

Complement Reagents

for the kinetic determination of the activity of the total complement

Intended Use

The complement reagents permit investigation of the functional capacity of the entire complement system. The complement components covered are those of the classical pathway as well as of the alternative pathway. Inhibitory components of the complement system are not covered. Used in combination with the appropriate deficient plasma or serum, the reagents permit quantitative measurement of the activity of individual components of the complement system.

Summary and Explanation

The complement system is an endogenous plasmatic defence system. It is activated either by antigen-antibody complexes (classical pathway) or by foreign surfaces (alternative pathway). Pathological conditions may result in a reactive increase in the concentrations of the individual components (acute-phase reaction). Diminished activities are found as a result of consumption or congenital deficiencies.

Like the CH50 test, the method measures the functional activity of the complement. The test is therefore suitable for detecting hereditary defects as well as acquired deficiencies (e.g. due to immune complex diseases such as glomerulonephritis, systemic lupus erythematosus, generalized vasculitis or cryoglobulinaemia) and for monitoring their course.

Principle of the Method

Incubation of the sample with sensitized erythrocytes leads to activation of the classical complement pathway via C1q, C3b formed by C3 convertase becomes a component of C5 convertase as well as an initiator of the amplification reaction with the involvement of Factor B and Factor D. This process also results in the formation of alternative C5 convertase. C5b released by C5 initiates the lysis reaction with the involvement of the remaining Factors C6 to C9.

The lysis of the erythrocytes leads to a decrease in the optical density. The time taken for the lysis of a defined quantity of erythrocytes is used as a basis for determining the complement activity. Deficiencies or diminished levels of individual components (e.g. due to prior activation of the complement system) result in a prolongation of the time taken for lysis. Shorter times are obtained when the levels of complement proteins are increased in reaction to corresponding causative events.

Reagents

Materials provided

Complement Reagents, Test kit, Code No. OWZD with

5 x for 5 mL	Erythrocyte Reagent
1 x 25 mL	Ambceptor Reagent

Composition:

Erythrocyte Reagent: Sheep erythrocytes in stabilizer solution (sodium chloride approximately 9 g/L, HEPES 2.4 g/L).

Preservatives: 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazole-3-one (0.37 g/L), 2-methyl-4-isothiazole-3-one (0.13 g/L).

Ambceptor Reagent: Rabbit antibodies to sheep erythrocytes, sodium chloride, calcium chloride and magnesium chloride, HEPES (2.4 g/L).

Preservative: Sodium azide (0.5 g/L).

Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- As complete absence of infectious agents can never be assured, all samples (e.g. patient plasma) and products (e.g. standard and control preparations) derived from human blood should be handled with due care, observing the precautions recommended for biohazardous material.³
- Reagents containing sodium azide must be handled with due caution: Do not ingest or allow to contact skin or mucous membranes! Sodium azide can form explosive azides when contacting heavy metals such as copper or lead.

Preparation of Reagents

Before the first use, carefully resuspend the erythrocytes by means of gentle swirling. Watch for erythrocytes adhering to the stopper! Next mix the Erythrocyte Reagent with the labelled volume of Ambceptor Reagent and leave to stand at +37 °C for approx. 45 min. Shake briefly before use and bring to +37 °C.

Storage and Stability

Stored unopened at +2 to +8 °C the test kit can be used by the expiry date given on the label.

Stability of the freshly prepared reagent mixture:

+37 °C 4 hours

+2 to +8 °C 24 hours

Do not freeze the reagent!

The Erythrocyte Reagent must exhibit a bright red colour. If the reagent has developed a brown colour it must not be used in the assay.

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

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

Equipment

Complement Reagents can be used in a great number of coagulation analyzers.

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

Specimens

Citrated plasma or serum.

Stability of the sample:

-20 °C 1 month

+15 to +25 °C 4 hours

Samples stored at -20 °C are to be thawed at +37 °C within 10 min and then assayed within 2 hours.

Procedure

Manual:

Cuvette: 1 cm

Wave length: 578 nm (500 - 600 nm)

Test temperature: +37 °C

Recorder: 1 to 5 cm/minute

Prewarm plastic cuvettes to +37 °C. Used the sample in undiluted form.

Sample	50 µL
Reagent	1000 µL
Determination of the lysis time: Measure the time taken for the absorbance at 578 nm to decrease by 0.100.	

Procedure for the Chromotimer: Use half the volumes of sample and reagent. The Chromotimer automatically measures the lysis time and calculates the final result.

Automatic:

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

Evaluation

The results are evaluated using a reference curve prepared by serial dilution of a fresh plasma pool or standard plasma, e.g. Standard Human Plasma, with isotonic saline:

Complement activity	Standard plasma µL	Isotonic saline µL
100 %	100	0
75 %	75	25
50 %	50	50
25 %	25	75
10 %	10	90

In order to calibrate for 150 or 200 and 300 % the volume of the standard can be reduced to 75, 100 and 150 µL respectively. The lysis times of the standard series are determined in the above assay and plotted against the activity in percent of the norm on log-log graph paper.

The complement activity of the sample is read from the reference curve. If the labelled assigned value of the Standard Human Plasma is not 100 % of the norm, but e.g. only 95 %, the result read is multiplied by 0.95.

In order to improve the precision in the range below an activity of 50 %, the volume of sample used can be doubled. In this case the sample must be evaluated via a calibration curve prepared using the same ratio of sample to reagent.

Serum samples can also be evaluated from a calibration curve prepared using plasma.

The calibration curve must be re-determined for each change of device and for each new lot of Complement Reagents.

Internal Quality Control

A Control must be measured with each calibration and in each series of measurements. Suitable controls are Control Plasma N and Control Plasma P. 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 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 Complement Reagents in other coagulation analyzers must be validated by the testing laboratory. In doing so, performance data other than that provided may be obtained.

EDTA-containing samples must not be used in the assay.

Reference Interval

70 - 140 % of the norm

Systematic deviations from these ranges may be due to the instrument used. If necessary, the laboratory will have to establish its own reference intervals.

Specific Performance Characteristics

Measuring Range

The measuring range extends from 10 to 300 % of the norm.

Specificity

The test covers the classical as well as the alternative pathways of the complement system but not the inhibitory components.

Precision

For normal plasma samples the intra-assay coefficients of variation range between 2.7 and 6.5 % for manual pipetting and from 0.8 to 2.5 % for automatic pipetting. The inter-assay CV was found to be 4.6 (manual method) and 1.7 % (automatic method).

For pathological plasma samples the corresponding intra-assay values ranged between 4.3 and 14 % or 0.8 and 5.3 % respectively. The inter-assay CV was found to be 5.5 (manual method) and 2.4 % (automatic method).

Bibliography

- H-J Kolde, R Deubel: Development of a Rapid Kinetic Assay for the Function of the Classical Pathway of the Complement System and for C2 and C4. J. Clin. Lab. Immunol. **21** (1986) 201-207
- H G Siedentopf, K Lauenstein, H Fischer: Über die automatische Registrierung der Hämolysen durch Serumkomplexe und Lyssolecitin. Z. Naturforsch. **20b** (1965) 569-574
- 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 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.



Komplement-Reagenzien

zur kinetischen Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements

Anwendungsbereich

Mit den Komplement-Reagenzien kann das gesamte Komplementsystem auf Funktionsfähigkeit überprüft werden. Es werden sowohl der klassische Weg als auch die Komponenten des alternativen Wegs erfaßt. Nicht erfaßt werden inhibitorische Komponenten des Systems. In Kombination mit dem entsprechenden Mangelplasma oder -serum kann die Aktivität einzelner Komponenten des Komplementsystems quantitativ bestimmt werden.

Diagnostische Bedeutung

Das Komplementsystem ist ein plasmatisches Abwehrsystem des Körpers. Es wird entweder durch Antigen-Antikörper-Komplexe (klassischer Weg) oder durch Fremdoberflächen (alternativer Weg) aktiviert. Bei pathologischen Zuständen kann es zu einer reaktiven Erhöhung der Konzentration der einzelnen Bestandteile kommen (akute Phase-Reaktion). Durch Verbrauch oder angeborene Mängel werden erniedrigte Aktivitäten gefunden.

Analog zum CH50-Test wird die funktionelle Aktivität gemessen. Der Test ist daher geeignet, hereditäre Defekte sowie erworbene Mängel (z. B. bei Immunkomplexkrankheiten wie Glomerulonephritis, Systemischer Lupus Erythematoses, generalisierte Vaskulitis oder Kryoglobulinämie) und deren Verlauf zu bestimmen.

Prinzip der Methode

Die Inkubation der Probe mit sensibilisierten Erythrozyten führt zu einer Aktivierung des klassischen Wegs des Komplements über C1q. Durch die C3-Konvertase gebildetes C3b wird sowohl Bestandteil der C5-Konvertase als auch Initiator der Amplifizierungsreaktion unter Beteiligung von Faktor B und Faktor D. Dabei wird auch die alternative C5-Konvertase gebildet. Aus C5 freigesetztes C5b initiiert die Lysereaktion unter Beteiligung der restlichen Faktoren C6 bis C9. Durch die Lyse der Erythrozyten kommt es zu einem Abfall der optischen Dichte. Die Zeit für die Lyse einer vorgegebenen Menge an Erythrozyten wird zur Bestimmung der Komplement-Aktivität herangezogen. Mängel oder Erniedrigungen einzelner Komponenten (z. B. durch vorherige Aktivierung des Komplementsystems) führen zu einer Verlängerung der zur Lyse benötigten Zeit. Verkürzte Werte ergeben sich, wenn durch Reaktion auf entsprechende Auslöser die Komplementproteine erhöht sind.

Reagenzien

Inhalt der Handelspackung

Komplement-Reagenzien, Testkit, Bestell-Nr. OWZD mit

5 x für 5 ml Erythrozyten-Reagenz

1 x 25 ml Ambozeptor-Reagenz

Zusammensetzung:

Erythrozyten-Reagenz: Erythrozyten vom Schaf in einer Stabilisatorlösung (Natriumchlorid ca. 9 g/l, HEPES 2,4 g/l).

Konservierungsmittel: 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazol-3-on (0,37 g/l)

2-Methyl-4-isothiazol-3-on (0,13 g/l).

Ambozeptor-Reagenz: Antikörper gegen Schaf-Erythrozyten vom Kaninchen, Natrium-, Calcium- und Magnesiumchlorid, HEPES (2,4 g/l).

Konservierungsmittel: Natriumazid (0,5 g/l).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur zur *in vitro* diagnostischen Anwendung.
2. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Proben (z. B. Patientenplasmen) und Produkte (z. B. Standard- und Kontrollplasmen) sollten wegen nie völlig auszuschließender Gefährdung durch Krankheitserreger mit angemessener Sorgfalt unter Einhaltung der bei Biogefährdung empfohlenen Sicherheitsmaßnahmen gehandhabt werden³.
3. Beim Umgang mit Natriumazid-haltigen *in-vitro*-Diagnostika ist zu beachten: Verschlucken und Berühren mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Natriumazid kann mit Schwermetallen, wie Kupfer oder Blei, explosive Azide bilden.

Vorbereitung der Reagenzien

Die Erythrozyten werden vor dem erstenmaligen Gebrauch sorgfältig durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Auf Erythrozyten achten, die am Stopfen haften! Anschließend wird das Erythrozyten-Reagenz mit der auf dem Etikett angegebenen Menge Ambozeptor-Reagenz versetzt und ca. 45 min bei +37 °C zur Reaktion stehen gelassen. Vor Gebrauch kurz aufschütteln und auf +37 °C bringen.

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 Mischen der Gebrauchslösung:

+37 °C 4 Stunden

+2 bis +8 °C 24 Stunden

Reagenz nicht einfrieren!

Das Erythrozyten-Reagenz muß hellrot gefärbt sein. Bei einer Braunfärbung darf es nicht mehr zur Bestimmung eingesetzt 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

Gerinnungsmeßgerät (siehe Kapitel "Einschränkungen der Testdurchführung")

Geräte

Komplement-Reagenzien können an einer Vielzahl von Gerinnungsmeßgeräten verwendet werden.

Bedienungsanleitung des Geräteherstellers beachten!

Untersuchungsmaterial

Citratplasma oder Serum.

Stabilität der Probe:

-20 °C 1 Monat

+15 bis +25 °C 4 Stunden

Bei -20 °C gelagerte Proben innerhalb von 10 min bei +37 °C auftauen und die Bestimmung dann innerhalb von 2 Stunden durchführen.

Testdurchführung

Manuell:

Küvette: 1 cm

Wellenlänge: 578 nm (500 - 600 nm)

Testtemperatur: +37 °C

Schreiber: 1 bis 5 cm/min

Kunststoffküvetten auf +37 °C vorwärmen. Die Probe wird unverdünnt eingesetzt.

Probe	50 µl
Reagenz	1000 µl

Bestimmung der Lysezeit: Es wird die Zeit gemessen, in der die Extinktion bei 578 nm um 0,100 abnimmt.

Durchführung der Bestimmung am Chromotimer: Die Volumina für Proben und Reagenz werden halbiert. Die Messung der Lysezeit und die Berechnung des Endergebnisses erfolgen am Chromotimer automatisch.

Automatisch:

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

Auswertung

Die Auswertung erfolgt anhand einer Bezugskurve, die durch serielle Verdünnung eines Frischplasma pools oder eines Standard-Plasmas, z. B. Standard-Human-Plasma, mit isotonischer Kochsalzlösung erstellt wird:

Komplement-Aktivität	Standard - Plasma µl	isot. Kochsalz µl
100 %	100	0
75 %	75	25
50 %	50	50
25 %	25	75
10 %	10	90

Um bei 150, 200 und 300% zu kalibrieren, kann das Volumen des Standards auf 75, 100 bzw. 150 µl erhöht werden. Die Lysezeiten der Standardreihe werden im obigen Ansatz bestimmt und gegen die Aktivität in % der Norm auf doppeltlogarithmischem Papier aufgetragen.

Die Komplement-Aktivität der Probe wird an der Bezugskurve abgelesen. Beträgt der angegebene Sollwert im Standard-Human-Plasma nicht 100% der Norm, sondern z. B. nur 95%, so wird das abgelesene Ergebnis mit 0,95 multipliziert.

Um die Präzision im Bereich unter 50% Aktivität zu verbessern, kann auch das doppelte Probenvolumen eingesetzt werden. Es ist dann erforderlich, an einer mit dem gleichen Verhältnis Probe zu Reagenz erhaltenen Eichkurve auszuwerten.

Serumproben können auch an einer mit Plasma erhaltenen Bezugskurve ausgewertet werden. Bei jedem Gerätewechsel und für jede Charge Komplement-Reagenzen muß die Bezugskurve neu bestimmt werden.

Interne Qualitätskontrolle

Bei jeder Kalibrierung und für jede Meßserie muß eine Kontrolle mitgeführt werden. Als Kontrolle können Kontroll-Plasma N und Kontroll-Plasma P verwendet werden. Das Kontrollmaterial sollte 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, Bezugskurve und Gerinnungsmeßgerät überprüft werden.

Einschränkungen der Testdurchführung

Es sind Gerinnungsmeßgeräte geeignet, für die Dade Behring Anwendungsvorschriften bereitgestellt. Die Verwendung von Komplement-Reagenzien an anderen Gerinnungsmeßgeräten muß vom Untersuchungslabor validiert werden. Dabei können andere als die angegebenen Leistungsdaten erhalten werden.

EDTA-haltige Proben dürfen nicht zur Bestimmung eingesetzt werden.

Referenzbereich

70 - 140% der Norm

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

Leistungsmerkmale des Tests

Meßbereich

Der Meßbereich reicht von 10 bis 300% der Norm.

Spezifität

Der Test erfaßt sowohl den klassischen als auch den alternativen Teil des Komplementsystems, nicht jedoch die inhibitorischen Bestandteile.

Präzision

Für Normalplasmen wurden Variationskoeffizienten in der Serie bei manueller Pipettierung zwischen 2,7 und 6,5% und bei automatischer Pipettierung zwischen 0,8 und 2,5% gefunden. Von Tag zu Tag wurde ein VK von 4,6 (manuell) bzw. 1,7% (automatisiert) gefunden.

Für pathologische Plasmen lagen die entsprechenden Werte in der Serie zwischen 4,3 und 14% bzw. 0,8 und 5,3%. Von Tag zu Tag wurde ein VK von 5,5 (manuell) bzw. 2,4% (automatisiert) gefunden.

Literatur

Siehe Seite 1.

