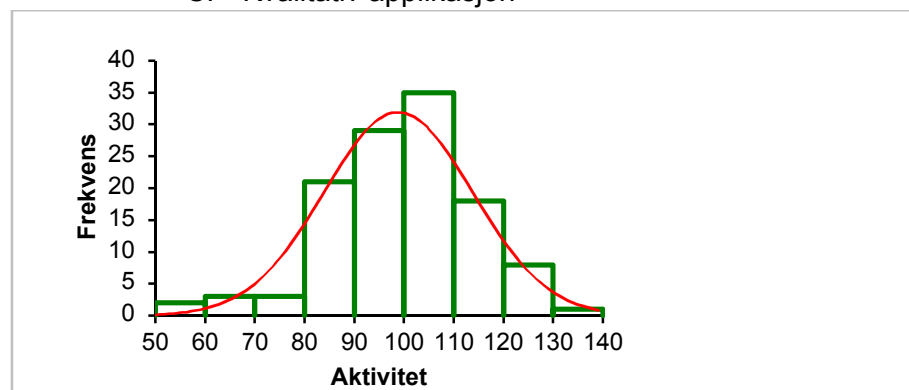
Klassisk vei	MBL-vei	Alternativ vei	Mulig mangel
Positiv	Positiv	Positiv	Ingen
Negativ	Positiv	Positiv	C1q, C1r, C1s
Positiv	Positiv	Negativ	Properdin, faktor B, D
Positiv	Negativ	Positiv	MBL, MASP2
Negativ	Negativ	Negativ	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativ	Negativ	Positiv	C4, C2 eller kombinasjon

YTELSESEGENSKAPER

120 sera fra blodgivere ble testet, og det normale området ble beregnet. Verdiene ble uttrykt i % av den positive kontrollen. Se Figur 1 og Tabell 1. Ingen blodgiver lå under 40 %.

Figur 1.

CP Kvalitativ applikasjon



Tabell 1.

	n	Gj.snitt (%)	±2SD (%)	Median (%)
Klassisk vei	120	99	69-129*	100

*) Dette er en statistisk beregning og garanterer ikke en sann grenseverdi.

Det anbefales at hvert laboratorium etablerer sitt eget referansenivå og sine grenseverdier for mistanke om mangel.

Tabell 2.

Sera med kjente komplementmangler ble testet i analysen, og følgende resultater ble oppnådd. Alle manglende sera ble registrert i analysen og ga verdier under 5 %**).

Mangel	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Antall pasienter	5	1	1	1	2	2
Registrert antall manglende sera	5	1	1	1	2	2

***) Se "M.A. Seelen et. al, Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. J Immunol Meth 2005, 296, 187-198", for utvidede tester av pasientprøver med mangler som ble testet med kvalitativ applikasjon

Utarming	C1q	C3	C4	C5	C7
Antall utarmede sera	2	1	1	1	1
Antall registrerte utarminger	2	1	1	1	1

Tabell 3. Presisjon mellom analyser for kvalitativ applikasjon ble fastslått ved å teste tre prøver i duplikat. Resultater ble oppnådd for seks forskjellige kjøring.

	CP P1	CP P2	CP P3
Mean value %	98	92	21
SD	4.3	3.9	1.7
CV%	4	4	8

Tabell 4. Presisjon mellom analyser for kvalitativ applikasjon ble fastslått ved å teste én prøve i 40 brønner.

Analyse	Gj.sn. verdi %	SD	CV %
CP	85	2,9	3

PROSEDYRE – SEMI-KVALITATIV APPLIKASJON

Den semikvantitative applikasjonen avviker fra den kvalitative ved at kalibreringskurven opprettes ved å fortynne kitets PC, som gir en kalibreringskurve med aktivitet på 100, 75, 50, 25 og 12,5 %. Ta kun ut det antallet brønner som trengs for testing, og forsegle aluminiumspakken godt igjen. La alle løsningene romtempereres (20-25 °C) før analysen. Ikke bland reagenser fra ulike partier.

KLARGJØRING AV VASKELØSNING

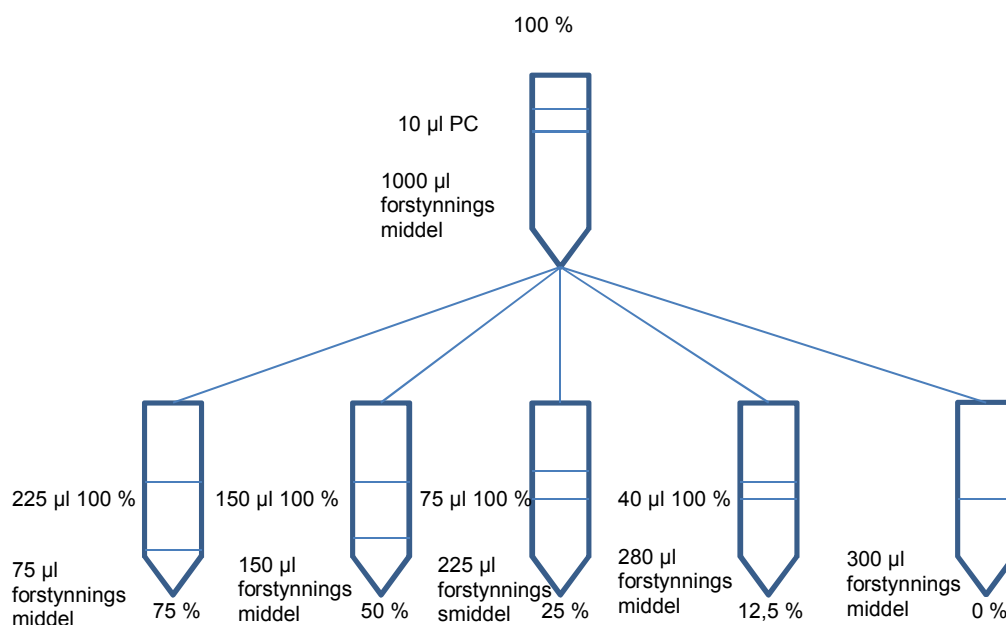
Dersom det observeres saltkrystaller i flasken med konsentrert vaskeløsning, plasseres flasken i et vannbad på 37°C til krystallene har løst seg opp før vaskeløsningen fortynnes.

Fortynn 30 mL av den 30x konsentrerte vaskeløsningen i 870 mL destillert vann. Ved oppbevaring ved 2-8 °C er den fortyndede vaskeløsningen stabil frem til utløpsdatoen på kitet.

Rekonstituering av positiv kontroll og fortykning for bruk som kalibrator

Bank alt lyofilisert materiale forsiktig ned til bunnen av ampullen, og fjern hetten. Tilsett øyeblikkelig 200 µL destillert vann direkte i det lyofiliserte materialet. Sett hetten på igjen. La ampullen stå på is i 5 minutter før den ristes eller roteres noen ganger, til alt er helt oppløst. Den rekonstituerte positive kontrollen kan oppbevares i opptil 4 timer før bruk hvis den holdes ved 2-8 °C eller på is. Den kan fryses ved -70° C og kan tines én gang.

For fortykning av rekonstituert positiv kontroll til kalibratører, se bildet nedenfor.



Kalibratoren kan bli værende ved RT i opptil 1 time før bruk. Kalibratoren må klargjøres fersk og kan ikke oppbevares ved -20°C etter fortynning for senere bruk.

REKONSTITUSJON AV AKTIVITETSKONTROLL (AC)

Bank alt lyofilisert materiale forsiktig ned til bunnen av ampullen, og fjern hetten. Tilsett øyeblikkelig det volumet med destillert vann som er angitt i analysesertifikatet/AC-etiketten, direkte i det lyofiliserte materialet. Sett hetten på igjen. La ampullen stå på is i 5 minutter før den ristes eller roteres forsiktig noen ganger, til alt er helt oppløst. Fortynn den rekonstituerte kontrollen på samme måte som en pasientserumprøve. Den rekonstituerte aktivitetsskontrollen kan oppbevares i opptil 4 timer før bruk hvis den holdes ved $2-8^{\circ}\text{C}$ eller på is. Den kan oppbevares ved -70°C og kan tines én gang.

Serum

La frosne sera tine delvis ved å sette dem i et vannbad på 37°C i en liten stund, og rør forsiktig om. Etter delvis tining, sett rørene øyeblikkelig i et isbad og la dem ligge på is til de er fullstendig tint. Bland raskt på en vorteksblender.

FORTYNNING AV SERUM OG AKTIVITETSKONTROLLEN

Fortynn serumet 1/101 med Diluent CP, blå etikett, ($500\ \mu\text{L}$ diluent + $5\ \mu\text{L}$ serum) og bland grundig, men forsiktig på en vorteksblender. Det fortyndede serumet og aktivitetsskontrollen kan holdes ved romtemperatur i maks. 60 minutter før analysen.

INKUBASJON AV PRØVER

Pipetter $100\ \mu\text{L}$ /brønn i duplikat av kalibrator (100%-0%), negativ kontroll (NC), aktivitetsskontroll (AC) og fortyndet pasientserum (P) i samsvar med diagrammet. Inkuber i 60-70 minutter ved $+37^{\circ}\text{C}$ med lokk.

Klassisk vei

	1	2	3
A	100 %	12,5 %	P1
B	100 %	12,5 %	P1
C	75 %	0 %	P2
D	75 %	0 %	P2
E	50 %	NC	osv.
F	50 %	NC	
G	25 %	AC	
H	25 %	AC	

ETTER SERUMINKUBASJON

Tøm brønnene og vask 3 ganger med 300 µL vaskeløsning ved å fylle og tømme brønnene hver gang. Etter den siste vasken tømmes brønnene ved å banke strimmelen på absorberende papir.

TILSETTE KONJUGAT

Tilsett 100 µL konjugat i hver brønn. Inkuber i 30 minutter ved romtemperatur (+20-25 °C).

ETTER KONJUGATINKUBASJON

Vask 3 ganger som tidligere.

TILSETTE SUBSTRATLØSNING

Tilsett 100 µL substratløsning i hver brønn, inkuber i 30 minutter ved romtemperatur (+20-25 °C). Les absorbansen ved 405 nm på en mikroplateleser. (5 mM EDTA kan brukes som stoppeløsning, 100 µL/brønn. Les brønnenes absorbans innen 60 minutter.)

BEREGNING AV RESULTAT

Kurve passende til 4-parameterlogistikk (Marquardt) anbefales. Subtraher absorbansen av 0 % - kalibratoren fra alle OD-verdiene.

Absorbansen av 100 %-kalibratoren skal være > 1,0, NC-absorbansen < 0,2 og AC-aktiviteten >30 %. I tilfeller hvor oppnådde prøveverdier er høyere enn den høyeste kalibratoren på 100 %, kan prøvene fortynnes 1/201 og testes på nytt.

Merk at den oppnådde aktivitetsverdien i dette tilfellet bør justeres i samsvar med den prøvefortynneren som brukes.

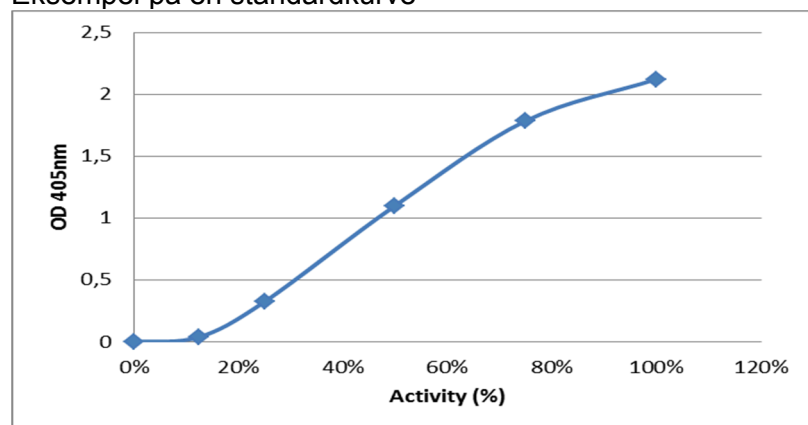
Hvis noen kontroller ikke er innenfor sine respektive områder, må testen anses som ugyldig og deretter gjentas.

Det anbefales at hvert laboratorium etablerer sitt eget referansenivå og sine grenseverdier for mangler.

KVALITETSKONTROLL

Analysesertifikatet som er inkludert i kitet er partispesifikt og skal brukes for å verifisere resultatene som ble oppnådd i vårt laboratorium. Resultatene som er angitt på analysesertifikatet skal kun brukes veiledende. Resultatene som oppnås i ditt laboratorium, kan avvike.

Eksempel på en standardkurve



Merk: Figuren over viser et eksempel på en semikvantitativ standardkurve og skal ikke brukes til faktisk tolkning av en pasientprøve.

BEGRENSNINGER

Den individuelle pasientens komplementnivå kan ikke brukes som mål på hvor alvorlig en sykdom er, siden dette kan variere fra pasient til pasient. Derfor er det vanskelig å oppnå en absolutt standardisering av resultatene.

Testen må ikke anses som eneste, pålitelige grunnlag for beslutninger om klinisk terapi, men skal brukes i kombinasjon med kliniske symptomer og resultater fra andre tilgjengelige tester. Det må ikke innledes noen behandling på grunnlag av resultatene fra komplementanalysen. Innledning eller endring av behandling skal ikke ene og alene basere seg på endringer i komplementnivåene, men heller på grundig klinisk observasjon.

FORVENTEDE RESULTATER

Hvis det oppdages reduserte nivåer av komplementkomponenter eller komplementfunksjon, skal en lege vurdere en mangel eller en pågående, immunologisk prosess som fører til økt svikt i komponenter og reduserte komplementnivåer.

For den semikvantitative analysen har den normale fordelingen innen 2SD blitt fastslått til å være 66-113 % av den positive kontrollen, se tabell 5. Resultater innenfor dette området angir at den klassiske veien har normal funksjonalitet. Det anbefales at hvert laboratorium bekrefter eller etablerer egne referanseområder for den befolkningen de betjener.

En verdi under området 66-113 % angir enten økt aktivering, som fører til fortæring av kapasiteten i den klassiske komplementveien, eller en genetisk betinget lav aktivitet.

Verdier under 15 % er en sterk indikasjon på fullstendig mangel, som enten er forårsaket av overdreven aktivitet eller en arvet mangel i den klassiske veien. For å etablere hvilke(n) komplementfaktor(er) som forårsaker den reduserte aktiviteten, er det behov for ytterligere analyse av komplementproteinene. Et negativt resultat, dvs. mistanke om mangel, skal alltid verifiseres ved å teste en ny prøve, som er omhyggelig klargjort, for å sikre at det ikke utføres in vitro komplementaktivering. Økte komplementnivåer er vanligvis et uspesifikt uttrykk for en akutt fasereaksjon.

Wieslab® Complement-system klassisk vei kan være nyttig for deteksjon av komplementmangler knyttet til de klassiske veiene, som vist i tabellen nedenfor. En mer fullstendig og dyptgående funksjonell analyse av alle tre komplementveiene kan oppnås ved bruk av Wieslab® Complement system Screen.

Klassisk vei	MBL-vei	Alternativ vei	Mulig mangel
Positiv	Positiv	Positiv	Ingen
Negativ	Positiv	Positiv	C1q, C1r, C1s
Positiv	Positiv	Negativ	Properdin, faktor B, D
Positiv	Negativ	Positiv	MBL, MASP2
Negativ	Negativ	Negativ	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativ	Negativ	Positiv	C4, C2 eller kombinasjon

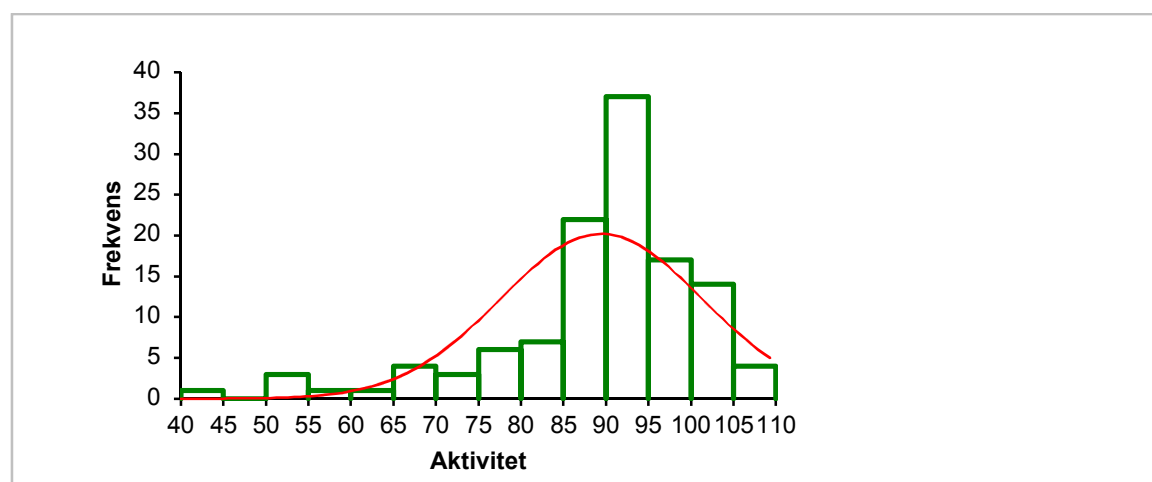
YTELSESEGENSKAPER

120 sera fra blodgivere ble testet, og det normale området ble beregnet. Se Figur 2 og Tabell 3. Ingen blodgiver lå under 40 %.

Kalibratorens måleområde: 12,5 % - 100 %

Grense for deteksjon (LOD) = 8 %

FIGUR 2. CP semikvantitativ



TABELL 5.

	n	Gj.snitt (%)	±2SD (%)	Median (%)
Semikvantitativ applikasjon	120	89	66-113*	92

Dette er en statistisk beregning og garanterer ikke en sann grenseverdi. Det anbefales at hvert laboratorium etablerer sitt eget referansenivå og sin grenseverdi for mangler.

*) Inkludert prøver fortynnet 1/201 for å ende opp på kurven

TABELL 6.

Sera med kjente komplementmangler og sera med utarmet, spesifikk komplementfaktor ble testet i analysen. Alle manglende/utarmede sera ble registrert i analysen og ga verdier under 15 %.

Mangel	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Antall pasienter	5	1	1	1	2	2
Registrert antall manglende sera	5	1	1	1	2	2

Utarming	C1q	C3	C4	C5	C7
Antall utarmede sera	2	1	1	1	1
Antall registrerte utarminger	2	1	1	1	1

TABELL 7. Presisjon mellom analyser for semikvantitativ applikasjon ble fastslått ved å teste sju prøver i åtte replikater ved tre forskjellige anledninger.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value							
%	71	73	69	72	25	35	31
SD	9	9	6	11	1	2	2
CV%	13%	13%	9%	15%	4%	5%	5%

TABELL 8. Presisjon mellom analyser for semikvantitativ applikasjon ble fastslått ved å teste sju ulike prøver i åtte replikater ved én anledning.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value							
%	79	76	72	83	24	34	30
SD	10	11	6	9	0	1	1
CV%	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

TABELL 9. Variasjoner fra parti til parti semikvantitativ applikasjon ble fastslått ved å teste sju prøver i duplikat på tre forskjellige partier av tre forskjellige personer.

Sample	1	2	3	4	5	6	7
Mean value (%)	8	73	85	24	37	74	78
SD	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
%CV	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

TABELL 10.

Fortynningsgjenoppretting ble fastslått ved å teste fem serielle fortynninger for tre forskjellige prøver.

Prøve	Fortynning	Gj. snitt målt aktivitet (%)	Teoretisk aktivitet (%)	Fortynningskorrigert % gjenoppretting
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
Prøve	Fortynning	Gj. snitt målt aktivitet (%)	Teoretisk aktivitet (%)	Fortynningskorrigert % gjenoppretting
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100

Prøve	Fortynning	Gj. snitt målt aktivitet (%)	Teoretisk aktivitet (%)	Fortynningskorrigert % gjenoppretting
3	1/100	84	84	100
	1/200	37	42	88
	1/400	21	21	100
	1/800	11	11	100
	1/1600	7	6	117












FEILSØKING

Problem	Mulige årsaker	Løsning
Kontrollverdier utenfor gyldig område	Feil temperatur, tidsberegning eller pipettering, reagensene er ikke blandet	Kontroller at tiden og temperaturen var korrekt. Gjenta testen.
	Kontrollene er krysskontaminert	Vær nøye under pipettering
	Optisk vei er ikke ren.	Kontroller om det er smuss eller luftbobler i brønnene. Tørk av platebunnen, og les av igjen.
	Kontrollene (positive og/eller aktivitetskontroller) er ikke korrekt rekonstituert. Upassende fortynning av kalibrator.	Kontroller kontrollene, løs opp en ny. Kontroller klargjøringen, og lag en ny fortynning.
Alle testresultatene er negative	Det ble ikke tilsatt en eller flere reagenser, eller de er lagt til i feil sekvens.	Kontroller prosedyren på nytt. Kontroller for ubrukte reagenser. Gjenta testen.
	Antigenbelagt plate er inaktiv.	Kontroller for åpenbar fuktighet i ubrukte brønner. Tørk av platebunnen, og les av igjen.
	Serum inaktivt.	Fortynn nye prøver.
Alle testresultatene er gule.	Kontaminerte buffere eller reagenser.	Kontroller alle løsningene for turbiditet.
	Vaskeløsningen er kontaminert.	Bruk ren beholder. Kontroller kvaliteten på vannet som ble brukt ved klargjøring av løsningen.
	Upassende fortynning av serum.	Gjenta testen.
Dårlig presisjon.	Pipettelevering CV >5 % eller prøver ikke blandet.	Kontroller pipettens kalibrering. Bruk reproducerbar teknikk. Unngå luftbobler i pipettespissen.
	Serum eller reagenser er ikke blandet tilstrekkelig eller ikke romtemperert.	Bland alle reagensene forsiktig men grundig, og la dem romtempereres.
	Det tar for lang tid å tilsette reagens, uregelmessige tidsintervaller.	Utvikle regelmessige, ensartede teknikker, og bruk en enhet med flere spisser eller automatisk dispenser for å redusere tiden.
	Optisk vei ikke ren.	Kontroller for bobler i brønnene. Tørk av platebunnen, og les av igjen.
	Vasking ikke konsekvent, fangede bobler, vaskeløsning i brønnene.	Kontroller at alle brønnene fylles og aspireres ensartet. Dispenser væske over reagensnivået i brønnen. Etter siste vask tømmer brønnene ved å banke strimmelen på absorberende papir.

REFERENCES:

- Walport M. Complement (First of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1058-66.
- Walport M. Complement (Second of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1140-44.
- Roos A et al. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol* 2003; 39:655-68.
- Fredriksson GN et al. New procedure for detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. *J Immunol Meth* 1993; 166:263-70.
- Seelen MA et al. Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Meth* 2005; 296:187-98.
- Salvador-Morales C, Sim RB. *Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials*. 2013, 1st Ed, World Scientific Publishing (ISBN: 978-4390-25-5).
- Tudoran R & Kirschfink M. *Modern Complement analysis: indications, methods and outlook*. *LaboratoriumsMedizin* 2012; 36(3):--.
- Botto M et al. Complement in human disease: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol* 2009; 46:2774-83.
- Mollnes TE et al. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 2007; 44:3838-49.
- Nilsson B, Nilsson Ekdahl K. *Complement Diagnostics: Concepts, Indications, and Practical Guidelines*. *Clin Develop Immunol*; 2012, Art ID 962702.

EXPLANATION OF SYMBOLS. L'EXPLICATION DE SYMBOLES. LA EXPLICACIÓN DE SIMBOLOS. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE. LA SPIEGAZIONE DI SIMBOLI. FORKLARING TIL SYMBOLER. SYMBOLFORKLARING. FÖRKLARINGAR TILL SYMBOLER.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numerodi lotto. Partinummer. Lot nummer.Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
 96	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 tester.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

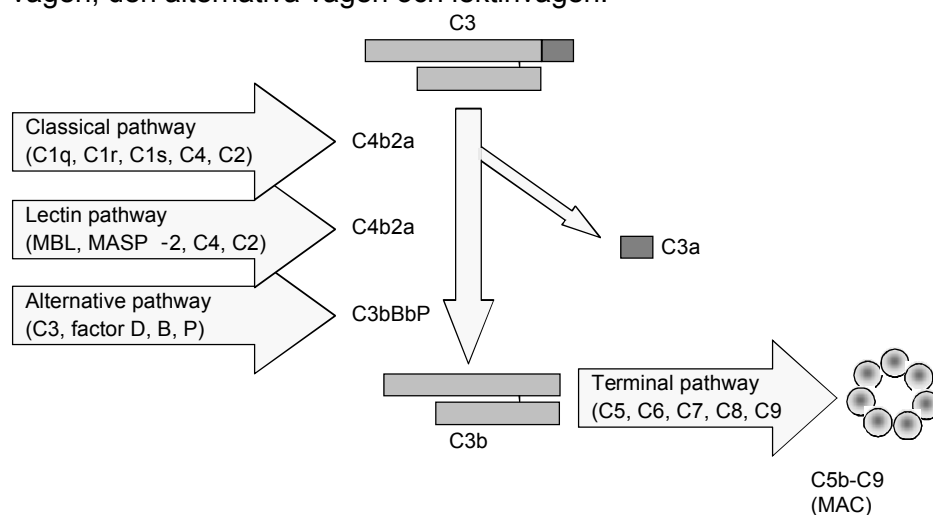
Ag	Antigen. Antigène. Antigeno. Antigen. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Conjugato. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konz. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL -	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Negativ control. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
CONTROL + LYO	Lyophilized positive control. Contrôle positif lyophilisé. Control positivo liofilizado. Lyophilisierte Positivkontrolle. Controllo positivo liofilizzato. Frysetørret positiv kontrol. Lyofilisert positiv kontroll. Frystorkad positiv kontroll.
CONTROL AC LYO	Lyophilized activity control. Contrôle d'activité lyophilisé. Control de actividad liofilizado. Lyophilisierte Aktivitätskontrolle. Controllo dell'attività liofilizzata. Frysetørret aktivitetskontrol. Lyofilisert aktivitetskontroll. Lyofiliserad aktivitetskontroll.
CH REP	Swiss Representative. Représentant Suisse. Representante suizo. Schweizer Vertreter. Rappresentante svizzero. Schweizisk repræsentant. Sveitsisk representant. Schweizisk representant

AVSEDD ANVÄNDNING

Wieslab® Komplementsystem - Klassiska vägen är en enzymimmunanalys för kvalitativ och/eller semikvantitativ bestämning av funktionen hos komplementets klassiska väg i humant serum. Analysen ska utföras av laboratoriepersonal med särskild yrkesutbildning.
FÖR IN VITRO-DIAGNOSTIK.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Komplementsystemet har en väsentlig funktion vid kroniska sjukdomar, autoimmunsjukdomar och infektionssjukdomar. Det finns tre vägar för komplementaktivering (Fig. 1), nämligen den klassiska vägen, den alternativa vägen och lektinvägen.



Nedsatt komplementaktivitet gör att människor blir känsliga för upprepade fulminanta eller svåra infektioner och kan bidra till utveckling av autoimmunsjukdom. Olämplig komplementaktivering bidrar till kronisk inflammation och vävnadsskador.

In vitro-aktivering av komplementsekvensen leder till förbrukning av komplementkomponenterna, vilket i sin tur leder till minskning av deras koncentration. Därför används bestämning av komplementproteiner eller komplementaktivitet för att ange om komplementsystemet har aktiverats av en immunologisk och/eller patogen mekanism. Både funktionsmätningar och immunkemiska mätningar av komplement används för att utvärdera patienter vid misstanke om en komplementaktiverande sjukdom eller om en nedärvd brist är möjlig. Nivån av komplementaktivitet utvärderas med funktionsanalyser, t.ex. Wieslab® Komplementkit, som tar hänsyn till den hastighet med vilken syntes, nedbrytning och förbrukning av komponenterna sker och ger ett mått på vägaras integritet, till skillnad från immunkemiska metoder som mäter koncentrationen av olika komplementkomponenter specifikt.

PRINCIP FÖR WIESLAB® KOMPLEMENT - ANALYS FÖR KLASSISK VÄG

Wieslab® Komplement - analys för klassisk väg, utgör en kombination av principerna för hemolytisk analys för komplementaktivering och användning av märkta antikroppar som är specifika för neoantigener och som genererats till följd av komplementaktivering. Mängden neoantigener som genereras står i proportion till funktionsaktiviteten i komplementvägarna.

I Komplement-CP kit är brunnarna i mikrotiterremorna coatade med specifika aktivatörer för den klassiska vägen. Detta i kombination med sammansättningen av provspädningsbufferten och patientserumets spädningsnivå säkerställer att endast den klassiska vägen aktiveras.

Under inkubationen av utspätt patientserum i brunnarna aktiveras komplement med den specifika coaten. Sedan tvättas brunnarna och mängden C5b-9-komplex som bildats på plattans yta detekteras med en specifik antikropp, märkt med alkalisk fosfatas, mot C5b-9 neoantigenen, som bildas vid bildandet av MAC (membranattackkomplex).

Efter ytterligare ett tvättsteg detekteras de specifika antikropparna genom inkubation med substratlösning med alkalisk fosfatas. Mängden komplementaktivering är korrelerat med färgintensitet och mäts med absorbans (optisk täthet (OD)).

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- För in vitro-diagnostik.
- Komponenter i humant serum som har använts vid framställning av kontrollerna i satsen har testats för förekomst av antikroppar mot humant immunbristvirus 1 och 2 (HIV 1 och 2), hepatit C (HCV) och hepatit B-ytantigen med metoder som godkänts av det amerikanska läkemedelsverket FDA och bekräftats vara negativa. Eftersom inga testmetoder med absolut säkerhet kan garantera frånvaro av HIV, HCV, hepatit B-virus eller andra smittförande ämnen, ska dessa prover och humanbaserade reagenser hanteras som potentiellt infektiösa agens.
- Centers for Disease Control and Prevention och National Institutes of Health rekommenderar att potentiellt smittfarliga ämnen ska hanteras på smittskyddsnivå 2.
- Alla lösningar innehåller ProClin 300 som konserveringsmedel. Pipettera aldrig med munnen och låt aldrig reagenser eller patientprover komma i kontakt med hud. Reagenser som innehåller ProClin kan orsaka irritation. Undvik kontakt med hud och ögon. Vid kontakt, spola med rikligt med vatten.
- Säkerhetsdatablad för alla farliga komponenter som finns i denna sats finns tillgängliga på begäran från Svar Life Science.

Tvättlösning 30 x koncentrerad**Varning**

Innehåller: Reaktionsmassa: 5-chloro-2-metyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-metyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317	Kan orsaka allergisk hudreaktion.
H412	Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer.
P261	Undvik att inandas spray.
P273	Undvik utsläpp till miljön.
P280	Använd skyddshandskar.
P333+313	Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp.

Diluent CP, Konjugat, Negativ Kontroll, Substrat pNPP

EUH208	Innehåller 5-chloro-2-metyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-metyl- 2H-isothiazol- 3-one [EC no. 220-239-6] (3:1). Kan orsaka en allergisk reaktion.
EUH210	Säkerhetsdatablad finns att rekvirera.

PROVTAGNING

Blodprov ska tas med aseptisk venpunktionsmetod och standardprocedurer ska användas för att erhålla serum. Minst 5 mL helblod rekommenderas. Vänta tills blodet har koagulerat i serumrör, i 60-65 minuter vid rumstemperatur (20-25 °C). Centrifugera blodproverna och överför det cellfria serumet till ett rent provrör. Sera måste hanteras korrekt för att förhindra in vitro-komplementaktivering. Sera ska frysas vid -70 °C eller lägre i tätslutande provrör för längre tids förvaring eller för transport på torris.

Frys och tina inte prover mer än en gång.

Använd inte sera som är ikteriska, lipemiska eller hemolyserade. Värmeinaktiverade sera kan inte användas. Plasma kan inte användas. CLSI ger rekommendationer för förvaring av blodprover (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

KITKOMPONENTER OCH FÖRVARING AV REAGENSER

- En ram med färglösa brunnar som kan brytas loss (12x8) coatade med humant IgM, förseglade i ett foliepaket med en torkpåse.
- 2 x 35 mL spädningsbuffert-CP (Dil CP), märkt blå.
- 13 mL konjugat som innehåller antikroppar märkta med alkalisk fosfat, mot C5b-9 (blå färg).
- 13 mL substratlösning färdig att användas.
- 30 mL tvättlösning, 30x koncentrerad.
- 0.2 mL negativ kontroll (NC) som innehåller humant serum (ska spädas som för ett patientserumprov).
- Frystorkad positiv kontroll (PC) som innehåller frystorkat humant serum, ska rekonstitueras i 0.2 mL destillerat vatten. Se "Rekonstitution av positiv kontroll", nedan.
- Frystorkad aktivitetskontroll (AC) för semikvantitativ tillämpning, som innehåller frystorkat humant serum (av annat ursprung än PC). Se "Rekonstitution av aktivitetskontroll" under proceduren för semikvantitativ tillämpning.

Den positiva kontrollen och aktivitetskontrollen ska förvaras vid -20 °C efter mottagande.

Observera: Rekonstitutionsvolymen för AC anges i analyscertifikatet (CoA) (XXX µl) och på AC-etiketten.

Alla kitreagenser är färdiga att användas, utom tvättlösning och kontroller. Reagenserna ska förvaras i 2-8 °C, utom den positiva kontrollen och aktivitetskontrollen. Den rekonstituerade positiva kontrollen och aktivitetskontrollen ska förvaras vid -70 °C och får tinas en gång.

NÖDVÄNDIGT MATERIELL ELLER UTRUSTNING SOM EJ MEDFÖLJER

- Läsare för mikroplasser med filter 405 nm.
- Precisionspipetter med engångspetsar.
- Tvätt för remsor, absorberande papper, provrör och ett tidur.

PROCEDUR – KVALITATIV TILLÄMPNING

Ta endast ut det antal brunnar som krävs för testet och försegla sedan aluminiumförpackningen noga. Låt alla lösningar anta rumstemperatur (20-25 °C) före analys. Blanda inte reagenser med olika lotnummer.

FÖRBEREDA TVÄTTLÖSNING

Om saltkristaller observeras i flaskan med koncentrerad tvättlösning, placeras flaskan i 37 °C vattenbad tills kristallerna är upplösta, detta görs innan utspädning av tvättlösningen.

Späd 30 mL 30x koncentrerad tvättlösning i 870 mL destillerat vatten. När den förvaras vid 2-8 °C är den utspädda tvättlösningen hållbar till kitets utgångsdatum.

REKONSTITUTION AV POSITIV KONTROLL

Knacka lätt ner allt frystorkat material till botten på flaskan och ta av locket. Tillsätt genast 200 µL destillerat vatten direkt i det frystorkade materialet. Sätt tillbaka locket. Låt flaskan stå på is i 5 minuter och skaka sedan försiktigt eller använd vortexblandare emellanåt tills allt har lösts upp. Späd den rekonstituerade kontrollen på samma sätt som ett patientserumprov. Den rekonstituerade positiva kontrollen kan förvaras i upp till 4 timmar före användning om den hålls vid 2-8 °C eller på is. Den ska förvaras vid -70 °C och får tinas en gång.

SERUM

Tina delvis frusna sera genom att kort placera dem i ett vattenbad vid 37 °C med försiktig blandning. Efter att ha delvis tinats ska provrören genast placeras i ett isbad. Låt stå på is tills helt tinade. Blanda kort i en vortexblandare.

SPÄDNING AV SERUM

Späd 1/101 med spädningsbuffert-CP, blå etikett, (500 µL spädningsmedel + 5 µL serum) och blanda ordentligt, men försiktigt, med en vortexblandare. Utspätt serum kan stå i rumstemperatur i högst 60 minuter före analys.

INKUBATION AV PROVER

Pipettera 100 µL/brunn, med dubbelprov, av spädningsbuffert (Dil), som ett blankprov, positiv kontroll (PC), negativ kontroll (NC) och utspätt patientserum (P), enligt schemat nedan. Inkubera i 60-70 minuter vid +37 °C med lock.

Klassiska vägen

	1	2	3
A	Dil CP	P2	
B	Dil CP	P2	
C	PC	etc	
D	PC		
E	NC		
F	NC		
G	P1		
H	P1		

EFTER SERUMINKUBATION

Töm brunnarna och tvätta 3 gånger med 300 µL tvättlösning. Fyll och töm brunnarna varje gång. Efter sista tvätten, töm brunnarna genom att klappa remsan lätt mot absorberande papper.

TILLSÄTTA KONJUGAT

Tillsätt 100 µL konjugat i varje brunn. Inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur (+20-25 °C).

EFTER KONJUGATINKUBATION

Tvätta 3 gånger som tidigare.

TILLSÄTTA SUBSTRATLÖSNING

Tillsätt 100 µL substratlösning i varje brunn och inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur (+20-25 °C). Avläs absorbansen vid 405 nm på en läsare för mikroplattor. (5 mM EDTA kan användas som stopplösning, 100 µL/brunn. Avläs absorbansen för brunnarna inom 60 minuter.)

RESULTATBERÄKNING

Subtrahera absorbansen för blankprovet (spädningsbuffert) från absorbansen för NC, PC och proverna. Absorbansen för den positiva kontrollen ska vara >1.0 och absorbansen för den negativa kontrollen ska vara < 0.2, efter att blankprovet subtraherats.

Beräkna medelvärdet av OD_{405nm}-värdena för provet, PC och NC samt beräkna % komplementaktivitet enligt följande: $(\text{Prov-NC})/(\text{PC-NC}) \times 100$. De negativa och positiva kontrollerna är avsedda för övervakning av väsentliga reagensfel. Den positiva kontrollen tillförsäkrar inte precision vid gränsvärdet i analysen. Vi rekommenderar att varje laboratorium fastställer sin egen referensnivå och gränsvärde för brister.

Om någon av kontrollerna inte ligger inom sitt respektive intervall ska testet anses vara ogiltigt och göras om.

KVALITETSKONTROLL

CoA som ingår i detta kit är lot-specifik och ska användas för att verifiera resultat som erhållits på aktuellt laboratorium. Resultaten som anges på CoA ska endast användas som riktlinjer. Resultaten som erhålls på aktuellt laboratorium kan skilja sig från detta.

BEGRÄNSNINGAR

Den enskilda patientens komplementnivå kan inte användas som ett mått på hur allvarlig sjukdomen är, eftersom detta kan variera mellan patienter. Därför är det svårt att uppnå en absolut standardisering av resultat.

Detta test ska inte uteslutande användas som grundval för att fatta beslut om klinisk behandling, utan ska användas i kombination med kliniska symtom och resultat från andra tillgängliga tester. Behandling ska inte påbörjas på grundval av resultatet från komplementanalysen. Inledning av behandling eller förändringar av behandling ska inte baseras uteslutande på ändringar i komplementnivåer, utan istället på noggrann klinisk observation.

FÖRVÄNTADE RESULTAT

När sänkta nivåer av komplementkomponenter eller komplementfunktion konstateras beaktar läkare en brist eller en pågående immunologisk process som leder till ökad nedbrytning av komponenter och sänkning av komplementnivåer.

Normal fördelning inom 2SD har fastställts till 69-129 % av den positiva kontrollen, för den kvalitativa analysen. Se Tabell 1. Resultat inom detta intervall anger att den klassiska vägen har normal funktion. Vi rekommenderar att varje laboratorium bekräftar detta intervall eller fastställer ett eget referensintervall för populationen som betjänas.

Ett värde lägre än intervallet 69-129 % anger antingen ökad aktivering, till följd av förbrukning av den klassiska komplementvägens kapacitet eller en genetiskt bestämd låg aktivitet.

Värden lägre än 5 % tyder definitivt på total brist som antingen orsakas av för kraftig aktivering eller nedärvd brist i den klassiska vägen. För att fastställa de/n komplementfaktor/er som orsakar den sänkta aktiviteten krävs ytterligare analys av komplementproteiner.

Ett negativt resultat, d.v.s. misstänkt brist, ska alltid verifieras med test av ett nytt, noga hanterat prov, för att säkerställa att ingen komplementaktivering har inträffat in vitro.

Förhöjda komplementnivåer är normalt ett ickespecifikt uttryck för en akut fas respons.

Wieslab® Komplementsystem - Klassiska vägen kan vara praktisk för detektering av komplementbrister med anknytning till klassiska vägar, i enlighet med tabellen nedan: En mer fullständig och ingående funktionsbedömning av alla tre komplementvägarna kan erhållas med Wieslab® Complement system Screen.

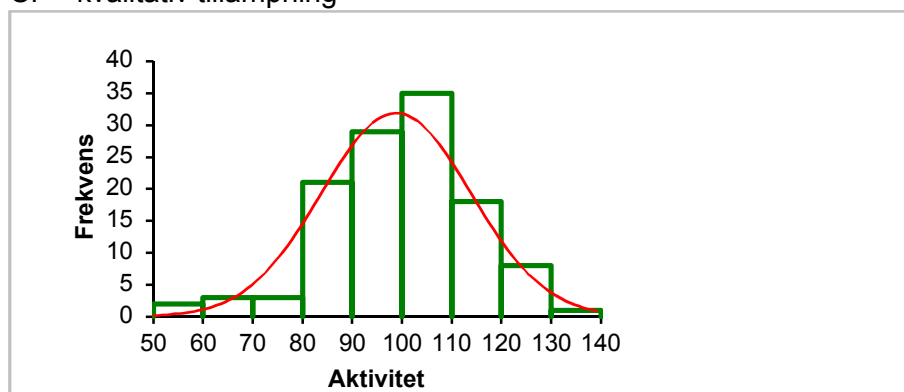
Klassiska vägen	MBL-vägen	Alternativa vägen	Möjlig brist
Positiv	Positiv	Positiv	Ingen
Negativ	Positiv	Positiv	C1q, C1r, C1s
Positiv	Positiv	Negativ	Properdin, faktor B, D
Positiv	Negativ	Positiv	MBL, MASP2
Negativ	Negativ	Negativ	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativ	Negativ	Positiv	C4, C2 eller kombination

RESULTATKARAKTERISTIKA

120 sera från blodgivare testades och det normala referensintervallet beräknades. Värdena uttrycktes i % av den positiva kontrollen. Se Figur 1 och Tabell 1. Ingen blodgivare var under 40 %.

Figur 1.

CP - kvalitativ tillämpning



TABELL 1.

	n	Medelvärde (%)	±2SD (%)	Median (%)
Klassiska vägen	120	99	69-129*	100

*) Detta är en statistisk beräkning och garanterar inte ett sant gränsvärde.

Vi rekommenderar att varje laboratorium fastställer sin egen referensnivå och gränsvärde för misstänkt brist.

TABELL 2.

Sera med kända komplementbrister testades i analysen och följande resultat erhöles. Alla sera med brister detekterades i analysen och gav värden under 5 %**).

Brist	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Antal patienter	5	1	1	1	2	2
Antal sera med brister som detekterades	5	1	1	1	2	2

***) Se "M.A. Seelen et. al, Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. J Immunol Meth 2005, 296, 187-198", vad gäller utökade tester för patientprover med brist som testats med kvalitativ tillämpning

Minskning	C1q	C3	C4	C5	C7
Antal sera med minskning	2	1	1	1	1
Antal med detekterad minskning	2	1	1	1	1

TABELL 3. Precision mellan analyser för kvalitativ tillämpning bestämdes genom att testa tre prover med dubbelprov. Resultaten erhöles för sex olika serier.

	CP P1	CP P2	CP P3
Mean value			
%	98	92	21
SD	4.3	3.9	1.7
CV%	4	4	8

TABELL 4. Precision inom analysen för kvalitativ tillämpning bestämdes genom att testa ett prov i 40 brunnar.

Analys	Medelvärde %	SD	CV %
CP	85	2,9	3

PROCEDUR – SEMIKVANTITATIV TILLÄMPNING

Den semikvantitativa tillämpningen skiljer sig från den kvalitativa genom att en kalibreringskurva tas fram genom spädning av kit-PC, vilket ger en kalibreringskurva med 100, 75, 50, 25 och 12,5 % aktivitet. Ta endast ut det antal brunnar som krävs för testet och försegla sedan aluminiumförpackningen noga. Låt alla lösningar anta rumstemperatur (20-25 °C) före analys. Blanda inte reagenser med olika lotnummer.

FÖRBEREDA TVÄTTLÖSNING

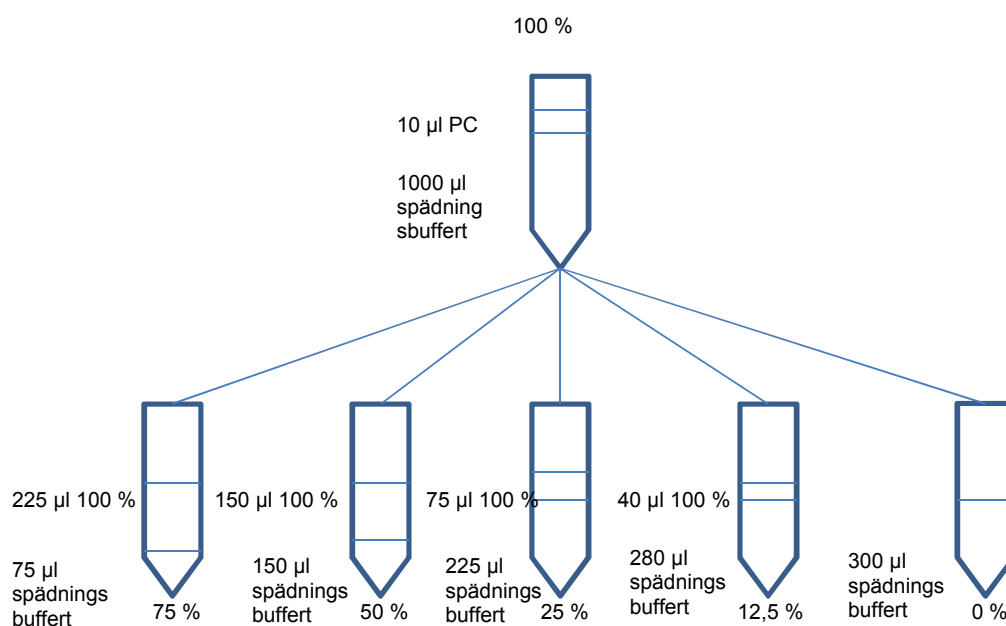
Om saltkristaller observeras i flaskan med koncentrerad tvättlösning, placeras flaskan i 37 °C vattenbad tills kristallerna är upplösta, detta görs innan utspädning av tvättlösningen.

Späd 30 mL 30x koncentrerad tvättlösning i 870 mL destillerat vatten. När den förvaras vid 2-8 °C är den utspädda tvättlösningen hållbar till kitets utgångsdatum.

REKONSTITUTION AV POSITIV KONTROLL OCH SPÄDNING FÖR ANVÄNDNING SOM KALIBRATOR

Knacka lätt ner allt frystorkat material till botten på flaskan och ta av locket. Tillsätt genast 200 µL destillerat vatten direkt i det frystorkade materialet. Sätt tillbaka locket. Låt flaskan stå på is i 5 minuter och skaka sedan försiktigt eller använd vortexblandare emellanåt tills allt har lösts upp. Den rekonstituerade positiva kontrollen kan förvaras i upp till 4 timmar före användning om den hålls vid 2-8 °C eller på is. Den kan frysas vid -70 °C och tinas en gång.

För spädning av rekonstituerad positiv kontroll till kalibratorer, se bilden nedan.



Kalibratoren kan stå i rumstemperatur i upp till 1 timme före användning. Kalibratoren måste beredas färsk och kan inte förvaras vid -20 °C efter spädning för senare användning.

REKONSTITUTION AV AKTIVITETSKONTROLL (AC)

Knacka lätt ner allt frystorkat material till botten på flaskan och ta av locket. Tillsätt genast den volym destillerat vatten som anges på CoA/AC-etiketten, direkt i det frystorkade materialet. Sätt tillbaka locket. Låt flaskan stå på is i 5 minuter och skaka sedan försiktigt eller använd vortexblandare försiktigt tills allt har lösts upp. Spädd den rekonstituerade kontrollen på samma sätt som ett patientserumprov. Den rekonstituerade aktivitetsskontrollen kan förvaras i upp till 4 timmar före användning om den hålls vid 2-8 °C eller på is. Den kan förvaras vid -70 °C och tinas en gång.

SERUM

Tina delvis frusna sera genom att kort placera dem i ett vattenbad vid 37 °C med försiktig blandning. Efter att ha delvis tinats ska provrören genast placeras i ett isbad. Låt stå på is tills helt tinade. Blanda kort i en vortexblandare.

SPÄDNING AV SERUM OCH AKTIVITETSKONTROLLEN

Spädd 1/101 med spädningsbuffert-CP, blå etikett, (500 µL spädningsbuffert + 5 µL serum) och blanda ordentligt, men försiktigt, med en vortexblandare. Utspädd serum och aktivitetsskontroll kan stå i rumstemperatur i högst 60 minuter före analys.

INKUBATION AV PROVER

Pipettera 100 µL/brunn, med dubbelprov, av kalibrator (100 %-0 %), negativ kontroll (NC) och aktivitetsskontroll (AC) samt utspädd patientserum (P), enligt schemat nedan. Inkubera i 60-70 minuter vid +37 °C med lock.

Klassiska vägen

	1	2	3
A	100 %	12,5 %	P1
B	100 %	12,5 %	P1
C	75 %	0 %	P2
D	75 %	0 %	P2
E	50 %	NC	etc
F	50 %	NC	
G	25 %	AC	
H	25 %	AC	

EFTER SERUMINKUBATION

Töm brunnarna och tvätta 3 gånger med 300 µL tvättlösning. Fyll och töm brunnarna varje gång. Efter sista tvätten, töm brunnarna genom att klappa remsan lätt mot absorberande papper.

TILLSÄTTA KONJUGAT

Tillsätt 100 µL konjugat i varje brunn. Inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur (+20-25 °C).

Efter konjugatinkubation

Tvätta 3 gånger som tidigare.

TILLSÄTTA SUBSTRATLÖSNING

Tillsätt 100 µL substratlösning i varje brunn och inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur (+20-25 °C). Avläs absorbansen vid 405 nm på en läsare för mikroplattor. (5 mM EDTA kan användas som stopplösning,

100 µL/brunn. Avläs absorbansen för brunnarna inom 60 minuter.)

RESULTATBERÄKNING

Kurvanpassning med 4 parametrar (Marquardt) rekommenderas. Subtrahera absorbansen för 0 %-kalibratören från alla OD-värden.

Absorbansen för kalibratören 100 % ska vara > 1,0, NC-absorbansen < 0,2 och AC-aktiviteten >30 %.

Om de värden för prover som erhålls är högre än högsta kalibratör 100 % kan proven späddas 1/201 och testas igen.

Lägg märke till att det aktivitetsvärde som erhålls i detta fall ska justeras i enlighet med den provspädning som använts.

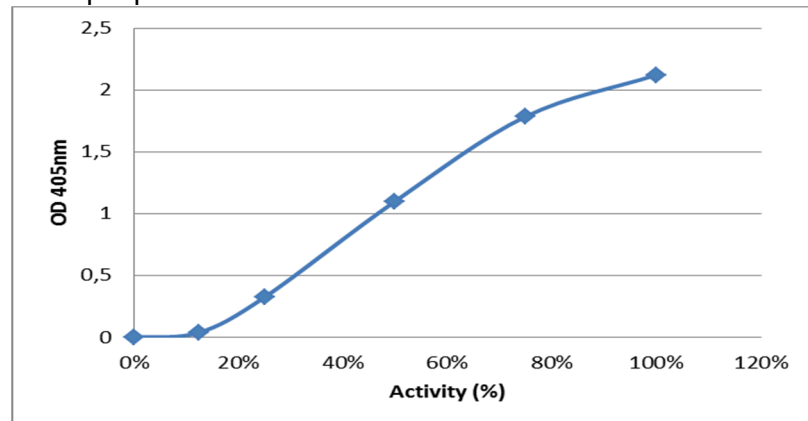
Om någon av kontrollerna inte ligger inom sitt respektive intervall ska testet anses vara ogiltigt och göras om.

Vi rekommenderar att varje laboratorium fastställer sin egen referensnivå och gränsvärde för brister.

Kvalitetskontroll

CoA som ingår i detta kitspänningsbuffert är lot-specifik och ska användas för att verifiera resultat som erhållits på aktuellt laboratorium. Resultaten som anges på CoA ska endast användas som riktlinjer. Resultaten som erhålls på aktuellt laboratorium kan skilja sig från detta.

Exempel på en standardkurva



Observera: Figuren ovan visar ett exempel på en semikvantitativ standardkurva och ska inte användas vid tolkning av verkliga patientprov.

BEGRÄNSNINGAR

Den enskilda patientens komplementnivå kan inte användas som ett mått på hur allvarlig sjukdomen är, eftersom detta kan variera mellan patienter. Därför är det svårt att uppnå en absolut standardisering av resultat.

Detta test ska inte uteslutande användas som grundval för att fatta beslut om klinisk behandling, utan ska användas i kombination med kliniska symtom och resultat från andra tillgängliga tester. Behandling ska inte påbörjas på grundval av resultatet från komplementanalysen. Inledning av behandling eller förändringar av behandling ska inte baseras uteslutande på ändringar i komplementnivåer, utan istället på noggrann klinisk observation.

FÖRVÄNTADE RESULTAT

När sänkta nivåer av komplementkomponenter eller komplementfunktion konstateras beaktar läkare en brist eller en pågående immunologisk process som leder till ökad nedbrytning av komponenter och sänkning av komponentnivåer.

Normal fördelning inom 2SD har fastställts till 66-113 % av den positiva kontrollen, för den semikvantitativa analysen. Se Tabell 5. Resultat inom detta intervall anger att den klassiska vägen har normal funktion. Vi rekommenderar att varje laboratorium bekräftar detta intervall eller fastställer egna referensintervall för populationen som betjänas.

Ett värde lägre än intervallet 66-113 % anger antingen ökad aktivering, till följd av förbrukning den klassiska komplementvägens kapacitet eller en genetiskt bestämd låg aktivitet.

Värden lägre än 15 % tyder definitivt på total brist som antingen orsakas av för kraftig aktivering eller nedärvd brist i den klassiska vägen. För att fastställa de/n komplementfaktor/er som orsakar den sänkta aktiviteten krävs ytterligare analys av komplementproteiner.

Ett negativt resultat, d.v.s. misstänkt brist, ska alltid verifieras med test av ett nytt, noga hanterat prov, för att säkerställa att ingen komplementaktivering har inträffat in vitro.

Förhöjda komplementnivåer är normalt ett ickespecifikt uttryck för en akut fas respons.

Wieslab® Komplementsystem - Klassiska vägen kan vara praktisk för detektering av komplementbrister med anknytning till klassiska vägar, i enlighet med tabellen nedan. En mer fullständig och ingående funktionsbedömning av alla tre komplementvägarna kan erhållas med undersökningen Wieslab® Complement system Screen.

Klassiska vägen	MBL-vägen	Alternativa vägen	Möjlig brist
Positiv	Positiv	Positiv	Ingen
Negativ	Positiv	Positiv	C1q, C1r, C1s
Positiv	Positiv	Negativ	Properdin, faktor B, D
Positiv	Negativ	Positiv	MBL, MASP2
Negativ	Negativ	Negativ	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativ	Negativ	Positiv	C4, C2 eller kombination

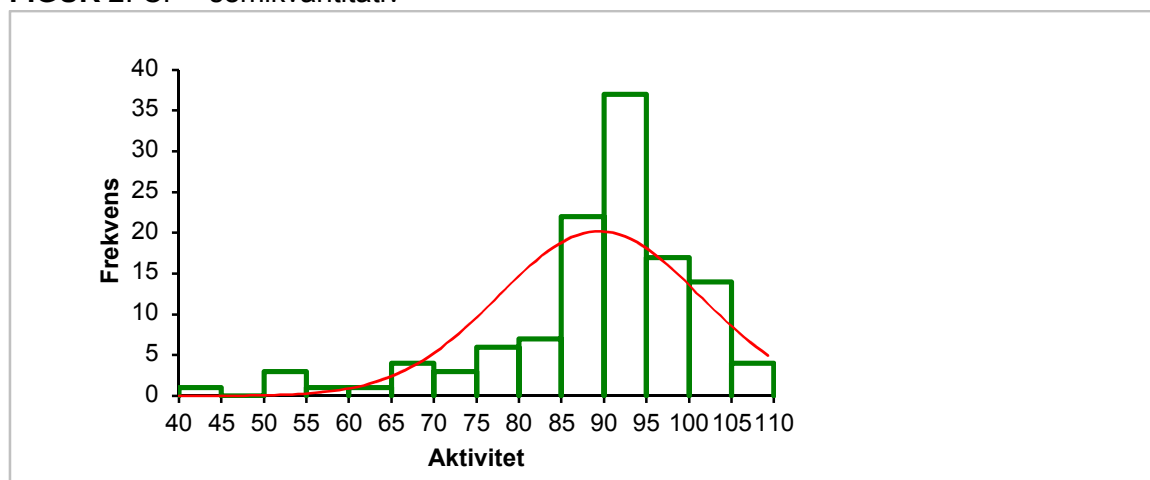
RESULTATKARAKTERISTIKA

120 sera från blodgivare testades och det normala referensintervallet beräknades. Se Figur 2 och Tabell 3. Ingen blodgivare var under 40 %.

Kalibrator, mätintervall: 12,5 % - 100 %

Detekteringsgräns (LOD) = 8 %

FIGUR 2. CP - semikvantitativ



TABELL 5.

	n	Medelvärde (%)	±2SD (%)	Median (%)
Semikvantitativ tillämpning	120	89	66-113*	92

Detta är en statistisk beräkning och garanterar inte ett sant gränsvärde. Vi rekommenderar att varje laboratorium fastställer sin egen referensnivå och gränsvärde för brist.

*) Omfattar prover med spädning 1/201 för att komma med på kurvan

TABELL 6.

Sera med kända komplementbrister och sera med minskning av specifik komplementfaktor testades i analysen. Alla sera med brister/minskning var låga i analysen och gav värden under 15 %.

Brist	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Antal patienter	5	1	1	1	2	2
Antal sera med brister som detekterades	5	1	1	1	2	2

Minskning	C1q	C3	C4	C5	C7
Antal sera med minskning	2	1	1	1	1
Antal med detekterad minskning	2	1	1	1	1

TABELL 7. Precision mellan analyser för semikvantitativ tillämpning bestämdes genom att testa sju prover med åtta replikat vid tre olika tillfällen.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value							
%	71	73	69	72	25	35	31
SD	9	9	6	11	1	2	2
CV%	13%	13%	9%	15%	4%	5%	5%

TABELL 8. Precision inom analysen för semikvantitativ tillämpning bestämdes genom att testa sju olika prover med åtta replikat vid ett tillfälle.

	1	2	3	4	5	6	7
Mean value							
%	79	76	72	83	24	34	30
SD	10	11	6	9	0	1	1
CV%	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

TABELL 9. Variation mellan partier för semikvantitativ tillämpning bestämdes genom att testa sju prover, med dubbelprov, på tre olika partier, med tre olika personer.

Sample	1	2	3	4	5	6	7
Mean value (%)	8	73	85	24	37	74	78
SD	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
%CV	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

TABELL 10.

Spädningsutbyte bestämdes genom att testa fem seriespädningar för tre olika prover.

Prov	Spädning	Medelvärde av uppmätt aktivitet (%)	Teoretisk aktivitet (%)	% utbyte med spädningskorriger ing
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
Prov	Spädning	Medelvärde av uppmätt aktivitet (%)	Teoretisk aktivitet (%)	% utbyte med spädningskorriger ing
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
Prov	Spädning	Medelvärde av uppmätt aktivitet (%)	Teoretisk aktivitet (%)	% utbyte med spädningskorriger ing
3	1/100	84	84	100
	1/200	37	42	88
	1/400	21	21	100
	1/800	11	11	100
	1/1600	7	6	117












FELSÖKNING

Problem	Möjliga orsaker	Åtgärder
Kontrollvärden utanför mätområdet	Felaktig temperatur, timing eller pipettering, reagenser är inte blandade	Kontrollera att tid och temperatur var korrekta. Upprepa testet.
	Korskontaminering av kontroller	Pipettera noga.
	Den optiska vägen är inte ren.	Kontrollera om det finns smuts eller luftbubblor i brunnarna. Torka av plattans underdel och avläs på nytt.
	Kontroller (positiva kontroller och/eller aktivitetskontroller) har inte rekonstituerats korrekt. Felaktig spädning av kalibrator.	Undersök kontrollerna, lös upp en ny. Kontrollera beredningen och iordningställ en ny spädning.
Alla testresultat negativa	Ett eller flera reagens har inte tillsatts eller tillsatts i fel ordningsföljd.	Kontrollera proceduren på nytt. Kontrollera om det finns oanvända reagenser. Upprepa testet.
	Antigenbelagd platta är inaktiv.	Kontrollera om det finns tydlig fukt i oanvända brunnar. Torka av plattans underdel och avläs på nytt.
	Serum inaktivt.	Späd nya prover.
Alla testresultat gula.	Kontaminerade buffertar eller reagenser.	Kontrollera grumlighet i alla lösningar.
	Tvättlösningen är kontaminerad.	Använd ren behållare. Kontrollera kvaliteten på det vatten som används för att bereda lösningen.
	Felaktig spädning av serum.	Upprepa testet.
Dålig precision.	CV för pipettillförsel >5 % eller prover inte blandade.	Kontrollera kalibreringen av pipetten. Använd repeterbar metod. Undvik luftbubblor i pipettens spets.
	Serum eller reagenser har inte blandats tillräckligt eller har inte antagit rumstemperatur.	Blanda alla reagenser försiktigt men ordentligt och låt dem anta rumstemperatur.
	Tillsats av reagens tar för lång tid, osystematiska tidtagningsintervall.	Utveckla en systematisk likformig metod och använd en enhet med flera spetsar eller automatisk dispenseringsenhet, så att det tar mindre tid.
	Den optiska vägen är inte ren.	Kontrollera om det finns luftbubblor i brunnarna. Torka av plattans underdel och avläs på nytt.
	Tvätt är ojämn, bubblor som fastnat, tvättlösning finns kvar i brunnarna.	Kontrollera att alla brunnar fylls och aspireras på likformigt sätt. Dispensera vätska ovanför reagensnivån i brunnen. Efter sista tvätten, töm brunnarna genom att klappa remsan lätt mot absorberande papper.

REFERENCES:

- Walport M. Complement (First of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1058-66.
- Walport M. Complement (Second of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344:1140-44.
- Roos A et al. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol* 2003; 39:655-68.
- Fredriksson GN et al. New procedure for detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. *J Immunol Meth* 1993; 166:263-70.
- Seelen MA et al. Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Meth* 2005; 296:187-98.
- Salvador-Morales C, Sim RB. *Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials*. 2013, 1st Ed, World Scientific Publishing (ISBN: 978-4390-25-5).
- Tudoran R & Kirschfink M. *Modern Complement analysis: indications, methods and outlook*. *LaboratoriumsMedizin* 2012; 36(3):--.
- Botto M et al. Complement in human disease: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol* 2009; 46:2774-83.
- Mollnes TE et al. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 2007; 44:3838-49.
- Nilsson B, Nilsson Ekdahl K. *Complement Diagnostics: Concepts, Indications, and Practical Guidelines*. *Clin Develop Immunol*; 2012, Art ID 962702.

EXPLANATION OF SYMBOLS. L'EXPLICATION DE SYMBOLES. LA EXPLICACIÓN DE SIMBOLOS. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE. LA SPIEGAZIONE DI SIMBOLI. FORKLARING TIL SYMBOLER. SYMBOLFORKLARING. FÖRKLARINGAR TILL SYMBOLER.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numerodi lotto. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. La data di scadenza. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 tester.
96	
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno. Antigen. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Conjugato. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konz. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL -	Negative control. Contrôle négatif. Control negativo. Negativkontrolle. Controllo negativo. Negativ control. Negativ kontroll. Negativ kontroll.
CONTROL + LYO	Lyophilized positive control. Contrôle positif lyophilisé. Control positivo liofilizado. Lyophilisierte Positivkontrolle. Controllo positivo liofilizzato. Frysetørret positiv kontrol. Lyofilisert positiv kontroll. Frystorkad positiv kontroll.
CONTROL AC LYO	Lyophilized activity control. Contrôle d'activité lyophilisé. Control de actividad liofilizado. Lyophilisierte Aktivitätskontrolle. Controllo dell'attività liofilizzata. Frysetørret aktivitetskontrol. Lyofilisert aktivitetskontroll. Lyofiliserad aktivitetskontroll.
CH REP	Swiss Representative. Représentant Suisse. Representante suizo. Schweizer Vertreter. Rappresentante svizzero. Schweizisk repræsentant. Sveitsisk representant. Schweizisk representant



Inspira GmbH

Thunstrasse 64
CH-3110 Münsingen
ar@ch-rep.com

SVAR LIFE SCIENCE AB

Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden
Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88
E-mail: info@svarlifescience.com
www.svarlifescience.com