

Berichrom* C1-Inhibitor

Reagents for the determination of C1 inhibitor

Intended Use

Determination of the functional activity of C1-inhibitor in plasma for the diagnosis of diminished C1-inhibitor synthesis, increased consumption and for monitoring substitution therapy and steroid therapy.

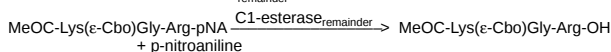
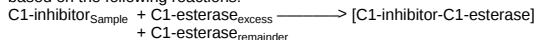
Summary and Explanation

C1-inhibitor is the only inhibitor for the activated complement components C1r and C1s which occur at the start of the classical pathway of complement activation. C1-inhibitor therefore prevents excessive activation of the complement system. In addition, C1-inhibitor is physiologically the most important plasmatic inhibitor for activated coagulation factor XIIa (FXIIa) and for kallikrein, rapidly and irreversibly forming an inactive complex with each. Thus, C1-inhibitor is the most important regulator of the contact phase¹.

Hereditary deficiency of C1-inhibitor causes hereditary angioneurotic oedema (HANE), a special form of Quincke's oedema². Acquired deficiency states occur in malignant diseases, liver cirrhosis, preeclampsia, pneumonia and other infectious diseases. The determination of C1-inhibitor is furthermore indicated for monitoring substitution therapy with C1-inhibitor as well as for monitoring steroid therapy.

Principle of the Method

C1-inhibitor in the sample inhibits a receiving volume of C1-esterase. The remaining activity of the C1-esterase is determined by measuring the increase in absorbance at 405 nm in a kinetic test based on the following reactions:



Reagents

Materials provided

Berichrom* C1-inhibitor, Testkit, Code No. OUIA with

3 x for 5 mL C1-Esterase

3 x for 1 mL Substrate Reagent

1 x 3 mL Substrate Solvent

Composition

C1-Esterase (human), lyophilized; concentration in the working solution:

KH₂PO₄ 65 mmol/L, lysin 1 g/L, mannitol 5 g/L, pH 7.5

Preservatives:

5-chloro-2-methyl-4-isothiazole-3-one (max. 8 mg/L) and 2-methyl-4-iso-thiazole-3-one (max. 2 mg/L)

Substrate Reagent: lyophilized; concentration in the working solution:

methylloxycarbonyl-L-lysyl(ε-carbobenzoxyl)-Glycyl-L-Arginyl-p-nitrolanilide (MEOC-Lys(ε-Cbo)-Gly-Arg-pNA) 5 mmol/L, mannitol 20 g/L.

Substrate Solvent: Polypropylene glycol, 100 g/L

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use.

2. As complete absence of infectious agents can never be assured, all materials derived from human tissue or body fluids should always be handled with due care, observing the precautions recommended for biohazardous material³.

Preparation of the Reagent

C1-Esterase (human): Dissolve vial contents in the labelled amount of distilled water.

Substrate Reagent: Dissolve vial contents in the labelled amount of substrate solvent.

Mix carefully once more before using.

Storage and Stability

Store the test kit unopened at +2 to +8 °C and use by the date given on the label.

Stability after reconstitution:

Temperature	C1-Esterase	Substrate Reagent
+37 °C	8 hours	1 week
+30 °C	1 day	2 weeks
+15 to +25 °C	1 week	2 weeks
+2 to +8 °C	2 weeks	6 weeks
-20 °C	1 month	6 months

Stored in their original vials the C1-Esterase can be frozen up to 3 times, the substrate up to 10 times. Different coagulation analyzers have individual stability data.

Materials required but not provided

Standard Human Plasma, Code No. ORKL

Control Plasma N, Code No. ORKE

Control Plasma P, Code No. OUPZ

Acetic acid 20% (only for the two-point method)

Imidazole buffer solution, Code No. OQAA or

Dade® Owren's Veronal Buffer, Code No. B4234 or

Dade® CA System Buffer, Code No. B4265 or

Physiological saline solution

Coagulation analyzer (see Chapter titled "Limitations of the Procedure")

Equipment

Berichrom* C1-Inhibitor can be used in a great number of coagulation analyzers.

Observe the operating instructions issued by the analyzer's manufacturer!

Specimens

To obtain the plasma, carefully mix 1 part sodium citrate solution (0.11 mol/L) with 9 parts venous blood, avoiding the formation of foam. Centrifuge immediately at no less than 1500 x g for at least 10 minutes.

Stability of the sample:

-20 °C 1 month

+ 2 to + 8 °C 2 days

+15 to +25 °C 6 hours

Plasma stored at -20 °C is to be thawed within 10 minutes at 37 °C after which the assay is to be performed within 2 hours. In some cases the assay can be performed using serum, however the plasma and serum values do not always correlate.

Procedure

Manual:

Semi-micro test:

cuvette: 1 cm path length

wavelength: 405 nm

test temperature: optionally +25 °C, +30 °C or +37 °C

Pre-warm the C1-esterase, substrate reagent and plastic cuvettes/tubes to the selected test temperature.

Pipetting scheme for the kinetic method

	C1-esterase enzyme value (CEV)	Sample
Isotonic saline	20 µL	–
Plasma sample	–	20 µL
C1-esterase	1000 µL	1000 µL
Mix and incubate at selected test temperature for exactly 5 min.		
Substrate Reagent	100 µL	100 µL
Mix and determine ΔA _{405 nm} /minute		
Photometer/Stopwatch: Read the absorbance within 30 seconds and start the stopwatch simultaneously. Read the absorbance again after exactly 60 and 120 seconds, and calculate the respective ΔA/minute values by subtraction, and calculate the mean of the two values.		

Test mixtures for the Chromotimer: Use the same incubation times but half the volumes of sample and reagents.

Evaluation, kinetic method

Each assay series requires at least one C1-esterase enzyme value (ΔA/min_{CEV}) and one reference measurement value, which is determined using a reference plasma with an assigned value for C1-inhibitor (e.g. Standard Human Plasma) as the sample. These values are used to calculate the laboratory-internal factor F_L:

$$F_L = \frac{\text{Assigned value (\% of the norm)}_{\text{reference plasma}}}{\Delta A / \text{minute}_{\text{CEV}} - \Delta A / \text{minute}_{\text{reference plasma}}}$$

The C1-inhibitor content of the sample in % of the norm can then be calculated from the following formula:

$$\text{C1-inhibitor}_{\text{sample}} (\% \text{ of the norm}) = F_L \times (\Delta A / \text{minute}_{\text{CEV}} - \Delta A / \text{minute}_{\text{sample}})$$

Pipetting scheme for the two-point method

Pre-warm the C1-esterase, substrate reagent and plastic cuvettes/tubes to +37 °C.

	C1-esterase enzyme value (CEV)	Sample	Sample blank
Isotonic saline	20 µL	–	1100 µL
Plasma sample	–	20 µL	20 µL
C1-esterase	1000 µL	1000 µL	–
Mix and incubate for exactly 5 min at +37 °C.			
Substrate Reagent	100 µL	100 µL	–
Mix immediately and start the stopwatch simultaneously. After exactly 2 min, add:			
Acetic acid 20%	500 µL	500 µL	500 µL
Mix immediately and read the absorbance against the sample blank within 60 min.			

Evaluation, two-point method

Each assay series requires at least one C1-esterase enzyme value (A_{CEV}) and one reference measurement value, which is determined using a reference plasma with an assigned value for C1-inhibitor (e.g. Standard Human Plasma) as the sample. These values are used to calculate the laboratory-internal factor F_L:

$$F_L = \frac{\text{Assigned value (\% of the norm)}_{\text{reference plasma}}}{A_{\text{CEV}} - A_{\text{reference plasma}}}$$

The C1-inhibitor content of the sample in % of the norm can then be calculated from the following formula:

$$\text{C1-inhibitor}_{\text{sample}} (\% \text{ of the norm}) = F_L \times (A_{\text{CEV}} - A_{\text{sample}})$$

Notes

1. Doubling or halving the volumes used in the test mixtures has no effect on the calculation or laboratory-internal calculation factor.
2. F_L is a calculation factor established within the laboratory and needs to be determined only once in an assay series. This method of evaluation is not dependent on the selected test temperature and is basically equivalent to an evaluation via a reference curve.
3. If the sample has a C1-inhibitor content above 150% of the norm, the assay should be repeated using a sample prediluted 1+1 with isotonic saline. In this case the result is then multiplied by 2. If the sample has a C1-inhibitor content below 20% of the norm it is recommended to use 40 µL sample in the test. The result is divided by 2.
4. The laboratory-internal factor F_L or the calibration curve must be re-determined for each change of device and for each new lot of Berichrom* C1-Inhibitor.

Automatic:

Special instructions for coagulation analyzers may be obtained from Dade Behring by request.

Internal quality control

Normal range: Control Plasma N

Pathological range: Control Plasma P

Two controls should be measured with each calibration and at least every 8 hours during each testing day (one in the normal range and one in the pathological range). The controls should be processed just like the samples. Each laboratory should determine its own quality control range, either by means of the target values and ranges provided by the manufacturer of the controls or by means of its own confidence level established in the laboratory. If the measured control value lies outside the confidence level previously established, then the reagents, the laboratory-internal factor F_L and/or the calibration curve and the coagulation analyzer should be examined.

Limitations of the Procedure

There are appropriate coagulation analyzers for which Dade Behring provides operating instructions. The utilization of Berichrom* C1-Inhibitor in other coagulation analyzers must be validated by the testing laboratory. In doing so, performance data other than that provided may be obtained. Interference may be caused by high levels of lipids in the plasma samples.

Reference Interval

70–130%²

Systematic deviations from these ranges may be determined by the particular device. It may be necessary to calculate your own reference range in the laboratory.

Specific Performance Characteristics

Precision

The precision of Berichrom* C1-Inhibitor on the BCT* was estimated with Control Plasma N and Control Plasma P from a total of 8 separate runs over 5 testing days. The intra-assay coefficients of variation (CV) ranged between 1.8% and 7.9% and the inter-assay CV were between 3.2% and 6.6%.

Bibliography

1. Harpel P C: Blood Proteolytic Enzyme Inhibitors, in: Haemostasis and Thrombosis, Colman R W et al. (eds), Lippincott, Philadelphia (1987), 219–234
2. Thomas L: Komplement-System, in: Labor und Diagnose (4. erw. Auflage), Med. Verl.-Ges., Marburg (1992), 964–980
3. U.S. Department of Health and Human Services CDC, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication (CDC) 93-8395; 1999; Section II; 8-16

Dade is a registered trademark of Dade Behring, Inc. in the USA, Germany and other countries.

* Berichrom and BCT are registered trademarks of Dade Behring Marburg GmbH in Germany and other countries.

 Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg
www.dadebehring.com

USA Distributor: Dade Behring Inc.
Newark, DE 19714 U.S.A.



Berichrom* C1-Inhibitor

Reagenzien zur Bestimmung von C1-Inhibitor

Anwendungsbereich

Bestimmung der funktionellen Aktivität von C1-Inhibitor in Plasma zur Diagnose von verminderter C1-Inhibitor-Synthese, erhöhtem Verbrauch und zur Überwachung einer Substitutionstherapie bzw. einer Therapie mit Steroiden.

Diagnostische Bedeutung

C1-Inhibitor ist der einzige Inhibitor für die aktivierten Komplementkomponenten C1r und C1s, die am Beginn des klassischen Weges der Komplement-Aktivierung stehen. C1-Inhibitor verhindert daher eine überschießende Aktivierung des Komplementsystems. Außerdem ist C1-Inhibitor der physiologisch bedeutendste plasmatische Inhibitor für den aktivierten Gerinnungsfaktor XIIa (FXIIa) und für Kalikrein, mit denen er schnell und irreversibel einen inaktiven Komplex bildet. Damit ist C1-Inhibitor der wichtigste Regulator der Kontaktphase¹.

Ein erblicher Mangel an C1-Inhibitor ruft das hereditäre angioneurotische Ödem (HANE), eine Sonderform des Quincke-Ödems, hervor². Erworbene Mangelzustände kommen bei malignen Erkrankungen, Leberzirrhose, Präeklampsie, Pneumonie und anderen Infektionen vor. Die Bestimmung des C1-Inhibitors ist darüberhinaus indiziert zur Überwachung einer Substitutionstherapie mit C1-Inhibitor bzw. einer Therapie mit Steroiden.

Prinzip der Methode

C1-Inhibitor der Probe hemmt vorgelegte C1-Esterase. Die Restaktivität der C1-Esterase wird in einem kinetischen Test mit Extinktionszunahme bei 405 nm nach folgendem Reaktionsschema bestimmt:

C1-Inhibitor_{Probe} + C1-Esterase ^{Überschuß} —————> [C1-Inhibitor-C1-Esterase]
+ C1-Esterase _{Rest}

MeOC-Lys(ε-Cbo)-Gly-Arg-pNA ^{C1-Esterase _{Rest}} —————> MeOC-Lys(ε-Cbo)-Gly-Arg-OH
+ p-Nitroanilin

Reagenzien

Inhalt der Handelspackung

Berichrom C1-Inhibitor, Testkit, Bestell-Nr. OUIA mit

3 x für 5 ml C1-Esterase

3 x für 1 ml Substrat-Reagenz

1 x 3 ml Substrat-Lösungsmittel

Zusammensetzung

C1-Esterase (human), lyophilisiert; Konzentration in der Gebrauchslösung:

KH₂PO₄ 65 mmol/l, Lysin 1 g/l, Mannit 5 g/l, pH 7,5

Konservierungsmittel:

5-Chlor-2-methyl-4-isothiazol-3-on (max. 8 mg/l) und 2-Methyl-4-isothiazol-3-on (max. 2 mg/l)

Substrat-Reagenz, lyophilisiert; Konzentration in der Gebrauchslösung:

Methyloxyacetyl-L-Lysyl(ε-Carbobenzoxyl)-Glycyl-L-Arginyl-p-Nitroanilid (MeOC-Lys(ε-Cbo)-Gly-Arg-pNA) 5 mmol/l, Mannit 20 g/l

Substrat-Lösungsmittel: Polypropylyenglycol, 100 g/l

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur zur *in vitro* diagnostischen Anwendung.

2. Alle aus menschlichem Gewebe oder Körperflüssigkeiten gewonnenen Materialien sollten wegen nie völlig auszuschließender Gefährdung durch Krankheitserreger mit angemessener Sorgfalt unter Einhaltung der bei Biogefährdung empfohlenen Sicherheitsmaßnahmen gehandhabt werden³.

Vorbereitung der Reagenzien

C1-Esterase (human): Inhalt der Flasche mit der auf dem Etikett angegebenen Menge dest. Wasser lösen.

Substrat-Reagenz: Inhalt der Flasche mit der auf dem Etikett angegebenen Menge Substrat-Lösungsmittel lösen.

Reagenzien vor Gebrauch noch einmal vorsichtig mischen.

Haltbarkeit und Lagerungsbedingungen

Der Testkit ist ungeöffnet bei +2 bis +8 °C zu lagern und bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum verwendbar.

Stabilität nach Rekonstitution:

Temperatur	C1-Esterase	Substrat-Reagenz
+37 °C	8 Stunden	1 Woche
+30 °C	1 Tag	2 Wochen
+15 bis +25 °C	1 Woche	2 Wochen
+2 bis +8 °C	2 Wochen	6 Wochen
-20 °C	1 Monat	6 Monate

C1-Esterase kann in der Originalflasche bis zu 3 mal, das Substrat bis zu 10 mal eingefroren werden.

Die verschiedenen Gerinnungsmeßgeräte haben individuelle Stabilitätsdaten.

Zusätzlich benötigte Materialien

Standard-Human-Plasma, Bestell-Nr. ORKL

Kontroll-Plasma N, Bestell-Nr. ORKE

Kontroll-Plasma P, Bestell-Nr. OUPZ

Essigsäure 20%ig (nur für die Zweipunkt-Methode)

Imidazol-Pufferlösung, Bestell-Nr. OQAA oder

Dade® Owren's Veronal-Puffer, Bestell-Nr. B4234 oder

Dade® CA-System Puffer, Bestell-Nr. B4265 oder

Physiologische Kochsalzlösung

Gerinnungsmeßgerät (siehe Kapitel "Einschränkungen der Testdurchführung")

Geräte

Berichrom* C1-Inhibitor kann an einer Vielzahl von Gerinnungsmeßgeräten verwendet werden.

Bedienungsanleitung des Geräteherstellers beachten!

Untersuchungsmaterial

Zur Plasmagewinnung 1 Teil Natriumcitrat-Lösung 0,11mol/l mit 9 Teilen Venenblut sorgfältig unter Vermeidung von Schaumbildung mischen. Sofort mindestens 10 min bei mindestens 1500 x g zentrifugieren.

Stabilität der Probe:

-20 °C 1 Monat

+ 2 bis + 8 °C 2 Tage

+15 bis +25 °C 6 Stunden

Bei -20 °C gelagerte Plasmen innerhalb von 10 min bei +37 °C auftauen und die Bestimmung dann innerhalb von 2 Stunden durchführen. In Einzelfällen ist auch die Bestimmung aus Serum möglich, jedoch ist eine Korrelation der Plasma- und Serumwerte nicht immer gegeben.

Testdurchführung

Manuell:

Halbmikroansatz:

Küvette: 1 cm Schichtdicke

Wellenlänge: 405 nm

Testtemperatur: wahlweise +25 °C, +30 °C oder +37 °C

C1-Esterase, Substrat-Reagenz sowie die Kunststoffküvetten bzw. -röhrchen auf die gewählte Testtemperatur vorwärmen.

Pipettierschema für die kinetische Methode

	C1-Esterase-Enzymwert (CEW)	Probe
isotonische Kochsalzlösung	20 µl	–
Plasma-Probe	–	20 µl
C1-Esterase	1000 µl	1000 µl
mischen und genau 5 min bei der gewählten Testtemperatur inkubieren.		
Substrat-Reagenz	100 µl	100 µl
mischen und ΔE _{405 nm} /min bestimmen Photometer/Stoppuhr: innerhalb von 30 sec die Extinktion ablesen und gleichzeitig die Stoppuhr starten. Nach genau 60 und 120 sec Ablesung wiederholen, die jeweiligen ΔE/min durch Differenzbildung berechnen und aus beiden Meßwerten den Mittelwert bilden.		

Testansatz für den Chromotimer: Bei gleichen Inkubationszeiten ist das Volumen von Probe und Reagenzien zu halbieren.

Auswertung, kinetische Methode

Für jede Meßserie ist mindestens ein C1-Esterase-Enzymwert (ΔE/min_{CEW}) und ein Referenzmeßwert, der mit einem Bezugsplasma mit Sollwertangabe für C1-Inhibitor (z. B. Standard-Human-Plasma) als Probe bestimmt wird, erforderlich. Damit wird der laborinterne Faktor F_L berechnet:

$$F_L = \frac{\text{Sollwert (\% der Norm)}_{\text{Bezugsplasma}}}{\Delta E/\text{min}_{\text{CEW}} - \Delta E/\text{min}_{\text{Bezugsplasma}}}$$

Der C1-Inhibitor-Gehalt der Probe in % der Norm ergibt sich dann nach folgender Formel:

$$C1\text{-Inhibitor}_{\text{Probe}} (\% \text{ d. N.}) = F_L \times (\Delta E/\text{min}_{\text{CEW}} - \Delta E/\text{min}_{\text{Probe}})$$

Pipettierschema für die Zweipunkt-Methode

C1-Esterase, Substrat-Reagenz sowie die Kunststoffküvetten bzw. -röhrchen auf +37 °C vorwärmen.

	C1-Esterase-Enzymwert (CEW)	Probe	Probenleerwert
isotonische Kochsalzlösung	20 µl	–	1100 µl
Plasma-Probe	–	20 µl	20 µl
C1-Esterase	1000 µl	1000 µl	–
mischen und genau 5 min bei +37 °C inkubieren.			
Substrat-Reagenz	100 µl	100 µl	–
sofort mischen und gleichzeitig die Stoppuhr starten. Nach genau 2 min Zugabe von:			
Essigsäure 20%	500 µl	500 µl	500 µl
sofort mischen und die Extinktion innerhalb von 60 min gegen Probenleerwert bestimmen.			

Auswertung, Zweipunkt-Methode

Für jede Meßserie ist mindestens ein C1-Esterase-Enzymwert (E_{CEW}) und ein Referenzmeßwert, der mit einem Bezugsplasma mit Sollwertangabe für C1-Inhibitor (z. B. Standard-Human-Plasma) als Probe bestimmt wird, erforderlich. Damit wird der laborinterne Faktor F_L berechnet:

$$F_L = \frac{\text{Sollwert (\% der Norm)}_{\text{Bezugsplasma}}}{E_{\text{CEW}} - E_{\text{Bezugsplasma}}}$$

Der C1-Inhibitor-Gehalt der Probe in % der Norm ergibt sich dann nach folgender Formel:

$$C1\text{-Inhibitor}_{\text{Probe}} (\% \text{ d. N.}) = F_L \times (E_{\text{CEW}} - E_{\text{Probe}})$$

Anmerkungen

- Eine Volumenverdopplung oder -halbierung hat keine Auswirkung auf die Berechnung und den laborinternen Faktor.
- F_L ist ein laborinterner Rechnungsfaktor und braucht in einer Meßserie nur einmal bestimmt zu werden. Die Auswertung ist unabhängig von der gewählten Testtemperatur und entspricht im wesentlichen einer Auswertung über eine Bezugskurve.
- Bei einem C1-Inhibitor-Gehalt der Probe über 150% der Norm sollte die Bestimmung mit einer Probe, die mit isotonischer Kochsalz-Lösung 1+1 vorverdünnt wurde, wiederholt werden. Das Ergebnis wird dann mit 2 multipliziert. Bei einem C1-Inhibitor- Gehalt der Probe unter 20% der Norm empfiehlt es sich, 40 µl Probe in den Test einzusetzen. Das Ergebnis wird durch 2 dividiert.
- Bei jedem Gerätewechsel und für jede Charge Berichrom* C1-Inhibitor muß der laborinterne Faktor F_L bzw. die Bezugskurve neu bestimmt werden.

Automatisch:

Spezielle Vorschriften für Gerinnungsmeßgeräte sind von Dade Behring auf Anfrage erhältlich.

Interne Qualitätskontrolle

Normalbereich: Kontroll-Plasma N

Pathologischer Bereich: Kontroll-Plasma P

Bei jeder Kalibration und mindestens alle 8 Stunden an jedem Testtag sollten zwei Kontrollen (eine im Normalbereich und eine im pathologischen Bereich) gemessen werden. Die Kontrollen sollten wie die Probe behandelt werden. Jedes Labor sollte seinen Qualitätskontrollbereich entweder anhand der vom Hersteller der Kontrollen angegebenen Sollwerte und -bereiche oder anhand des im Labor bestimmten Vertrauensbereiches festlegen. Liegt der gemessene Kontrollwert außerhalb des vorher festgelegten Vertrauensbereiches, sollten Reagenzien, der laborinterne Faktor F_L bzw. die Bezugskurve und das Gerinnungsmeßgerät überprüft werden.

Einschränkungen der Testdurchführung

Es sind Gerinnungsmeßgeräte geeignet, für die Dade Behring Anwendungsvorschriften bereitstellt. Die Verwendung von Berichrom* C1-Inhibitor an anderen Gerinnungsmeßgeräten muß vom Untersuchungslabor validiert werden. Dabei können andere als die angegebenen Leistungsdaten erhalten werden.

Die Bestimmung kann durch stark lipämische Plasmen gestört werden.

Referenzbereich

70–130%²

Systematische Abweichungen von diesen Bereichen können gerätebedingt sein. Gegebenenfalls muß ein eigener Referenzbereich durch das Labor erstellt werden.

Leistungsmerkmale des Tests

Präzision

Die Präzision von Berichrom* C1-Inhibitor am BCT* wurde mit Kontroll-Plasma N und Kontroll-Plasma P an 5 Tagen in 8fach-Bestimmung getestet. Der Variationskoeffizient in der Serie lag bei 1,8% und 7,9% und von Tag zu Tag bei 3,2% und 6,6%.

Literatur

Siehe Seite 1.

Dade ist eine eingetragene Marke der Dade Behring Inc. in den USA, Deutschland und anderen Ländern.

* Berichrom und BCT sind eingetragene Marken der Dade Behring Marburg GmbH in Deutschland und anderen Ländern.

 Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg
www.dadebehring.com

