

Instruction  
**WIESLAB® Complement system**  
Classical pathway  
Qualitative and Semi-Quantitative test

For in vitro diagnostic use

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 control and activity control at -20° C



Doc. no. LABEL-DOC-0031 7.0

Effective Date: 22-Jan-2026

**WIESLAB® Complement system**  
**Classical pathway**

English: page ..... 1

[Czech: page ..... 17](#)

[Estonian: page ..... 33](#)

[French: page ..... 50](#)

[German: page ..... 67](#)

[Hungarian: page ..... 85](#)

[Icelandic: page ..... 103](#)

[Italian: page ..... 119](#)

[Norwegian: page ..... 137](#)

[Portuguese: page ..... 153](#)

[Serbian: page ..... 171](#)

[Spanish: page ..... 188](#)

[Swedish: page ..... 206](#)

## 1. INTENDED USE

The WIESLAB® Complement system Classical pathway (CP) kit 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.

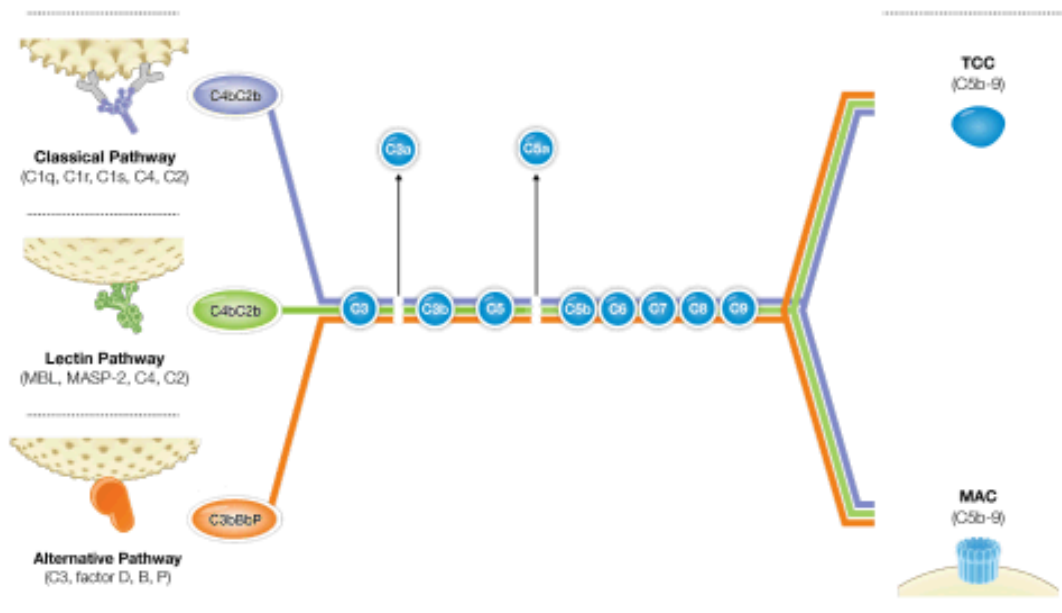
FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION

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



**Figure 1:** Schematic figure of the complement system. The complement system can be activated via the classical, MBL (Lectin), or alternative pathway by different activating molecules. Upon activation C3 convertases are formed which in turn cleave C3 and subsequently C5 can be cleaved. Cleavage of C5 to C5b initiates the formation of the MAC complex (also called terminal complement complex (TCC) or C5b-9).

### 3. PRINCIPLE OF WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY

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

In the Complement system Classical pathway kit, the wells of the microtitre strips are coated with a specific activator of the classical pathway. The plate 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 Membrane Attack Complex (MAC) 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).

#### Metrological traceability

The value assigned to the positive control is defined as 100 % of a normal complement pathway activity and is not traceable to SI units. It is assigned using pooled human normal sera assessed with the described ELISA assay procedure with an internal reference system as the highest calibration hierarchy level.

### 4. WARNINGS, CAUTIONS 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 in to 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.
- Do not use components past the expiration date.
- Kit reagents are kit specific and should not be mixed between kit lots.
- Dispose of all used components, used/leftover samples and leftover controls as biohazardous waste according to local regulations. Dispose of other leftover components as hazardous waste according to local regulations.
- Any serious incident that has occurred in relation to this device shall be reported to Svar Life Science AB and the competent authority of the EU Member State or country in which the user/patient is established.

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-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)" May produce an allergic reaction.

EUH210: Safety data sheet available on request.

## 5. KIT CONTENTS

- 1 sealed microtitre plate with break-apart wells (12x8) coated with human IgM.
- 2 vials (35 mL) Diluent CP (Dil CP), labelled blue.
- 1 vial (0.2 mL) negative control (NC) containing human serum (to be diluted as for a patient serum sample).
- 1 vial (0.2 mL) positive control (PC) containing lyophilized human serum, see section 9.3 "Reconstitution of positive control", below.
- 1 vial (vol, see CoA) activity control (AC) for semi-quantitative application, containing lyophilized human serum (different origin than PC), see section 9.3.1 "Reconstitution of activity control" under procedure for semi-quantitative application.
- 1 vial (13 mL) conjugate containing alkaline phosphatase-labelled antibodies to C5b-9 (blue colour).
- 1 vial (13 mL) Substrate solution pNPP, ready to use.
- 1 vial (30 mL) wash solution, 30x concentrated.

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

## 6. 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.
- Incubator capable of maintaining 37°C. If a CO<sub>2</sub> cabinet is used, make sure that the CO<sub>2</sub> supply is disconnected/off

## 7. HANDLING AND STORAGE

- The reagents should be stored at 2-8°C except the positive and the activity control.
- All reagents in the kit are ready to use except wash solution and controls.
- The positive and activity controls should be stored at -20°C until reconstitution.
- The reconstituted positive and activity control should be stored at < -70°C and may be thawed once.

## 8. SAMPLE PREPARATION

This test is performed on serum specimens. 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 haemolysed. Heat-inactivated sera cannot be used. Plasma cannot be used. The Clinical and Laboratory Standards Institute provides recommendations for storing blood specimens (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. PREPARATION AND HANDLING OF REAGENTS

### 9.1 Preparation of washing solution

In case salt crystals are observed in the vial with concentrated wash solution, place the vial at 37°C in a 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.

### 9.2 Negative Control (NC)

NC should be diluted as a patient serum sample.

### 9.3 Reconstitution of positive control (PC)

Reconstitute the PC according to the following procedure:

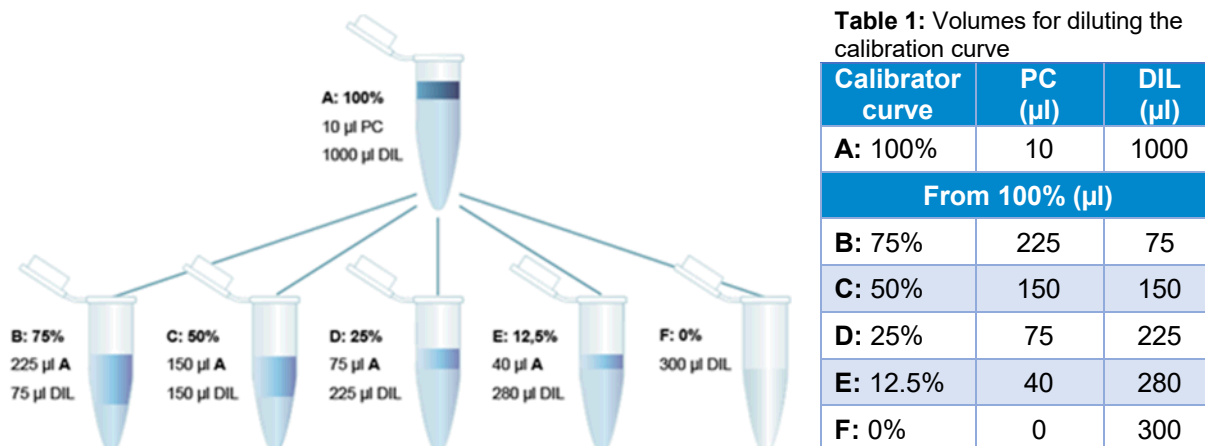
1. Gently tap down all lyophilized material to the bottom of the vial and remove the cap.
2. Immediately add 200 µL of distilled water directly to the lyophilized material.
3. Replace the cap.
4. Allow the vial to stand on ice for 5 minutes and then gently shake or vortex occasionally until completely dissolved.
5. For further dilution, See section 9.3.1 or 9.3.2 for semi-quantitative and qualitative protocol, respectively.

The reconstituted PC 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.

#### 9.3.1. Semi-quantitative protocol

##### Preparation of calibration curve

For dilution of reconstituted PC to calibrators please see Figure 2 and Table 1. The calibrator can be left at room temperature up to 1 h before use. The calibrator must be prepared fresh and cannot be stored for later usage.



**Figure 2:** Dilution scheme for calibrator curve. Reconstituted positive control (PC) is mixed with kit diluent (DIL) according to the table.

### Reconstitution of activity control (AC)

1. Gently tap down all lyophilized material to the bottom of the vial and remove the cap.
2. Add immediately the volume distilled water indicated in the CoA /AC label directly to the lyophilized material.
3. Reattach the cap.
4. Allow the vial to stay on ice for 5 minutes and then shake or vortex gently until complete dissolution.
5. 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 should be stored at <-70°C and may be thawed once.

### 9.3.2. Qualitative protocol

Dilute the reconstituted positive control according to the instructions in section 9.4: Dilution of samples.

### 9.4 Handling of Serum

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

### Dilution of samples

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.

## 10. ASSAY PROCEDURE

### 10.1. Rinsing protocol

Empty the wells and wash 3 times with 300  $\mu$ 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.

### 10.2 Plate layout

#### 10.2.1 Semi-quantitative protocol

Pipet 100  $\mu$ L/well in duplicate of calibrator (100%-0%), NC, AC and diluted serum samples (P) according to Table 2. The 0% calibrator should be used as a blank.

**Table 2:** Suggested plate layout, semi-quantitative protocol

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
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										

#### 10.2.2. Qualitative protocol

Pipet 100  $\mu$ L/well in duplicate of Diluent as a blank, PC, NC and diluted serum samples (P) according to Table 3.

**Table 3:** Suggested plate layout, qualitative protocol

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dil CP	P2										
B	Dil CP	P2										
C	PC	etc										
D	PC											
E	NC											
F	NC											
G	P1											
H	P1											

### 10.3. Assay protocol

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.

#### 1. Incubation of samples

Fill the plate according to section 10.2. Incubate for 60-70 minutes at +37°C with lid. Please note that no incubation should be performed under CO<sub>2</sub> atmosphere. If a CO<sub>2</sub> cabinet is used, make sure that the CO<sub>2</sub> supply is disconnected/off.

#### 2. Wash

Wash the plate according to section 10.1: Rinsing protocol.

#### 3. Conjugate incubation

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

#### 4. Wash

Wash 3 times as before.

#### 5. Substrate incubation

Add 100 µL substrate solution to each well, incubate for 30 minutes at room temperature (+20-25°C).

#### 6. Reading the plate

Read the absorbance (OD) at 405 nm on a microplate reader.

Optional: 5 mM EDTA can be used as stop solution, 100 µL/well. Read the absorbance of the wells within 60 minutes.

## 11. QUALITY CONTROL

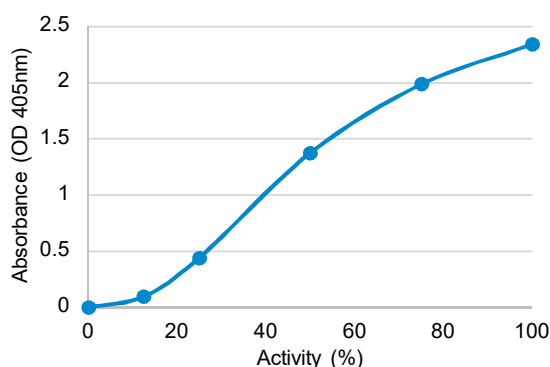
Certificate of Analysis (CoA) included in the kit is lot specific and is to be used to verify results obtained by our laboratory. The results indicated on CoA are to be used as a guideline only. The results obtained by your laboratory may differ.

The OD of the PC should be >1.0 and the OD of the NC <0.2 after subtraction of the blank (Dil CP, 0%). If any of the controls are not within their respective ranges, the test should be considered invalid and then repeated.

## 12. INTERPRETATION OF RESULTS

### 12.1. Semi-quantitative protocol

Subtract the absorbance of the 0 % - calibrator from all OD values. Curve fit 4-parameter logistic (Marquardt) is recommended. See an example of a standard curve in Figure 3.



**Figure 3:** Example of a standard curve. The figure above shows an example of a semi-quantitative standard curve and should not be used for actual patient sample interpretation.

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.

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

## 12.2. Qualitative protocol

It is recommended to use the OD results to calculate complement activity (% of PC) values for ease of interpretation. This calculation also facilitates comparisons between different analyses as OD is more prone to change from run to run. The method used to calculate complement activity is described below.

1. Subtract the absorbance of the blank (Diluent) from the absorbances of the NC, PC and the samples.
2. Calculate the mean OD values for the NC, PC and samples.
3. Calculate complement activity using the formula below:

$$\text{Complement activity (\% of PC)} = \frac{\text{Sample} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

The NC and PC are intended to monitor for substantial reagent failure. The PC will not ensure precision at the assay cut-off. It is recommended that each laboratory establishes its own reference level and cut-off value for deficiencies.

A negative result, i.e. deficiency, should always be verified by testing a new sample to ensure that no inadvertent *in vitro* complement activation has taken place prior to execution of the assay.

## 13. EVALUATION CRITERIA

### 13.1. 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. 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 pathway. A more complete and in-depth functional assessment of all three complement pathways may be achieved using WIESLAB® Complement system Screen kit as shown in Table 4.

**Table 4:** Combination of results in the different pathways and possible deficiencies

Classical pathway	MBL pathway	Alternative pathway	Possible deficiency
Positive	Positive	Positive	None
Negative	Positive	Positive	C1q, C1r, C1s
Positive	Positive	Negative	Factor B, D and P
Positive	Negative	Positive	MBL, MASP-2
Negative	Negative	Negative	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negative	Negative	Positive	C4, C2 or combination

## 13.2. 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 standardisation 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.

## 14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 14.1. Clinical performance

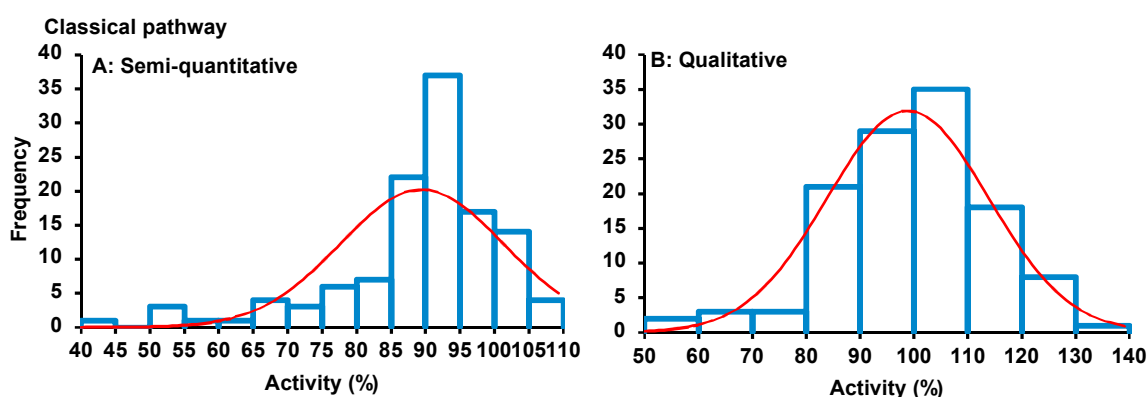
The normal distribution within 2SD (Standard Deviation) is indicated in Figure 4 and Table 5. Results within this range indicate a normal functionality of the classical pathway. It is recommended that each laboratory confirms or establishes their own reference range for the population they serve.

A value below the reference ranges 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 respective 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.

Sera from 120 apparently healthy blood donors were tested in the WIESLAB® Complement system Classical pathway, qualitative application. For the semi-quantitative application, the normal range is based on mathematical theoretical calculation. The complement activity of the 120 apparently healthy blood donors is summarized in Figure 4 and Table 5. In the study no blood donor was below 40 %.



**Figure 4:** Histogram of reference population analysed in classical pathway, semi-quantitative (A) and qualitative (B) protocol, respectively.

**Table 5:** Values for the 120 blood donors analysed with semi-quantitative and qualitative protocol, respectively.

Protocol	n	Mean (%)	±2SD (%)	Median (%)
<b>Semi-quantitative</b>	120	89	66-113*	92
<b>Qualitative</b>	120	99	69-129*	100

\*) This is a statistical calculation and will not guarantee a true cut-off. It's recommended that each laboratory establishes its own reference level and cut-off value for suspected deficiency.

Sera with known complement deficiencies and specific complement factor depleted sera were tested in the assay (Table 6 and 7). All deficient/depleted sera were low in the assay and gave values below 15% and 5%\*\* in the semi-quantitative and qualitative protocol, respectively.

\*\* 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

**Table 6:** Samples with known deficiencies

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

**Table 7:** Samples with depleted components

Depletion	C1q	C3	C4	C5	C7
<b>Number of depleted sera</b>	2	1	1	1	1
<b>Number of detected depletion</b>	2	1	1	1	1

## 14.2. Precision

### 14.2.1 Inter-assay precision

#### Semi-quantitative protocol

**Table 8:** Inter-assay precision for the semi-quantitative application was determined by testing seven samples in eight replicates on three different occasions.

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

#### Qualitative protocol

**Table 9:** Inter-assay precision for the qualitative application was determined by testing three samples in duplicate. Results were obtained for six different runs.

	1	2	3
<b>Mean value %</b>	98	92	21
<b>SD</b>	4.3	3.9	1.7
<b>CV %</b>	4	4	8

### 14.2.2 Intra-assay precision

#### Semi-quantitative protocol

**Table 10:** Intra-assay precision for the semi-quantitative application was determined by testing seven different samples in eight replicates on one occasion.

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

#### Qualitative protocol

**Table 11:** Intra-assay precision for the qualitative application was determined by testing one sample in 40 wells.

Assay	Mean value %	SD	CV %
<b>CP</b>	85	2.9	3

### 14.2.3 Batch-to-batch variation

#### Semi-quantitative protocol

**Table 12:** Batch to batch variation in the semi-quantitative application was determined by testing seven samples in duplicate on three different batches by three different persons.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Mean value %</b>	8	73	85	24	37	74	78
<b>SD</b>	0.80	14.55	12.50	1.32	1.91	7.46	6.08
<b>CV %</b>	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

### 14.3. Linearity

#### Semi-quantitative protocol

**Table 13:** 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
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
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

### 14.4. Detection limit

#### Semi-quantitative protocol

**Calibrator measurement range:** 12.5% - 100 %

**Limit of Detection (LoD) = 8%**

## 15. TROUBLESHOOTING

PROBLEM	POSSIBLE CAUSES	SOLUTION
<b>Control values out of range</b>	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 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.
<b>All test results negative</b>	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.
<b>All sample wells are visibly yellow.</b>	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.
<b>Poor precision.</b>	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.












## 16. LITERATURE 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. *J Immunol Methods*. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. DESCRIPTION OF SYMBOLS

The following symbols may appear on the packaging and the label:

	Batch code
	Catalog number.
	Use-by-date.
	Temperature limit.
	Biological risk.
	Consult instructions for use.
	In vitro diagnostic use.
	Manufacturer.
	Contains sufficient for 96 tests.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive.
	Health hazard

Ag	Antigen (coated plate).
DIL	Diluent.
BUF WASH 30X	Wash buffer, 30x concentrate.
CONTROL + LYO	Positive control.
CONTROL AC LYO	Lyophilized activity control.
CONTROL -	Negative control.
CONJ	Conjugate.
SUBS pNPP	Substrate pNPP.
CH REP	Swiss Representative.

## 18. DOCUMENT HISTORY

Version	Changes
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Major editorial changes with new document layout. The procedures for semi-quantitative and qualitative application have been merged and separate sub-headings have been introduced where applicable.</p> <p>Information that “The analysis should be performed by trained laboratory professionals” added.</p> <p>Information regarding metrological traceability added.</p> <p>Specification for positive control is changed from &gt;1 to &gt;1.0 for clarification.</p> <p>Information regarding CO<sub>2</sub> cabinet added.</p>
LABEL-DOC-0031 v 7.0	<p>Increased transparency in section 14.1 that the semi-quantitative data is based on mathematical theoretical calculation.</p> <p>Values in table 6 and 10 were updated to correspond to the performance evaluation published in version 5.0.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)

Návod  
**WIESLAB<sup>®</sup> Complement system**  
Classical pathway  
Kvalitativní a semikvantitativní test

Pro diagnostické použití in vitro

Enzymový imunotest pro vyhodnocení  
funkční aktivity komplementu

- Oddělitelné mikrotitrační stripy (12x8) 96 jamek
- Soupravu skladujte při +2 až 8 °C
- Pozitivní kontrolu a kontrolu aktivity skladujte při teplotě –20 °C



Č. dok. LABEL-DOC-0031 7.0

Datum účinnosti: 22-Jan-2026

## 1. POUŽITÍ

Souprava WIESLAB® Complement system Classical pathway (CP) kit je enzymový imunotest pro kvalitativní nebo semikvantitativní stanovení funkční klasické dráhy komplementu v lidském séru. Analýzu musí provádět vyškolení profesionální laboranti.

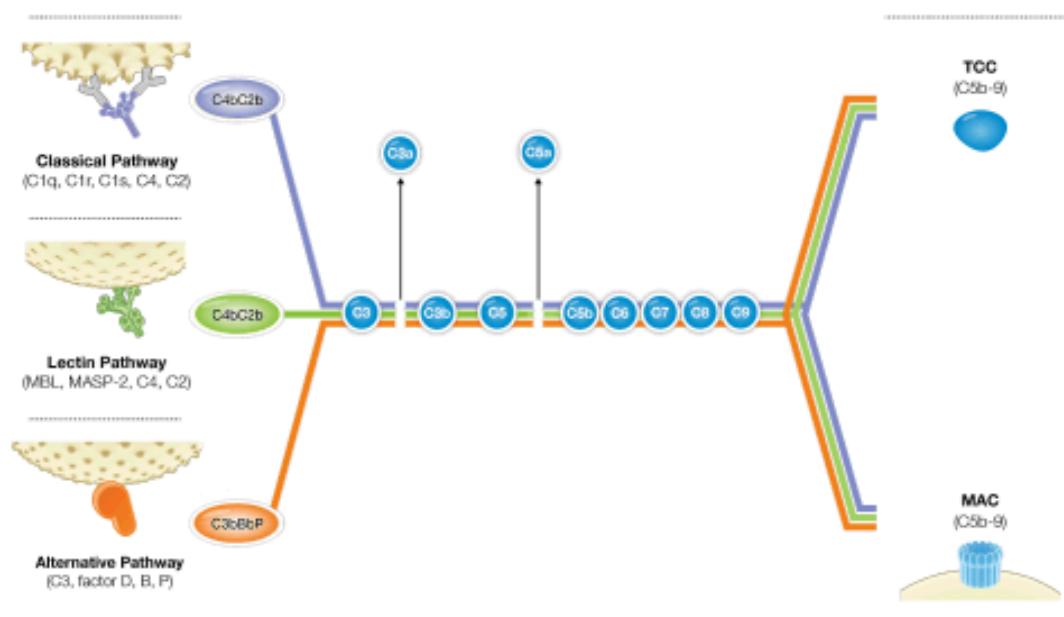
PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ IN VITRO.

## 2. SHRUTÍ A VYSVĚTLENÍ

Systém komplementu hraje zásadní roli u chronických, autoimunitních a infekčních onemocnění. Existují tři dráhy aktivace komplementu (obrázek 1), a to klasická, MBL (lektinová) a alternativní dráha.

Zhoršená aktivita komplementu způsobuje, že se lidé stávají náchylnými k opakovaným fulminantním nebo závažným infekcím a může přispívat k rozvoji autoimunitního onemocnění. Nevhodná aktivace komplementu přispívá k chronickému zánětu a poškození tkáně.

Aktivace komplementové kaskády *in vitro* vede ke spotřebě složek komplementu, což následně vede ke snížení jejich koncentrace. Stanovení proteinů komplementu nebo aktivity komplementu se tedy používá k indikaci, zda byl systém komplementu aktivován imunologickým a/nebo patogenním mechanismem. Existuje-li podezření na onemocnění aktivující komplement nebo je možný dědičný deficit, používají se k hodnocení pacientů funkční i imunochemická měření komplementu. Úroveň aktivity komplementu hodnocená funkčními testy, jako jsou soupravy *WIESLAB* Complement, zohledňuje rychlost syntézy, degradace a spotřeby složek a poskytuje míru integrity drah na rozdíl od imunochemických metod, které specificky měří koncentraci různých složek komplementu.



**Obrázek 1:** Schematické vyobrazení systému komplementu. Systém komplementu může být aktivován klasickou dráhou, MBL (lektinovou) nebo alternativní dráhou, a to různými aktivačními molekulami. Po aktivaci se vytvoří C3 konvertázy, které dále štěpí C3 a následně může být odštěpen C5. Štěpení C5 na C5b iniciuje tvorbu komplexu MAC (také nazývaného komplex terminálního komplementu [TCC] nebo C5b-9).

### 3. PRINCIP TESTU WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY

Test WIESLAB® Complement system Classical pathway kombinuje principy hemolytického testu aktivace komplementu s použitím značených protilátek specifických pro neoantigen produkovaný jako výsledek aktivace komplementu. Množství generovaného neoantigenu je úměrné funkční aktivitě klasické dráhy.

V soupravě Complement system Classical pathway kit jsou jamky mikrotitračních stripů potaženy specifickým aktivátorem klasické dráhy. Destička v kombinaci se složením pufru pro ředění vzorků a úroveň ředění séra pacienta zajišťuje, že je aktivována pouze klasická dráha. Během inkubace naředěného séra pacienta v jamkách se komplement aktivuje specifickým potahem.

Jamky se poté promyjí a množství komplexu C5b-9 vytvořeného na povrchu destičky se detekuje specifickou alkalickou fosfatázou značenou protilátkou proti neoantigenu C5b-9 vytvořenému během tvorby komplexu napadajícího membránu (MAC).

Po dalším kroku promývání se detekce specifických protilátek získá inkubací s roztokem substrátu alkalické fosfatázy. Množství aktivace komplementu koreluje s intenzitou barvy a měří se jako absorbance (optická hustota, OD).

#### Metrologická návaznost

Hodnota přiřazená pozitivní kontrole je definována jako 100 % normální aktivity dráhy komplementu a nemá návaznost na jednotky SI. Pořizuje se sloučením normálních lidských sér hodnocených popsáním postupem testu ELISA s vnitřním referenčním systémem jako nejvyšší úrovní hierarchie kalibrace.

### 4. VAROVÁNÍ, UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ *IN VITRO*.
- Složky lidského séra použité při přípravě kontrol v soupravě byly testovány na přítomnost protilátek proti viru lidské imunodeficience 1 a 2 (HIV 1 a 2), hepatitidy C (HCV) a povrchovému antigenu viru hepatitidy B metodami schválenými FDA a byly vyhodnoceny jako negativní. Protože žádná testovací metoda nemůže poskytnout úplnou jistotu, že viry HIV, HCV, hepatitidy B nebo jiné infekční agens nejsou přítomny, je třeba se vzorky a reagensy s obsahem lidského séra manipulovat jako s infekčními agens.
- Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health doporučuje, aby se s potenciálně infekčními agens manipulovalo na úrovni biologické bezpečnosti 2.
- Všechny roztoky obsahují jako konzervační prostředek ProClin 300. Nikdy nepipetujte ústy a nedovolte, aby se reagentie nebo vzorek pacienta dostaly do kontaktu s pokožkou. Reagentie obsahující ProClin mohou být dráždivé. Zabraňte kontaktu s pokožkou a očima. Při potřísnění opláchněte velkým množstvím vody.
- Bezpečnostní list pro všechny nebezpečné složky obsažené v této soupravě je k dispozici na vyžádání u společnosti Svar Life Science.
- Nepoužívejte složky po datu expirace.
- Reagentie soupravy jsou specifické pro soupravu a nelze je zaměňovat mezi šaržemi souprav.
- Všechny použité složky, použité/zbylé vzorky a zbytky kontrol zlikvidujte jako biologicky nebezpečný odpad v souladu s místními předpisy. Ostatní zbylé složky zlikvidujte jako nebezpečný odpad v souladu s místními předpisy.
- Jakýkoli vážný incident, ke kterému došlo v souvislosti s tímto prostředkem, je třeba nahlásit společnosti Svar Life Science AB a příslušnému orgánu členského státu EU nebo země, ve které uživatel/pacient sídlí.

Promývací roztok (konc. 30x)



## VAROVÁNÍ

**Obsahuje:** Reakční hmotnost: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] a 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Může vyvolat alergickou kožní reakci.  
 H412 Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.  
 P261 Zamezte vdechování aerosolů.  
 P273 Zabraňte uvolnění do životního prostředí.  
 P280 Používejte ochranné rukavice.  
 P333 + P313 Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Ředící pufr CP, roztok konjugátu, negativní kontrola, substrát pNPP

EUH208 Obsahuje „Reakční hmotnost: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] a 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)“ Může vyvolat alergickou reakci.

EUH210 Na vyžádání je k dispozici bezpečnostní list.

## 5. OBSAH SOUPRAVY

- 1 uzavřená mikrotitrační destička s oddělovacími jamkami (12x8) potažená lidským IgM.
- 2 lahvičky (35 ml) ředícího pufru CP (Dil CP) označené modře.
- 1 lahvička (0,2 ml) negativní kontroly (NC) obsahující lidské sérum (k naředění jako u vzorku séra pacienta).
- 1 lahvička (0,2 ml) pozitivní kontroly (PC) obsahující lyofilizované lidské sérum, viz dále část 9.3 „Rekonstituce pozitivní kontroly“.
- 1 lahvička (obj., viz CoA) kontroly aktivity (AC) pro semikvantitativní použití obsahující lyofilizované lidské sérum (jiného původu než PC), viz část 9.3.1 „Rekonstituce kontroly aktivity“ v postupu pro semikvantitativní použití.
- 1 lahvička (13 ml) konjugátu obsahující protilátky proti C5b-9 značené alkalickou fosfatázou (modrá barva).
- 1 lahvička (13 ml) roztoku substrátu pNPP připraveného k použití.
- 1 lahvička (30 ml) promývacího roztoku s koncentrací 30x.

**Upozornění:** Rekonstituční objem pro AC je uveden v certifikátu analýzy (CoA) (XXX µl) a na etiketě AC.

## 6. POTŘEBNÝ MATERIÁL NEBO VYBAVENÍ, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Čtečka mikrodestiček s filtrem 405 nm.
- Přesné pipety s jednorázovými špičkami.
- Myčka na stripy, savý papír, zkumavky a časovač.
- Inkubátor schopný udržovat teplotu 37 °C. Pokud používáte komoru CO<sub>2</sub>, ujistěte se, že je přívod CO<sub>2</sub> odpojený/uzavřený.

## 7. MANIPULACE A SKLADOVÁNÍ

- Reagencie je třeba skladovat při teplotě 2 až 8 °C, s výjimkou pozitivní kontroly a kontroly aktivity.

- Všechny reagensie v soupravě jsou připraveny k použití, kromě promývacího roztoku a kontrol.
- Pozitivní kontrolu a kontrolu aktivity je třeba skladovat při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do rekonstituce.
- Rekonstituovanou pozitivní kontrolu a kontrolu aktivity je třeba skladovat při teplotě nižší než  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  a lze ji jednou rozmrazit.

## 8. PŘÍPRAVA VZORKU

Tento test se provádí na vzorcích séra. Vzorky krve se odebírají za použití techniky aseptické venepunkce a sérum se získává standardními postupy. Doporučuje se odebrat minimálně 5 ml plné krve. Nechte krev srážet ve zkumavkách se sérem po dobu 60–65 minut při pokojové teplotě ( $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Vzorky krve odstředíte a bezbuněčné sérum přeneste do čisté zkumavky.

Aby se zabránilo aktivaci komplementu *in vitro*, je třeba se sérem správně manipulovat. Pro delší skladování nebo pro přepravu na suchém ledu je třeba sérum zmrazit na teplotu  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo nižší v těsně uzavřených zkumavkách. Vzorky nelze zmrazit a rozmrazit více než jednou.

Ikterická, lipemická a hemolyzovaná séra nepoužívejte. Tepelně inaktivovaná séra nelze použít. Plazmu nelze použít. Clinical and Laboratory Standards Institute uvádí doporučení pro uchovávání krevních vzorků (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. PŘÍPRAVA A MANIPULACE S REAGENCIEMI

### 9.1. Příprava promývacího roztoku

Pokud v lahvičce s koncentrovaným promývacím roztokem pozorujete krystaly soli, umístěte lahvičku do vodní lázně o teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dokud se krystaly před zředěním promývacího roztoku nerozpustí.

Zředte 30 ml promývacího roztoku s koncentrací 30x 870 ml destilované vody. Při skladování při teplotě 2 až  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  je naředěný promývací roztok stabilní až do data expirace soupravy.

### 9.2. Negativní kontrola (NC)

NC je třeba zředit stejně jako vzorek séra pacienta.

### 9.3. Rekonstituce pozitivní kontroly (PC)

PC rekonstituujte podle následujícího postupu:

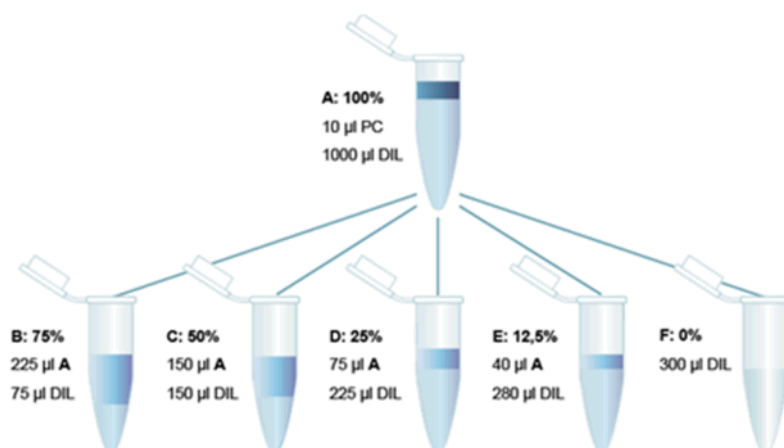
1. Jemně sklepejte veškerý lyofilizovaný materiál na dno lahvičky a sejměte uzávěr.
2. Ihned přidejte 200  $\mu\text{l}$  destilované vody přímo do lyofilizovaného materiálu.
3. Nasadte zpět uzávěr.
4. Nechte lahvičku stát na ledu po dobu 5 minut a poté ji občas jemně protřepejte nebo vortexujte, dokud se materiál zcela nerozpustí.
5. Další ředění pro semikvantitativní a kvalitativní protokol viz část 9.3.1, respektive 9.3.2.

Rekonstituovanou PC lze před použitím uchovávat až 4 hodiny, pokud je uchovávána při teplotě 2 až  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo na ledu. Je třeba ji skladovat při teplotě nižší než  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  a lze ji jednou rozmrazit.

#### 9.3.1. Semikvantitativní protokol

##### Příprava kalibrační křivky

Pro ředění rekonstituované PC na kalibrátory viz obrázek 2 a tabulku 1. Kalibrátor lze před použitím ponechat při pokojové teplotě až 1 hodinu. Kalibrátor musí být připraven čerstvý a nelze ho skladovat pro pozdější použití.



**Tabulka 1:** Objemy pro ředění kalibrační křivky.

Kalibrační křivka	PC (µl)	DIL (µl)
A: 100 %	10	1000
Ze 100 % (µl)		
B: 75 %	225	75
C: 50 %	150	150
D: 25 %	75	225
E: 12,5 %	40	280
F: 0 %	0	300

**Obrázek 2:** Schéma ředění kalibrační křivky. Rekonstituovaná pozitivní kontrola (PC) se smíchá s ředícím pufrům soupravy (DIL) podle tabulky.

### Rekonstituce kontroly aktivity (AC)

1. Jemně sklepejte veškerý lyofilizovaný materiál na dno lahvičky a sejměte uzávěr.
2. Přímo do lyofilizovaného materiálu neprodleně přidejte destilovanou vodu o objemu uvedeném v CoA/na etiketě AC.
3. Opět uzavřete.
4. Lahvičku nechte stát na ledu po dobu 5 minut a poté jemně protřepejte nebo vortexujte, dokud se materiál zcela nerozpustí.
5. Naředěte rekonstituovanou kontrolu stejným způsobem jako vzorek séra pacienta.

Rekonstituovanou kontrolu aktivity lze před použitím uchovávat až 4 hodiny, pokud je uchovávána při teplotě 2 až 8 °C nebo na ledu. Je třeba ji skladovat při teplotě nižší než -70 °C a lze ji jednou rozmrazit.

### 9.3.2. Kvalitativní protokol

Naředěte rekonstituovanou pozitivní kontrolu podle pokynů v části 9.4: Ředění vzorků.

### 9.4. Manipulace se sérem

Částečně rozmrazte zmrazená séra krátkým umístěním do vodní lázně o teplotě 37 °C za jemného míchání. Po částečném rozmrazení ihned položte zkumavky na led a nechte je tam, dokud zcela nerozmraznou. Jemně je promíchejte v zařízení vortex.

### Ředění vzorků

Naředěte sérum 1/101 ředícím pufrům CP s modrým označením (500 µl ředícího pufru + 5 µl séra) a důkladně, ale jemně promíchejte v zařízení vortex. Naředěné sérum lze před analýzou ponechat při pokojové teplotě maximálně 60 minut.

## 10. POSTUP TESTU

### 10.1. Protokol promývání

Vyprázdněte jamky a promyjte je 3krát pomocí 300 µl promývacího roztoku. Jamky pokaždé naplňte a vyprázdněte. Po posledním promytí vyprázdněte jamky poklepáním stripu na savý papír.

### 10.2. Rozvržení destičky

#### 10.2.1. Semikvantitativní protokol

Pipetujte 100 µl na jamku v duplikátu kalibrátor (100 % až 0 %), NC, AC a naředěné vzorky séra (P) podle tabulky 2. Kalibrátor 0 % použijte jako blank.

**Tabulka 2:** Doporučené rozvržení destičky, semikvantitativní protokol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100 %	12,5 %	P1									
<b>B</b>	100 %	12,5 %	P1									
<b>C</b>	75 %	0 %	P2									
<b>D</b>	75 %	0 %	P2									
<b>E</b>	50 %	NC	etc									
<b>F</b>	50 %	NC										
<b>G</b>	25 %	AC										
<b>H</b>	25 %	AC										

#### 10.2.2. Kvalitativní protokol

Pipetujte 100 µl na jamku v duplikátu ředícího pufru jako blank, PC, NC a naředěné vzorky séra (P) podle tabulky 3.

**Tabulka 3:** Doporučené rozvržení destičky, kvalitativní protokol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Dil CP	P2										
<b>B</b>	Dil CP	P2										
<b>C</b>	PC	etc										
<b>D</b>	PC											
<b>E</b>	NC											
<b>F</b>	NC											
<b>G</b>	P1											
<b>H</b>	P1											

### 10.3. Protokol testu

Odeberte pouze tolik jamek, kolik jich je potřeba pro testování, a hliníkový obal znovu pečlivě uzavřete. Před analýzou nechte všechny roztoky dosáhnout pokojové teploty (20 až 25 °C).

#### 1. Inkubace vzorků

Naplňte destičku podle části 10.2. Inkubujte 60–70 minut při teplotě +37 °C s nasazeným víkem. Pamatujte, že inkubace nemá probíhat v atmosféře CO<sub>2</sub>. Pokud používáte komoru CO<sub>2</sub>, ujistěte se, že je přívod CO<sub>2</sub> odpojený/uzavřený.

#### 2. Promytí

Promyjte destičku podle části 10.1: Protokol promývání.

#### 3. Inkubace konjugátu

Do každé jamky přidejte 100 µl konjugátu. Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě (+20 až 25 °C).

#### 4. Promytí

3x promyjte jako v předchozím kroku.

#### 5. Inkubace substrátu

Přidejte 100 µl roztoku substrátu do každé jamky a inkubujte 30 minut při pokojové teplotě (+20 až 25 °C).

#### 6. Odečtení destičky

Odečtěte absorbanční (OD) při 405 nm na čtečce mikrodestiček.

Volitelně: Jako roztok k zastavení reakce lze použít 5 mM EDTA v objemu 100 µl na jamku. Absorbanci jamek odečtěte do 60 minut.

## 11. KONTROLA KVALITY

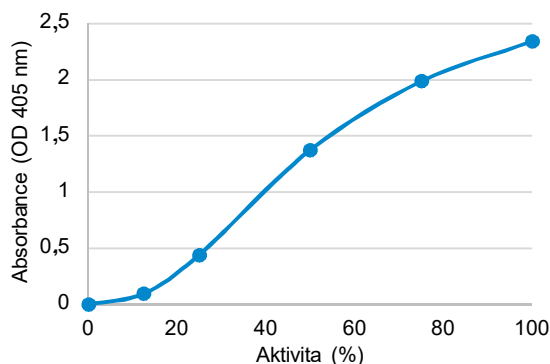
Certifikát analýzy (CoA) tvořící součást soupravy je specifický pro konkrétní šarži a slouží k ověření výsledků získaných naší laboratoří. Výsledky uvedené na CoA slouží pouze jako vodítko. Výsledky získané vaší laboratoří se mohou lišit.

Hodnota OD pro PC musí činit >1,0 a hodnota OD pro NC <0,2 po odečtení blanku (Dil CP, 0 %). Pokud některá z kontrol není v příslušných rozmezích, je třeba považovat test za neplatný a provést ho znovu.

## 12. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

### 12.1. Semikvantitativní protokol

Odečtěte absorbanční 0% kalibrátoru od všech hodnot OD. Pro přizpůsobení křivky se doporučuje 4parametrová logistika (Marquardt). Viz příklad standardní křivky na obrázku 3.



**Obrázek 3:** Příklad standardní křivky. Obrázek výše znázorňuje příklad semikvantitativní standardní křivky a nelze ho použít pro interpretaci vzorku skutečného pacienta.

V případech, kdy jsou získané hodnoty vzorků vyšší než nejvyšší 100% kalibrátor, mohou být vzorky naředěny 1/201 a znovu otestovány. Pamatujte, že získanou hodnotu aktivity je v tomto případě třeba upravit podle použitého ředění vzorku.

Doporučuje se, aby si každá laboratoř stanovila svou vlastní referenční úroveň a mezní hodnotu pro deficity.

## 12.2. Kvalitativní protokol

K usnadnění interpretace se doporučuje použít výsledky OD k výpočtu hodnot aktivity komplementu (% PC). Tento výpočet rovněž usnadňuje porovnávání mezi různými analýzami, protože OD je náchylnější ke změnám mezi jednotlivými zpracováními. Způsob použitý k výpočtu aktivity komplementu je popsán níže.

1. Odečtěte absorbanci blanku (ředicího pufru) od absorbance NC, PC a vzorků.
2. Vypočítejte střední hodnoty OD pro NC, PC a vzorky.
3. Vypočítejte aktivitu komplementu pomocí tohoto vzorce:

$$\text{Aktivita komplementu (\% PC)} = \frac{\text{Vzorek} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

NC a PC jsou určeny k odhalení významného selhání reagentie. PC nezajistí přesnost při zkoušce mezních hodnot. Doporučuje se, aby si každá laboratoř stanovila svou vlastní referenční úroveň a mezní hodnotu pro deficity.

Negativní výsledek, tj. deficit, je třeba vždy ověřit testováním nového vzorku, aby bylo zajištěno, že před provedením testu nedošlo k neúmyslné aktivaci komplementu *in vitro*.

## 13. KRITÉRIA HODNOCENÍ

### 13.1. Očekávané výsledky

Jsou-li zjištěny snížené hladiny složek komplementu nebo funkce komplementu, zvažují lékaři deficit nebo probíhající imunologický proces, který vede ke zvýšenému rozpadu složek a snížení hladin komplementu. Zvýšené hladiny komplementu jsou obvykle nespecifickým vyjádřením reakce akutní fáze.

Test WIESLAB® Complement system Classical pathway může být užitečný pro detekci deficitů komplementu souvisejících s klasickou dráhou. Kompletnějšího a hlubšího funkčního hodnocení všech tří drah komplementu lze dosáhnout pomocí soupravy WIESLAB® Complement system Screen kit, jak uvádí tabulka 4.

**Tabulka 4:** Kombinace výsledků různých drah a možných deficitů.

Klasická dráha	Dráha MBL	Alternativní dráha	Možný deficit
Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Žádný
Negativní	Pozitivní	Pozitivní	C1q, C1r, C1s
Pozitivní	Pozitivní	Negativní	Faktor B, D a P
Pozitivní	Negativní	Pozitivní	MBL, MASP-2
Negativní	Negativní	Negativní	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativní	Negativní	Pozitivní	C4, C2 nebo kombinace

## 13.2. Omezení

Hladinu komplementu u jednotlivých pacientů nelze použít jako měřítko závažnosti onemocnění, protože se může u jednotlivých pacientů lišit. Získat absolutní standardizaci výsledků je proto obtížné.

Test nelze použít jako jediný parametr při rozhodování o klinické léčbě. Je třeba ho vyhodnotit v kombinaci s klinickými příznaky a výsledky jiných dostupných testů. Léčbu nelze zahájit na základě výsledku testu komplementu. Zahájení nebo změny léčby nelze provádět pouze na základě změny hladin komplementu, nýbrž po pečlivém klinickém pozorování.

## 14. CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

### 14.1. Klinická účinnost

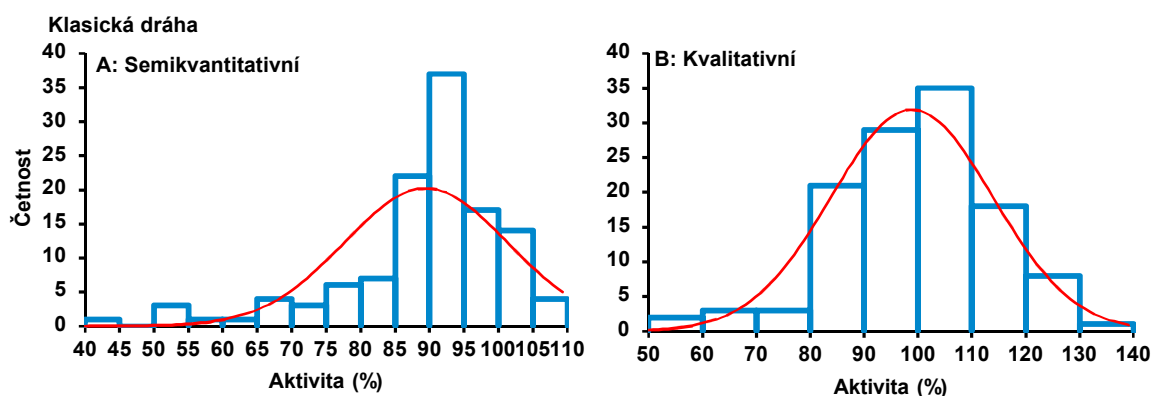
Normální distribuce v rámci 2SD (standardní odchylky) je znázorněna na obrázku 4 a v tabulce 5. Výsledky v tomto rozmezí ukazují normální funkčnost klasické dráhy. Doporučuje se, aby každá laboratoř potvrdila nebo stanovila své vlastní referenční rozmezí pro populaci, kterou reprezentuje.

Hodnota pod referenčním rozmezím indikuje zvýšenou aktivaci vedoucí ke spotřebě kapacity klasické dráhy komplementu, nebo geneticky podmíněnou nízkou aktivitu.

Hodnoty pod 5 % silně naznačují úplný deficit způsobený nadměrnou aktivací nebo zděděný deficit v příslušné dráze. Ke stanovení, který faktor (faktory) komplementu způsobuje sníženou aktivitu, je zapotřebí další analýza proteinů komplementu.

Negativní výsledek, tj. deficit, je třeba vždy ověřit testováním nového vzorku, aby bylo zajištěno, že před provedením testu nedošlo k neúmyslné aktivaci komplementu *in vitro*.

Pomocí testu WIESLAB® Complement system Classical pathway jsme kvalitativním způsobem vyšetřili sérum od 120 zdánlivě zdravých dárců krve. Normální rozmezí semikvantitativního způsobu měření jsme stanovili pomocí matematického teoretického výpočtu. Aktivitu komplementu u 120 zdánlivě zdravých dárců krve shrnujeme na obrázku 4 a v tabulce 5. U žádného z dárců v této studii aktivita nebyla nižší než 40 %.



**Obrázek 4:** Histogram referenční populace analyzovaný v klasické dráze podle semikvantitativního (A), respektive kvalitatívního (B) protokolu.

**Tabulka 5:** Hodnoty pro 120 dárců krve byly analyzovány podle semikvantitativního, respektive kvalitatívního protokolu.

Protokol	n	Průměr (%)	±2SD (%)	Medián (%)
Semikvantitativní	120	89	66-113*	92
Kvalitativní	120	99	69-129*	100

\*) Toto je statistický výpočet a negarantuje skutečnou mezní hodnotu. Doporučuje se, aby si každá laboratoř stanovila svou vlastní referenční úroveň a mezní hodnotu pro podezření na deficit.

V testu byla testována séra se známými deficity komplementu a ochuzená séra se specifickým faktorem komplementu (tabulky 6 a 7). Všechna deficitní/ochuzená séra měla v testu nízké výsledky s hodnotami pod 15 % a 5 %\*\*) v semikvantitativním, respektive kvalitativním protokolu.

\*\*) Viz „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“ pro rozšířené testy deficitních vzorků pacientů testovaných s kvalitativní aplikací

**Tabulka 6:** Vzorky se známými deficity.

Deficit	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Počet pacientů	5	1	1	1	2	2
Počet detekcí séra s deficitem	5	1	1	1	2	2

**Tabulka 7:** Vzorky s ochuzenými složkami.

Ochuzení	C1q	C3	C4	C5	C7
Počet ochuzených vzorků séra	2	1	1	1	1
Počet zjištěných ochuzení	2	1	1	1	1

## 14.2. Přesnost

### 14.2.1. Přesnost mezi testy

#### Semikvantitativní protokol

**Tabulka 8:** Přesnost mezi testy pro semikvantitativní použití byla stanovena testováním sedmi vzorků v osmi replikátech při třech různých zpracováních.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Střední hodnota %</b>	71	73	69	72	25	35	31
<b>SD</b>	9	9	6	11	1	2	2
<b>CV %</b>	13%	13%	9%	15%	4%	5%	5%

#### Kvalitativní protokol

**Tabulka 9:** Přesnost mezi testy pro kvalitativní aplikaci byla stanovena testováním tří vzorků v duplikátech. Výsledky byly získány pro šest různých zpracování.

	1	2	3
<b>Střední hodnota %</b>	98	92	21
<b>SD</b>	4,3	3,9	1,7
<b>CV %</b>	4	4	8

### 14.2.2. Přesnost v rámci testu

#### Semikvantitativní protokol

**Tabulka 10:** Přesnost v rámci testu pro semikvantitativní použití byla stanovena testováním sedmi různých vzorků v osmi replikátech při jednom zpracování.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Střední hodnota %</b>	79	76	72	83	24	34	30
<b>SD</b>	10	11	6	9	0	1	1
<b>CV %</b>	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

## Kvalitativní protokol

**Tabulka 11:** Přesnost v rámci testu pro kvalitativní použití byla stanovena testováním jednoho vzorku ve 40 jamkách.

Test	Střední hodnota %	SD	CV %
CP	85	2,9	3

### 14.2.3. Odchyly mezi šaržemi

#### Semikvantitativní protokol

**Tabulka 12:** Odchyly mezi šaržemi při semikvantitativním použití byly stanoveny testováním sedmi vzorků v duplikátech se třemi různými šaržemi třemi různými osobami.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Střední hodnota %</b>	8	73	85	24	37	74	78
<b>SD</b>	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
<b>CV %</b>	10 %	20 %	15 %	5 %	5 %	10 %	8 %

### 14.3. Linearita

#### Semikvantitativní protokol

**Tabulka 13:** Výtěžnost zředění byla stanovena testováním pěti sériových ředění pro tři různé vzorky.

Vzorek	Ředění	Průměrná naměřená aktivita (%)	Teoretická aktivita (%)	Opravené % výtěžnosti zředění
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
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

### 14.4. Limit detekce

#### Semikvantitativní protokol

**Rozsah měření kalibrátoru:** 12,5 % - 100 %

**Limit detekce (LoD) = 8 %**

## 15. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

PROBLÉM	MOŽNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
<b>Kontrolní hodnoty jsou mimo rozsah.</b>	Nesprávná teplota, načasování nebo pipetování, reagensie nejsou smíchány.	Zkontrolujte správný čas a teplotu. Opakujte test.
	Křížová kontaminace kontrol.	Pipetujte pečlivě.
	Optická dráha není čistá.	Zkontrolujte, zda v jamkách nejsou nečistoty nebo vzduchové bubliny. Očistěte dno destičky a opakujte odečet.
	Kontroly (pozitivní a/nebo kontrola aktivity) nejsou správně rekonstituovány. Nesprávné ředění kalibrátoru.	Zkontrolujte kontroly, rozpusťte nové. Zkontrolujte přípravu a zopakujte ředění.
<b>Výsledky všech testů jsou negativní.</b>	Jedna nebo více reagensií nebyla přidána nebo byly reagensie přidány v nesprávném pořadí.	Znovu zkontrolujte postup. Zkontrolujte, zda byly použity všechny reagensie. Opakujte test.
	Antigenem potažená destička je neaktivní.	Zkontrolujte viditelnou vlhkost v nepoužívaných jamkách. Očistěte dno destičky a opakujte odečet.
	Sérum je neaktivní.	Nařeďte nové vzorky.
<b>Všechny jamky na vzorky jsou viditelně žluté.</b>	Kontaminované pufrы nebo reagensie.	Zkontrolujte všechny roztoky, zda nejsou zakalené.
	Promývací roztok je kontaminovaný.	Použijte čistou nádobu. Zkontrolujte kvalitu vody použité pro přípravu roztoku.
	Nesprávné ředění séra.	Opakujte test.
<b>Špatná přesnost.</b>	CV dávkování pipety >5 % nebo nejsou vzorky promíchány.	Zkontrolujte kalibraci pipety. Použijte reprodukovatelnou techniku. Zamezte vzduchovým bublinám ve špičce pipety.
	Sérum nebo reagensie nejsou dostatečně promíchány nebo nedosáhly pokojové teploty.	Všechny reagensie jemně, ale důkladně promíchejte a vytemperujte na pokojovou teplotu.
	Přidávání reagensie trvá příliš dlouho, nekonzistence v časových intervalech.	Vyviňte konzistentní jednotnou techniku a za účelem zkrácení času používejte nástroj s více špičkami nebo automatický dávkovač.
	Optická dráha není čistá.	Zkontrolujte, zda v jamkách nejsou vzduchové bubliny. Očistěte dno destičky a opakujte odečet.
	Promývání není konzistentní, zachycené bubliny, v jamkách zůstal promývací roztok.	Zkontrolujte, zda jsou všechny jamky rovnoměrně naplněné a aspirované. Dávkujte kapalinu nad hladinu reagensie v jamce. Po posledním promytí vyprázdněte jamky poklepáním stripu na savý papír.












## 16. ODKAZY NA LITERATURU

- 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. J Immunol Methods. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. POPIS SYMBOLŮ

Na obalu a na označení se mohou objevit tyto symboly:

	Kód šarže.
	Katalogové číslo.
	Datum spotřeby.
	Teplotní omezení.
	Biologické riziko.
	Přečtěte si návod k použití.
	Diagnostické použití in vitro.
	Výrobce.
	Obsahuje dostatek materiálu pro 96 testů.
	Shoda se směrnicí 98/79/EC o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro.
	Ohrožení zdraví.

Ag	Antigen (potažená destička).
DIL	Ředící pufr.
BUF WASH 30X	Promývací pufr, koncentrace 30x.
CONTROL + LYO	Pozitivní kontrola.
CONTROL AC LYO	Lyofilizovaná kontrola aktivity.
CONTROL -	Negativní kontrola.
CONJ	Konjugát.
SUBS pNPP	Substrát pNPP.
CH REP	Zástupce pro Švýcarsko.

## 18. HISTORIE DOKUMENTU

Verze	Změny
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Významné redakční změny s novým rozvržením dokumentu. Postupy pro semikvantitativní a kvalitativní použití byly sloučeny a v případě potřeby byly přidány samostatné dílčí nadpisy.</p> <p>Doplněna informace, že „analýzu musí provádět vyškolení profesionální laboranti“.</p> <p>Doplněny informace týkající se metrologické návaznosti.</p> <p>Specifikace pro pozitivní kontrolu se pro upřesnění změnila z &gt;1 na &gt;1,0.</p> <p>Doplněna informace týkající se komory CO<sub>2</sub>.</p>
LABEL-DOC-0031 verze 7.0	<p>Do části 14.1 jsme doplnili upřesnění, že semikvantitativní údaje vycházejí z matematického teoretického výpočtu.</p> <p>Hodnoty v tabulkách 6 a 10 byly aktualizovány, aby odpovídaly hodnocení funkční způsobilosti publikovanému ve verzi 5.0.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)

Juhend  
**WIESLAB<sup>®</sup> Complement system**  
Classical pathway  
Kvalitatiivne ja poolkvantitatiivne test

*In vitro* diagnostiliseks kasutamiseks

Ensüüm-immunoanalüüs  
komplemendi funktsionaalse aktiivsuse hindamiseks

- Murdke 96 süvendiga mikrotiitrimisribad (12 × 8) osadeks
- Säilitage testkomplekti temperatuuril +2...8 °C
- Hoidke positiivset kontrolli ja aktiivsuse kontrolli temperatuuril –20 °C



Dok nr LABEL-DOC-0031 7.0  
Jõustumiskuupäev: 22-Jan-2026

## 1. KASUTUSOTSTARVE

WIESLAB® Complement system Classical pathway (CP) komplekt on ensüümi immuunanaluus funktsionaalse klassikalise komplekti raja kvalitatiivseks ja/või poolkvantitatiivseks kindlaksmääramiseks inimese seerumis. Analüüsi peavad läbi viima koolitatud laborispetsialistid.

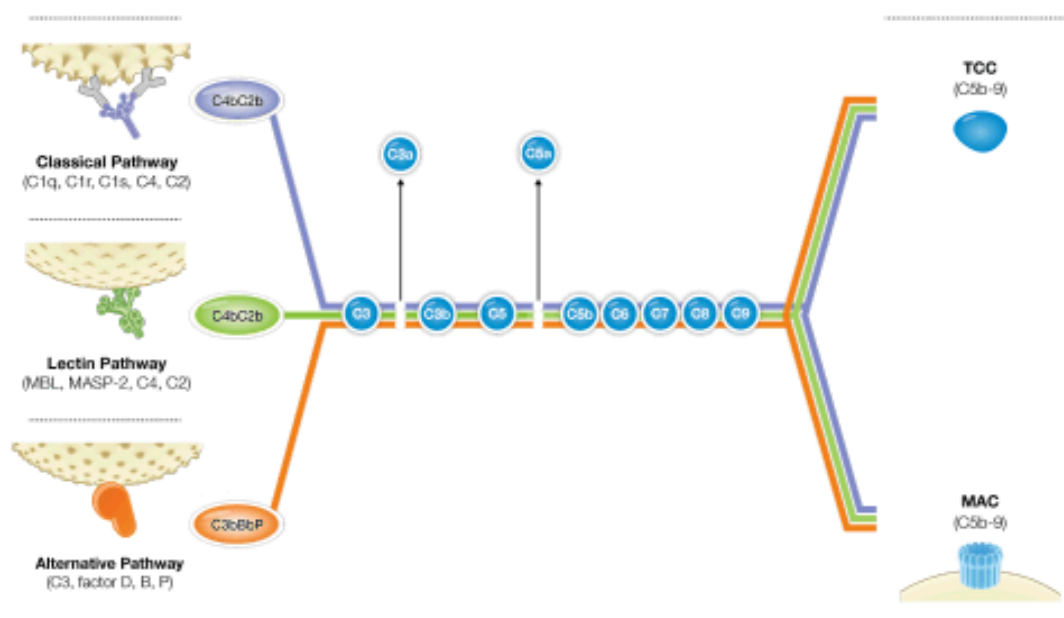
*IN VITRO* DIAGNOSTILISEKS KASUTAMISEKS.

## 2. KOKKUVÕTE JA SELGITUS

Komplementisüsteem mängib olulist rolli krooniliste, autoimmuun- ja nakkushaiguste korral. Komplekti aktiveerimiseks on kolm rada (joonis 1): klassikaline, MBL (lektiin) ja alternatiivne rada.

Komplekti aktiivsuse häirimine muudab inimesed vastuvõtlikuks korduvatele fulminantsetele või rasketele infektsioonidele ja võib aidata kaasa autoimmuunhaiguse arengule. Komplekti sobimatu aktiveerimine soodustab kroonilist põletikku ja koekahjustusi.

*In vitro* komplekti kaskaadi aktiveerimine viib komplekti komponentide tarbimiseni, mis omakorda toob kaasa nende kontsentratsiooni languse. Seega kasutatakse komplekti valkude või komplekti aktiivsuse määramist selleks, et näidata, kas komplementisüsteemi on aktiveerinud immunoloogiline ja/või patogeenne mehhanism. Patsientide analüüsimiseks kasutatakse nii funktsionaalse kui ka immunokeemilise komplekti mõõtmist, kui kahtlustatakse komplekti aktiveerivat haigust või on olemas päriliku puudulikkuse võimalus. Komplekti aktiivsuse tase, mida hinnatakse funktsionaalsete testidega nagu *WIESLAB* komplekti komplektid, võtab arvesse komponentide sünteesi, lagunemise ja tarbimise kiirust ning annab radade terviklikkuse mõõtmise erinevalt immunokeemilistest meetoditest, mis mõõdavad spetsiifilist komplekti eri komponentide kontsentratsiooni.



**Joonis 1:** komplementisüsteemi skemaatiline joonis. Komplementisüsteemi saab aktiveerida klassikalise, MBL- (lektiin) või alternatiivse raja abil eri aktiveerivate molekulide kaudu. Aktiveerimisel moodustuvad C3 konverteasid, mis omakorda lõhustavad C3, ja seejärel saab lõhustada C5. C5 lõhustamine C5b-ks käivitab MAC-kompleksi (nimetatakse ka terminaalseks komplekti kompleksiks (TCC) või C5b-9) moodustumise.

### 3. ANALÜÜSI WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY PÕHIMÕTE

Analüüs WIESLAB® Complement system Classical pathway (CP) ühendab komplemendi aktiveerimise hemolüütilise analüüsi põhimõtted komplemendi aktiveerimise tulemusena toodetud neoantigeeni suhtes spetsiifiliste märgistatud antikehade kasutamise teel. Tekkinud neoantigeeni kogus on võrdeline klassikalise raja funktsionaalse aktiivsusega.

Komplemendisüsteemi klassikalise raja testkomplektis on mikrotiitri ribade süvendid kaetud klassikalise raja spetsiifilise aktivaatoriga. Plaat koos proovi lahjenduspuhvri koostise ja patsiendi seerumi lahjendustasemega tagab, et aktiveeritakse ainult klassikaline rada. Lahjendatud patsiendi seerumi süvendites inkubeerimise ajal aktiveeritakse komplement spetsiifilise kattega.

Seejärel süvendid pestakse ja plaadi pinnal moodustunud C5b-9-kompleksi kogus tuvastatakse spetsiifilise aluselise fosfataasiga märgistatud antikehaga membraanirünnaku kompleksi (MAC) tekke käigus moodustunud C5b-9 neoantigeeni vastu.

Pärast pesemise lisaetappi tuvastatakse spetsiifilised antikehad aluselise fosfataasi substraadi lahusega inkubeerimisel. Komplemendi aktiveerimise hulk korreleerub värvi intensiivsusega ja seda mõõdetakse neeldumise (optilise tiheduse, OD) järgi.

#### Metroloogiline jälgitavus

Positiivsele kontrollile omistatud väärtus on määratletud kui 100% normaalsest komplemendi raja aktiivsusest ja see ei ole jälgitav SI ühikutes. Selle määramisel kasutatakse kogutud normaalseid inimese seerumeid, mida on analüüsitud kirjeldatud ELISA analüüsiprotseduuriga, kus kõrgeim kalibreerimishierarhia tase on sisemine võrdlussüsteem.

### 4. HOIATUSED JA ETTEVAATUSABINÕUD

- *IN VITRO* DIAGNOSTILISEKS KASUTAMISEKS.
- Komplekti kuuluvate kontrollproovide valmistamisel kasutatud inimese seerumikomponentides on FDA heakskiidetud meetoditega analüüsitud inimese immuunpuudulikkuse viiruse 1 ja 2 (HIV 1 ja 2), C-hepatiidi (HCV) ja B-hepatiidi pinnaantigeenide antikehade sisaldust ja vastused olid negatiivsed. Kuna ükski analüüsimeetod ei anna täielikku kindlust HIV-, HCV-, B-hepatiidiviiruse või muude nakkusetekitajate puudumise kohta, tuleb proove ja inimpäritolu reaktiive käsitleda nii, nagu need oleksid võimelised nakkusetekitajaid edasi kandma.
- Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health on soovitanud potentsiaalseid nakkusetekitajaid käsitleda bioohutuse 2. tasemel.
- Kõik lahused sisaldavad säilitusainena ProClin 300. Ärge kunagi pipettige suu kaudu ega laske reaktiividel või patsiendiproovil nahaga kokku puutuda. ProClini sisaldavad reaktiivid võivad olla ärritavad. Vältige kokkupuudet naha ja silmadega. Kokkupuute korral loputage rohke veega.
- Kõikide selles komplektis sisalduvate ohtlike komponentide ohutuskaart on kättesaadav tellimisel ettevõttelt Svar Life Science.
- Ärge kasutage aegumiskuupäeva ületanud komponente.
- Komplekti reaktiivid on komplektipõhised ja neid ei tohi komplekti partiide vahel segada.
- Kõrvaldage kõik kasutatud komponendid, kasutatud/ülejäanud proovid ja järelejäanud kontrollid bioohlike jäätmetena kohalike eeskirjade kohaselt. Kõrvaldage ülejäanud komponendid ohtlike jäätmetena kohalike eeskirjade kohaselt.
- Selle seadmega seotud rasketest mis tahes vahejuhtumitest tuleb teatada ettevõttele Svar Life Science AB ja selle EL-i liikmesriigi või riigi pädevale asutusele, kus kasutaja/patsient asub.

Pesulahus (30 × konts.)



## HOIATUS

**Sisaldus:** ainete 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] ja 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1) reaktsioonimass

H317	Võib tekitada allergilist nahareaktsiooni.
H412	Kahjulik veeorganismidele, pikaajaline toime.
P261	Vältida pihustatud aine sissehingamist.
P273	Vältida sattumist keskkonda.
P280	Kanda kaitsekindaid.
P333 + P313	Nahaärrituse või lööbe korral: pöörduge arsti poole.

Lahjenduspuhver CP, konjugaatlahus, negatiivne kontroll, substraat pNPP

EUH208	Sisaldus: „Ainete 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] ja 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1) reaktsioonimass“. Võib tekitada allergilist reaktsiooni.
EUH210	Ohutuskaart on saadaval tellimisel.

## 5. KOMPLEKTI SISU

- 1 suletud mikrotiiterplaat, millel on inimese IgM-iga kaetud eraldatud süvendid (12 × 8).
- 2 viaali (35 ml) lahjendit Diluent CP (Dil CP), märgistatud siniselt.
- 1 viaal (0,2 ml) negatiivset kontrolli (NC), mis sisaldab inimese seerumit (lahjendada nagu patsiendi seerumiproovi korral).
- 1 viaal (0,2 ml) positiivset kontrolli (PC), mis sisaldab lüofiliseeritud inimese seerumit, vt lõik 9.3 „Positiivse kontrolli rekonstitueerimine“ allpool.
- 1 viaal (maht, vt CoA) aktiivsuskontrolli (AC) poolkvantitatiivseks kasutamiseks, sisaldab lüofiliseeritud inimseerumit (muud päritolu kui PC), vt jaotis 9.3.1 „Aktiivsuse kontrolli rekonstitueerimine“ protseduuri poolkvantitatiivseks rakendamiseks.
- 1 viaal (13 ml) konjugaati, mis sisaldab aluselise fosfataasiga märgistatud C5b-9-vastaseid antikehi (sinine värv).
- 1 viaal (13 ml) substraadi lahust pNPP, kasutusvalmis.
- 1 viaal (30 ml) pesulahust, 30 × kontsentratsioon.

**Pange tähele:** AC rekonstitutsioonimaht on näidatud analüüsisertifikaadil (CoA) (XXX µl) ja AC märgistusel.

## 6. VAJALIKUD MATERJALID VÕI SEADMED, MIS EI OLE KAASAS

- Mikroplaadilugeja 405 nm filtriga.
- Täppispipetid ühekordselt kasutatavate otstega.
- Seib ribade, imava salvrätiku, torude ja taimeri jaoks.
- Inkubaator, mis suudab hoida temperatuuri 37 °C. Kui kasutatakse CO<sub>2</sub>-kappi, veenduge, et CO<sub>2</sub> toide oleks eemaldatud / välja lülitatud.

## 7. KÄITLEMINE JA HOIUSTAMINE

- Reaktiive tuleb hoida temperatuuril 2...8 °C, välja arvatud positiivne ja aktiivsuse kontroll.
- Kõik komplektis olevad reaktiivid on kasutusvalmis, välja arvatud pesulahus ja kontroll.
- Positiivset kontrolli ja aktiivsuse kontrolli tuleb rekonstitueerimiseni hoida temperatuuril –20 °C.
- Rekonstitueeritud positiivset kontrolli ja aktiivsuse kontrolli tuleb hoida temperatuuril < –70 °C ja selle võib üles sulatada ühe korra.

## 8. PROOVIDE ETTEVALMISTAMINE

See analüüs viiakse läbi seerumiproovidega. Vereproovid tuleb koguda aseptilise veenipunktsiooni tehnikaga ja seerum saadakse standardprotseduuride abil. Soovitatav on võtta vähemalt 5 ml täisverd. Laske verel seerumituubides 60–65 minutit toatemperatuuril (20...25 °C) hüübida. Tsentrifugeerige vereproovid ja kandke rakkudeta seerum puhtasse tuubi.

Seerumiproove tuleb korralikult käidelda, et vältida *in vitro* komplemendi aktiveerimist. Seerumiproovid tuleks külmutada pikemaks säilitamiseks vähemalt temperatuuril –70 °C tihedalt suletud tuubides või transportimiseks kuival jääl. Proove ei tohi külmutada ega sulatada rohkem kui üks kord.

Ärge kasutage seerumiproove, mis on ikteerilised, lipeemilised ja hemolüüsitud. Kuumusega inaktiveeritud seerumeid ei saa kasutada. Plasmat ei saa kasutada. Clinical and Laboratory Standards Institute on andnud soovitusel vereproovide säilitamiseks (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. REAKTIIVIDE ETTEVALMISTAMINE JA KÄITLEMINE

### 9.1. Pesulahuse valmistamine

Kui kontsentreeritud pesulahusega viaalis on soolakristalle, viige viaal temperatuuril 37 °C veevanni seniks, kuni kristallid lahustuvad, enne kui pesulahuse lahjendate.

Lahjendage 30 ml 30 × kontsentratsiooniga pesulahust 870 ml destilleeritud vees. Säilitamisel temperatuuril 2...8 °C on lahjendatud pesulahus stabiilne kuni komplekti aegumiskuupäevani.

### 9.2. Negatiivne kontroll (NC)

NC tuleb lahjendada patsiendi seerumiproovina.

### 9.3. Positiivse kontrolli rekonstitueerimine (PC)

Rekonstitueerige PC järgmise protseduuri abil.

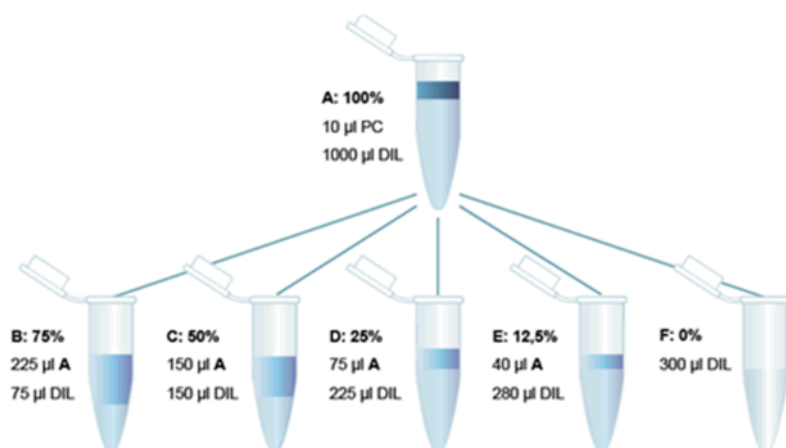
1. Koputage kogu lüofiliseeritud materjal õrnalt viaali põhja ja eemaldage kork.
2. Lisage kohe 200 µl destilleeritud vett otse lüofiliseeritud ainele.
3. Pange kork tagasi.
4. Laske viaalil 5 minutit jääl seista ja seejärel raputage või segage seda aeg-ajalt õrnalt, kuni aine on täielikult lahustunud.
5. Lisalahjendamise kohta vt poolkvantitatiivset ja kvalitatiivset protokollit vastavalt jaotisest 9.3.1 või 9.3.2.

Rekonstitueeritud PC-d saab hoida kuni 4 tundi enne kasutamist temperatuuril 2...8 °C või jääl. Seda tuleb hoida temperatuuril < –70 °C ja selle võib üles sulatada üks kord.

#### 9.3.1. Poolkvantitatiivne protokoll

##### Kalibreerimiskõvera koostamine

Rekonstitueeritud PC lahjendamiseks kalibraatoritesse vt joonis 2 ja tabel 1. Kalibraatori võib enne kasutamist kuni üheks tunniks toatemperatuurile jätta. Kalibraator peab olema värskelt valmistatud ja seda ei tohi hilisemaks kasutamiseks hoida.



**Tabel 1:** kalibreerimiskõvera lahendusmahud.

Kalibraatori kõver	PC (µl)	DIL (µl)
A: 100%	10	1000
Alates 100% (µl)		
B: 75%	225	75
C: 50%	150	150
D: 25%	75	225
E: 12,5%	40	280
F: 0%	0	300

**Joonis 2:** kalibraatori kõvera lahenduskeem. Rekonstitueeritud positiivne kontroll (PC) segatakse testkomplekti lahjendiga (DIL) tabeli järgi.

### Aktiivsuse kontrolli rekonstitueerimine (AC)

1. Koputage kogu lüofiliseeritud materjal õrnalt viaali põhja ja eemaldage kork.
2. Lisage kohe lüofiliseeritud ainele CoA/AC märgistusel näidatud kogus destilleeritud vett.
3. Kinnitage kork uuesti.
4. Laske viaalil 5 minutit jääs seista ja seejärel raputage või segage seda õrnalt, kuni aine on täielikult lahustunud.
5. Lahjendage rekonstitueeritud kontrollproov samal viisil nagu patsiendi seerumiproov.

Rekonstitueeritud aktiivsuse kontrolli saab hoida kuni 4 tundi enne kasutamist temperatuuril 2...8 °C või jääs. Seda tuleb hoida temperatuuril < -70 °C ja selle võib üles sulatada üks kord.

### 9.3.2. Kvalitatiivne protokoll

Lahjendage lahustatud positiivne kontroll, nagu on esitatud juhistes lõigus 9.4: Proovide lahjendamine.

### 9.4. Seerumi käitlemine

Sulatage külmutatud seerumiproovid osaliselt üles, asetades need kergelt segades korraks 37 °C veevanni. Pärast osalist sulatamist asetage tuubid kohe jääle ja jätke sinna kuni täieliku sulamiseni. Segage korraks vortex-mikseril.

### Proovide lahjendamine

Lahjendage seerum 1/101 sinise märgistusega ainega Diluent CP (500 µl lahjendit + 5 µl seerumit) ja segage hoolikalt, kuid õrnalt vortexi abil. Lahjendatud seerumi võib enne analüüsimist jätta toatemperatuurile maksimaalselt 60 minutiks.

## 10. ANALÜÜSIPROTSEDUUR

### 10.1. Loputusprotokoll

Tühjendage süvendid ja peske kolm korda 300 µl pesulahusega, nii et täidate ja tühjendate süvendid iga kord. Pärast viimast pesu tühjendage süvendid riba koputamise teel vastu imavat salvrätikut.

### 10.2. Plaadi paigutus

#### 10.2.1. Poolkvantitatiivne protokoll

Pipettige 100 µl süvendi kohta kalibraatorit (100%-0%), NC-d, AC-d ja lahendatud seerumiproove (P) kahes eksemplaris tabeli 2 järgi. 0% kalibraatorit tuleks kasutada tühiproovina.

**Tabel 2:** soovitatav paigutus plaadil, poolkvantitatiivne protokoll.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100%	12.5%	P1									
<b>B</b>	100%	12.5%	P1									
<b>C</b>	75%	0%	P2									
<b>D</b>	75%	0%	P2									
<b>E</b>	50%	NC	etc									
<b>F</b>	50%	NC										
<b>G</b>	25%	AC										
<b>H</b>	25%	AC										

#### 10.2.2. Kvalitatiivne protokoll

Pipettige 100 µl lahendit süvendi kohta kahes eksemplaris tühiproovina, PC-d, NC-d ja lahendatud seerumiproove (P) tabeli 3 kohaselt.

**Tabel 3:** soovitatav paigutus plaadil, kvalitatiivne protokoll.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Dil CP	P2										
<b>B</b>	Dil CP	P2										
<b>C</b>	PC	etc										
<b>D</b>	PC											
<b>E</b>	NC											
<b>F</b>	NC											
<b>G</b>	P1											
<b>H</b>	P1											

### 10.3. Analüüsiprotokoll

Eemaldage ainult analüüsiks vajalik arv süvendeid ja sulgege uuesti alumiiniumpakend hoolikalt. Laske kõigil lahustel enne analüüsimist toatemperatuurini (20...25 °C) tasakaalustuda.

#### 1. Proovide inkubeerimine

Täitke plaat jaotise 10.2 kohaselt. Inkubeerige kaanega 60–70 minutit temperatuuril +37 °C. Arvestage, et inkubeerimist ei tohi läbi viia CO<sub>2</sub> keskkonnas. Kui kasutatakse CO<sub>2</sub>-kappi, veenduge, et CO<sub>2</sub> toide oleks eemaldatud / välja lülitatud.

#### 2. Pesemine

Peske plaat, nagu on ette nähtud jaotises 10.1, Loputusprotokoll.

#### 3. Konjugaadi inkubeerimine

Lisage igasse süvendisse 100 µl konjugaati. Inkubeerige 30 minutit toatemperatuuril (+20...25 °C).

#### 4. Pesemine

Peske kolm korda nagu varem.

#### 5. Substraadi inkubeerimine

Lisage igasse süvendisse 100 µl substraadi lahust, inkubeerige 30 minutit toatemperatuuril (+20...25 °C).

#### 6. Plaadi näidud

Lugege neelduvus (OD) mikroplaadilugeja abil väärtusega 405 nm.

Valikuline: peatamislahusena saab kasutada 5 mM-i EDTA-d, 100 µl süvendi kohta. Registreerige süvendite neelduvuse näit 60 minuti jooksul.

## 11. KVALITEEDIKONTROLL

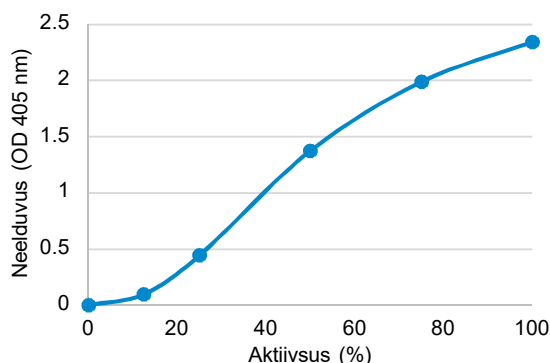
Komplekti kuuluv analüüsisertifikaat (CoA) on partiipõhine ja seda kasutatakse meie laboris saadud tulemuste kontrollimiseks. CoA-s näidatud tulemusi tuleb käsitada ainult juhisena. Teie laboris saadud tulemused võivad erineda.

PC OD peab olema > 1,0 ja NC OD < 0,2 pärast tühiproovi lahutamist (Dil CP, 0%). Kui mis tahes kontroll ei ole vastava vahemiku piires, tuleb analüüs lugeda kehtetuks ja seejärel korrata.

## 12. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

### 12.1. Poolkvantitatiivne protokoll

Lahutage kõigist OD-väärtustest 0% kalibraatori neelduvus. Soovitav on kõvera sobitamise neljaparametriline logistika (Marquardt). Vt standardkõvera näide, joonis 3.



**Joonis 3:** standardkõvera näide. Ülaltoodud joonisel on näide poolkvantitatiivsest standardkõverast ja seda ei tohi kasutada patsiendi proovi tegelikuks tõlgendamiseks.

Juhtudel, kui saadud proovi väärtused on suuremad kui suurim kalibraator 100%, võib proovid lahjendada suhtega 1/201 ja uuesti analüüsida. Pange tähele, et sel juhul tuleb saadud aktiivsuse väärtus kohandada kasutatud proovi lahjendusega.

Soovitavalt kehtestab iga labor puuduste jaoks oma võrdlustaseme ja piirväärtuse.

## 12.2. Kvalitatiivne protokoll

Tõlgendamise hõlbustamiseks on soovitatav kasutada OD tulemusi komplemendi aktiivsuse (% PC-st) väärtuste arvutamiseks. See arvutus hõlbustab ka eri analüüside võrdlemist, kuna OD kipub käitustsüklite vahel muutuma. Komplemendi aktiivsuse arvutamiseks kasutatud meetodit kirjeldatakse allpool.

1. Lahutage NC, PC ja proovide neelduvustest tühikatse (lahjendi) neelduvus.
2. Arvutage , NC, PC ja proovide keskmised OD-väärtused.
3. Arvutage komplemendi aktiivsus järgmise valemi abil.

$$\text{Komplemendi aktiivsus (PC \%)} = \frac{\text{Proov} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

NC ja PC on ette nähtud reaktiivi oluliste rikete jälgimiseks. PC ei taga analüüsi läviväärtuse täpsust. Soovitavalt kehtestab iga labor puuduste jaoks oma võrdlustaseme ja piirväärtuse.

Negatiivset tulemust, st puudujääki, tuleb alati kontrollida uue proovi analüüsimise teel veendumaks, et enne analüüsi ei ole toimunud tahtmatut *in vitro* komplemendi aktiveerimist.

## 13. HINDAMISKRITEERIUMID

### 13.1. Oodatavad tulemused

Kui leitakse komplemendi komponentide või komplemendi funktsiooni vähenenud tase, kaaluvad arstid sellise puudulikkuse või käimasoleva immunoloogilise protsessi olemasolu, mis põhjustab suuremat komponentide lagunemist ja komplemendi taseme langust. Komplemendi taseme tõus on tavaliselt ägeda faasi reaktsiooni mittespetsiifiline väljendus.

WIESLAB®-i komplemendisüsteem Classical pathway võib olla abiks klassikalise rajaga seotud komplemendipuuduste tuvastamisel. Kõigi kolme komplemendiraja täielikuma ja põhjalikuma funktsionaalse hindamise saab saavutada WIESLAB®-i komplemendisüsteemi testkomplekti Screen abil, nagu on näidatud tabelis 4.

**Tabel 4:** eri radade ja võimalike puudulikkuste tulemuste kombinatsioon.

Klassikaline rada	MBL-rada	Alternatiivne rada	Võimalik puudulikkus
Positiivne	Positiivne	Positiivne	Puudub
Negatiivne	Positiivne	Positiivne	C1q, C1r, C1s
Positiivne	Positiivne	Negatiivne	Faktorid B, D ja P
Positiivne	Negatiivne	Positiivne	MBL, MASP-2
Negatiivne	Negatiivne	Negatiivne	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negatiivne	Negatiivne	Positiivne	C4, C2 või kombinatsioon

## 13.2. Piirangud

Üksiku patsiendi komplemenditaseme alusel ei saa mõõta haiguse raskusastet, kuna see võib patsienditi erineda. Seega on tulemuste absoluutset standardiseerimist raske saavutada.

Analüüsile ei tohiks tugineda kliinilise ravi otsuste ainsa alusena, vaid seda tuleks kasutada koos kliiniliste sümptomite ja muude olemasolevate analüüside tulemustega.

Komplemendianalüüsi tulemuste põhjal ei tohi ravi alustada. Ravi alustamine või muutmine ei tohi põhineda ainult komplemendi taseme muutustel, vaid hoolikal kliinilisel vaatlusel.

## 14. TOIMIVUSE OMADUSED

### 14.1. Kliiniline toimivus

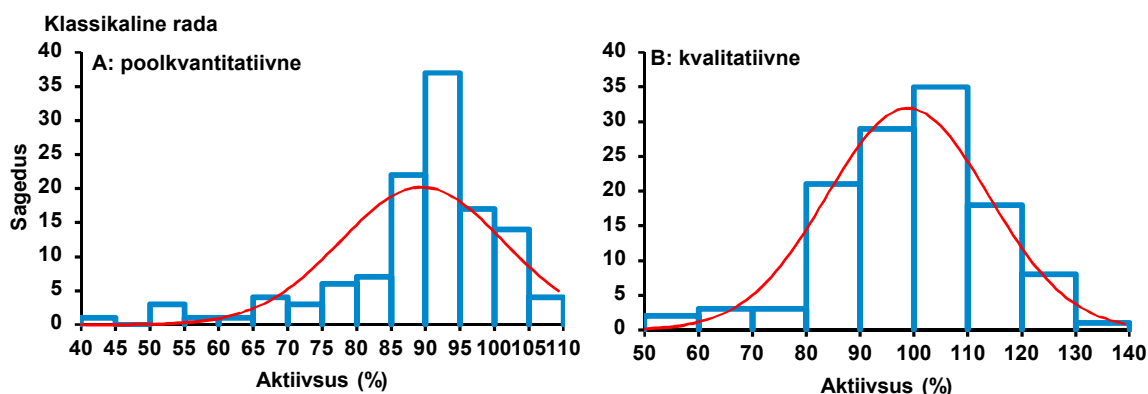
Normaalne jaotus 2SD (standardhälve) piires on näidatud joonisel 4 ja tabelis 5. Selle vahemiku tulemused näitavad klassikalise raja normaalset funktsionaalsust. Soovitatav on, et iga labor kinnitaks või kehtestaks oma teenindatava populatsiooni võrdlusvahemiku.

Võrdlusvahemikest allapoole jääv väärtus näitab kas suuremat aktiveerimist, mille tulemuseks on klassikalise komplemendiraja võime kasutamine, või geneetiliselt määratud nõrka aktiivsust.

Väärtused alla 5% viitavad tugevalt täielikule puudulikkusele, mis on tingitud kas liigsest aktiveerimisest või pärilikust puudulikkusest vastavas rajas. Aktiivsuse langust põhjustavate komplemendi komponentide kindlakstegemiseks on vaja komplementvalkude lisaanalüüsi.

Negatiivset tulemust, st kahtlustatavat puudust, tuleb alati kontrollida uue, hoolikalt töödeldud proovi analüüsimise teel veendumaks, et enne analüüsi ei ole toimunud tahtmatut *in vitro* komplemendi aktiveerimist.

WIESLAB® Complement system Classical pathway kvalitatiivses rakenduses analüüsiti 120 seerumit pealtnäha tervetelt veredonoritelt. Poolkvantitatiivse rakenduse puhul põhineb normaalvahemik matemaatilisel teoreetiliselt arvutusel. 120 pealtnäha terve veredoonori komplemendi aktiivsuse kokkuvõte asub joonisel 4 ja tabelis 5. Uuringus polnud ühegi veredoonori komplemendi aktiivsus alla 40%.



**Joonis 4:** klassikalise raja, poolkvantitatiivse (A) ja kvalitatiivse (B) protokolliga analüüsitud võrdluspopulatsiooni histogramm.

**Tabel 5:** 120 veredoonori väärtused, mis saadi vastavalt poolkvantitatiivse ja kvalitatiivse protokolliga analüüsiga.

Protokoll	n	Keskmine (%)	±2SD (%)	Mediaan (%)
<b>Poolkvantitatiivne</b>	120	89	66-113*	92
<b>Kvalitatiivne</b>	120	99	69-129*	100

\*) See on statistiline arvutus, mis ei taga tõelist piirväärtust. Soovitatavalt kehtestab iga labor kahtlustatava puuduse jaoks oma võrdlustaseme ja piirväärtuse.

Analüüsis testiti teadaoleva komplemendipuuduse ja spetsiifilisest komplemendi komponendist ammendatud seerumeid (tabel 6 ja 7). Kõik puudulikud/ammendatud seerumid olid analüüsis madala väärtusega ning andsid poolkvantitatiivses ja kvalitatiivses protokollis väärtused vastavalt alla 15% ja 5%\*\*).

\*\*\*) Vt „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” teabe saamiseks kvalitatiivse rakendusega analüüsitud puudulikkusega patsientide proovide laiendatud analüüsimise kohta

**Tabel 6:** teadaoleva puudulikkusega proovid.

Puudulikkus	C2	C3	C4	C5	C7	C8
<b>Patsientide arv</b>	5	1	1	1	2	2
<b>Tuvastatud puudulikkusega seerumite arv</b>	5	1	1	1	2	2

**Tabel 7:** ammendatud komponentidega proovid.

Ammendamine	C1q	C3	C4	C5	C7
<b>Ammendatud seerumite arv</b>	2	1	1	1	1
<b>Tuvastatud ammendumise arv</b>	2	1	1	1	1

## 14.2. Täpsus

### 14.2.1. Analüüsivaheline täpsus

#### Poolkvantitatiivne protokoll

**Tabel 8:** analüüsivaheline täpsus poolkvantitatiivse rakenduse jaoks määrati seitsme proovi analüüsimise teel kaheksas korduses kolmel eri korral.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Keskmine väärtus %</b>	71	73	69	72	25	35	31
<b>SD</b>	9	9	6	11	1	2	2
<b>CV %</b>	13%	13%	9%	15%	4%	5%	5%

#### Kvalitatiivne protokoll

**Tabel 9:** kvalitatiivse rakenduse analüüsivaheline täpsus määrati kolme proovi analüüsimisega kahes korduses. Tulemused saadi kuue eri käitustsükli kohta.

	1	2	3
<b>Keskmine väärtus %</b>	98	92	21
<b>SD</b>	4.3	3.9	1.7
<b>CV %</b>	4	4	8

## 14.2.2. Analüüsisisene täpsus

### Poolkvantitatiivne protokoll

**Tabel 10:** analüüsisisene täpsus poolkvantitatiivse rakenduse jaoks määrati seitsme proovi analüüsimise teel kaheksas korduses ühel korral.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Keskmine väärtus %</b>	79	76	72	83	24	34	30
<b>SD</b>	10	11	6	9	0	1	1
<b>CV %</b>	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

### Kvalitatiivne protokoll

**Tabel 11:** kvalitatiivse rakenduse analüüsisisene täpsus määrati ühe proovi analüüsimisega 40 süvendis.

Analüüs	Keskmine väärtus %	SD	CV %
<b>CP</b>	85	2.9	3

## 14.2.3. Partiidevaheline varieerumine

### Poolkvantitatiivne protokoll

**Tabel 12:** partiidevahelised erinevused poolkvantitatiivses rakenduses määrati seitsme proovi analüüsimise teel kahes korduses kolmes eri partiis kolme eri isiku poolt.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Keskmine väärtus %</b>	8	73	85	24	37	74	78
<b>SD</b>	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
<b>CV %</b>	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

### 14.3. Lineaarsus

#### Poolkvantitatiivne protokoll

**Tabel 13:** lahjenduse saagis määrati kolme eri proovi viie serialahjenduse analüüsimise teel.

Proov	Lahjendus	Keskmine mõõdetud aktiivsus (%)	Teoreetiline aktiivsus (%)	Lahjendusega korrigeeritud taastamisprotsent
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
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

### 14.4. Tuvastuspiir

#### Poolkvantitatiivne protokoll

**Kalibraatori mõõtmisvahemik:** 12,5–100%

**Tuvastuspiir (LoD) = 8%**

## 15. VEAOTSING

PROBLEEM	VÖIMALIKUD PÕHJUSED	LAHENDUS
<b>Kontrollväärtused on väljaspool vahemikku</b>	Vale temperatuur, ajastus või pipettimine, reaktiive ei segata.	Kontrollige, kas kellaeg ja temperatuur olid õiged. Korrake analüüsi.
	Kontrollide ristsaastumine.	Olge pipettimisel ettevaatlik.
	Optiline rada ei ole puhas.	Kontrollige, ega süvendites ei ole mustust või õhumulle. Pühkige plaadi põhi puhtaks ja võtke näit uuesti.
	Kontrollid (positiivsed ja/või aktiivsuskontrollid) ei ole õigesti rekonstitueeritud. Kalibraatori lahendus on vale.	Vaadake üle kontrollid, lahustage uus. Kontrollige preparaati ja tehke uus lahendus.
<b>Kõik analüüsitulemused on negatiivsed</b>	Ühte või mitut reaktiivi ei ole lisatud või need on lisatud vales järjestuses.	Kontrollige protseduur üle. Kontrollige kasutamata reaktiive. Korrake analüüsi.
	Antigeeniga kaetud plaat on inaktiivne.	Kontrollige kasutamata süvendis ilmset niiskust. Pühkige plaadi põhi puhtaks ja võtke näit uuesti.
	Seerum on inaktiivne.	Tehke lahendus uutele proovidele.
<b>Kõik proovisüvendid on nähtavalt kollased</b>	Puhvrid või reaktiivid on saastunud.	Kontrollige kõigil lahustel hägusust.
	Pesulahus on saastunud.	Kasutage puhast anumat. Kontrollige lahuse valmistamiseks kasutatud vee kvaliteeti.
	Seerumi lahendus on vale.	Korrake analüüsi.
<b>Täpsus on kehv</b>	Pipettimise CV on > 5% või proovid ei ole segatud.	Kontrollige pipeti kalibreerimist. Kasutage reprodutseeritavat tehnikat. Vältige õhumulle pipetiotsas.
	Seerumit või reaktiive ei ole piisavalt segatud või need ei ole toatemperatuurini tasakaalustatud.	Segage kõik reaktiivid õrnalt, kuid põhjalikult ja tasakaalustage toatemperatuurini.
	Reaktiivi lisamine võtab liiga kaua aega, ajavahemikud on ebaühtlased.	Töötage välja järjepidev ühtne tehnika ja kasutage aja lühendamiseks mitme otsaga seadet või automaatjaoturit.
	Optiline rada ei ole puhas.	Kontrollige, ega süvendites ei ole õhumulle. Pühkige plaadi põhi puhtaks ja võtke näit uuesti.
	Pesemine ei ole ühtlane, mullid on kinni jäänud, pesulahus on jäänud süvenditesse.	Kontrollige, et kõik süvendid oleksid ühtlaselt täidetud ja aspireeritud. Doseerige vedelik süvendisse reaktiivi tasemest kõrgemale. Pärast viimast pesu tühjendage süvendid riba koputamise teel vastu imavat salvrätikut.












## 16. KIRJANDUSE VIITED

- 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. J Immunol Methods. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. SÜMBOLITE KIRJELDUS

Pakendil ja märgistusel võivad olla järgmised sümbolid.

	Partii kood.
	Katalooginumber.
	Kõlblikkusaeg.
	Temperatuuripiirang.
	Bioloogiline risk.
	Tutvuge kasutusjuhistega.
	<i>In vitro</i> diagnostiliseks kasutamiseks.
	Tootja.
	Sisaldab piisavat kogust 96 analüüsiks.
	Kooskõlas <i>in vitro</i> diagnostikameditsiiniseadmete direktiiviga 98/79/EÜ.
	Terviseoht.

Ag	Antigeen (kaetud plaat).
DIL	Lahjendi.
BUF WASH 30X	Pesupuhver, 30 × kontsentraat.
CONTROL + LYO	Positiivne kontroll.
CONTROL AC LYO	Lüofiliseeritud aktiivsuse kontroll.
CONTROL -	Negatiivne kontroll.
CONJ	Konjugaat.
SUBS pNPP	Substraat pNPP.
CH REP	Šveitsi esindaja.

## 18. DOKUMENDI AJALUGU

Version	Muudatused
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Suuremad toimetuslikud muudatused koos uue dokumendipaigutusega. Poolkvantitatiivse ja kvalitatiivse rakenduse protseduurid on kokku koondatud ning lisati eraldi alamrubriigid sinna kus vaja.</p> <p>Lisatud on teave „Analüüsi peavad läbi viima koolitatud laborispetsialistid“.</p> <p>Lisatud on teave metrooloogilise jälgitavuse kohta.</p> <p>Selguse huvides on positiivse kontrolli spetsifikatsiooni väärtus &gt; 1 muudetud väärtuseks &gt; 1,0.</p> <p>Lisatud on teave CO<sub>2</sub>-kapi kohta.</p>
LABEL-DOC-0031 v 7.0	<p>Jaotises 14.1 on suurendatud läbipaistvust, et poolkvantitatiivsed andmed põhinevad matemaatilisel teoreetilisel arvutusel.</p> <p>Tabelites 6 ja 10 olevaid väärtusi värskendati, et need vastaksid versioonis 5.0 avaldatud toimivuse hindamisele.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)

Consigne d'utilisation  
**WIESLAB<sup>®</sup> Complement system**  
Classical pathway  
Test qualitatif et semi-quantitatif

Pour un usage diagnostique in vitro

Essai immuno-enzymatique pour l'évaluation de  
l'activité fonctionnelle du complément

- Barrettes de microtitration sécables (12 x 8) 96 puits
- Conserver le kit à +2-8 °C
- Conserver le contrôle positif et le contrôle d'activité à -20 °C



Doc. n° LABEL-DOC-0031 7.0

Date d'effet : 22-Jan-2026

## 1. UTILISATION PRÉVUE

Le WIESLAB® Complement system Classical pathway (CP) kit est un essai immuno-enzymatique pour la détermination qualitative et/ou semi-quantitative de la voie classique fonctionnelle du complément dans le sérum humain. L'analyse doit être effectuée par des professionnels de laboratoire qualifiés.

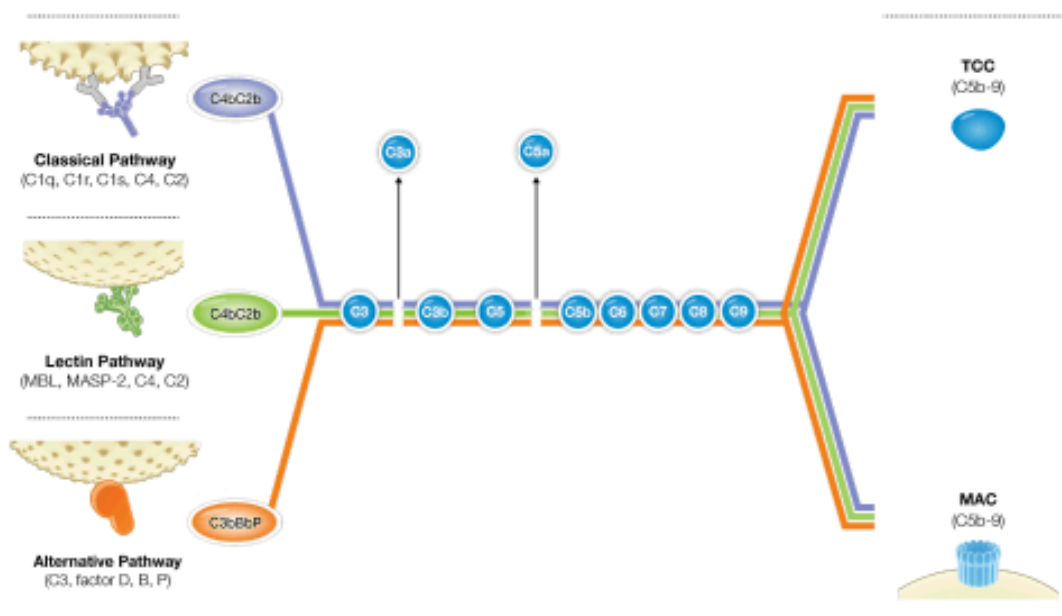
POUR UN USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

## 2. 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 (Figure 1), à savoir la voie classique, la voie MBL (lectines) et la voie alterne.

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 conduit à la consommation de composants du complément, laquelle entraîne à son tour une diminution de leur concentration. Ainsi, la détermination des protéines du complément ou de l'activité du complément sert d'indicateur pour déterminer si le système du 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 lorsqu'une maladie activatrice du complément est suspectée ou qu'une déficience héréditaire est possible. Le niveau d'activité du complément, évalué par des essais fonctionnels tels que les WIESLAB Complement kits prend en compte le taux de synthèse, de dégradation et de consommation des composants et fournit une mesure de l'intégrité des voies, par opposition aux méthodes immunochimiques qui mesurent spécifiquement la concentration de différents composants du complément.



**Figure 1** : Schéma du système du complément. Le système du complément peut être activé via la voie classique, la voie MBL (lectines) ou la voie alterne par différentes molécules activatrices. L'activation aboutit à la formation de C3 convertases, lesquelles sont responsables du clivage du C3 et par la suite du C5. Le clivage du C5 en C5b initie la formation du complexe MAC (également appelé complexe terminal du complément (TCC) ou C5b-9).

### 3. PRINCIPE DU WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY

L'essai WIESLAB® Complement system Classical pathway 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 de la voie classique.

Dans le Complement system Classical pathway kit, les puits des barrettes de microtitration sont revêtus d'un activateur spécifique de la voie classique. La plaque, en combinaison avec une composition tampon de dilution de l'échantillon et un niveau de dilution du sérum du patient, assure que seule la voie classique est activée. Pendant l'incubation du sérum du patient dilué dans les puits, le complément est activé par le 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 complexe d'attaque membranaire (MAC).

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

#### Traçabilité métrologique

La valeur attribuée au contrôle positif est définie comme 100 % de l'activité normale de la voie du complément et n'est pas traçable aux unités SI. Elle est établie à l'aide de sérums humains normaux regroupés évalués avec la procédure d'essai ELISA décrite avec un système de référence interne comme le niveau de hiérarchie d'étalonnage le plus élevé.

### 4. AVERTISSEMENTS, MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

- POUR UN USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.
- Les composants du sérum humain utilisés dans la préparation des contrôles du kit ont été testés par des méthodes approuvées par la FDA et se sont révélés 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 l'antigène de surface de l'hépatite B. Étant donné qu'aucune méthode de test ne peut garantir complètement 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 and National Institutes of Health (Centres de contrôle et de prévention des maladies - CDC) recommandent de manipuler les agents potentiellement infectieux 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 l'échantillon du patient entrer en contact avec la peau. Les réactifs contenant du ProClin peuvent être irritants. Éviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, rincer abondamment à l'eau.
- La fiche de données de sécurité de tous les composants dangereux contenus dans ce kit est disponible sur demande auprès de Svar Life Science.
- Ne pas utiliser les composants après la date d'expiration.
- Les réactifs du kit sont spécifiques au kit et ne doivent pas être mélangés entre les lots du kit.
- Éliminer tous les composants usagés, les échantillons utilisés/restants et les contrôles restants en tant que déchets biologiques dangereux conformément aux réglementations locales. Les autres composants restants doivent être éliminés comme des déchets dangereux conformément aux réglementations locales.

- Tout incident grave survenu en relation avec ce dispositif doit être signalé à la Svar Life Science AB ainsi qu'à l'autorité compétente de l'État membre de l'UE ou du pays dans lequel l'utilisateur/patient est établi.

Solution de lavage (conc. 30x)



#### AVERTISSEMENT

**Contient :** Masse réactionnelle 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 réaction d'allergie cutanée.  
 H412 Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets 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 : demander un avis médical.

Tampon de dilution CP, solution de conjugué, contrôle négatif, substrat pNPP

EUH208 Contient une « masse réactionnelle 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) » Peut produire une réaction allergique.

EUH210 Fiche de données de sécurité disponible sur demande.

## 5. CONTENU DU KIT

- 1 plaque de microtitration scellée avec puits sécables (12x8) revêtus d'IgM humaine.
- 2 flacons (35 ml) de diluant CP (Dil CP), marqué en bleu.
- 1 flacon (0,2 ml) de contrôle négatif (NC) contenant du sérum humain (à diluer comme pour un échantillon de sérum d'un patient).
- 1 flacon (0,2 ml) de contrôle positif (PC) contenant du sérum humain lyophilisé, voir section 9.3. « Reconstitution du contrôle positif », ci-dessous.
- 1 flacon (vol., voir CoA) de contrôle d'activité (AC) pour application semi-quantitative, contenant du sérum humain lyophilisé (origine différente du PC), voir section 9.3.1. « Reconstitution du contrôle d'activité » sous la procédure d'application semi-quantitative.
- 1 flacon (13 ml) de conjugué contenant des anticorps marqués à la phosphatase alcaline dirigés contre C5b-9 (couleur bleue).
- 1 flacon (13 ml) de solution substrat pNPP, prête à l'emploi.
- 1 flacon (30 ml) de solution de lavage, concentrée 30x.

**Remarque :** le volume de reconstitution de l'AC est indiqué sur le certificat d'analyse (CoA) (XXX µl) et l'étiquette de l'AC.

## 6. MATÉRIAUX OU ÉQUIPEMENTS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Lecteur de microplaques avec filtre à 405 nm.
- Pipettes de précision à pointes jetables.
- Laveur pour barrettes, papier absorbant, tubes et minuteur.
- Incubateur capable de maintenir une température de 37 °C. Si une armoire CO<sub>2</sub> est utilisée, assurez-vous que l'alimentation CO<sub>2</sub> est déconnectée/éteinte

## 7. MANUTENTION ET STOCKAGE

- Les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C, à l'exception du contrôle positif et du contrôle d'activité.
- Tous les réactifs du kit sont prêts à l'emploi, à l'exception de la solution de lavage et des contrôles.
- Le contrôle positif et le contrôle d'activité doivent être stockés à -20 °C jusqu'à reconstitution.
- Le contrôle positif et le contrôle d'activité reconstitués doivent être conservés à < -70 °C et ne peuvent être décongelés qu'une seule fois.

## 8. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Ce test est effectué sur des échantillons de sérum. Les échantillons de sang doivent être prélevés à l'aide d'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 à 25 °C). Centrifuger les échantillons de sang et transférer le sérum acellulaire dans un tube propre.

Les sérums doivent être manipulés correctement pour prévenir toute activation du complément *in vitro*. Les sérums doivent être congelés à une température égale ou inférieure à -70 °C dans des tubes hermétiquement fermés 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 Clinical and Laboratory Standards Institute fournit des recommandations pour le stockage des échantillons de sang (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. PRÉPARATION ET MANIPULATION DES RÉACTIFS

### 9.1. 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 ce que les cristaux soient dissous 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. Conservée entre 2 et 8 °C, la solution de lavage diluée est stable jusqu'à la date de péremption du kit.

### 9.2. Contrôle négatif (NC)

Le NC doit être dilué comme un échantillon de sérum de patient.

### 9.3. Reconstitution du contrôle positif (PC)

Reconstituer le PC selon la procédure suivante :

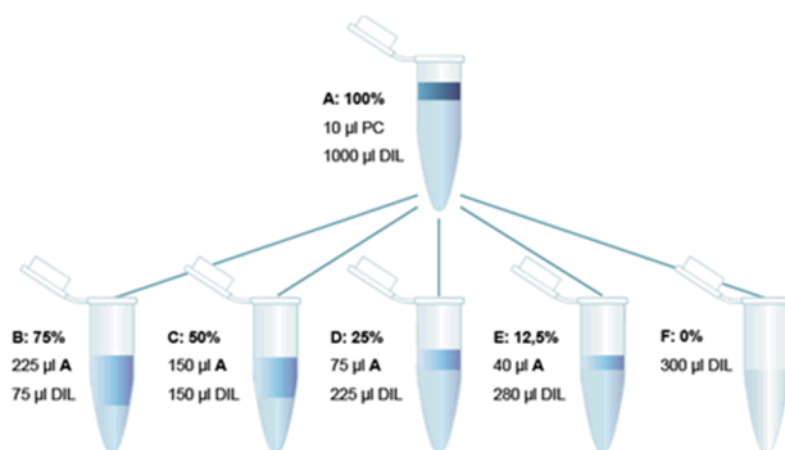
1. Tapoter doucement pour faire descendre toute la matière lyophilisée au fond du flacon et retirer l'opercule.
2. Ajouter immédiatement 200 µl d'eau distillée directement à la matière lyophilisée.
3. Remettre l'opercule.
4. Laisser reposer le flacon sur de la glace pendant 5 minutes, puis l'agiter doucement ou le faire tourbillonner de temps en temps jusqu'à ce que la dissolution soit complète.
5. Pour une dilution supplémentaire, voir la section 9.3.1. ou 9.3.2. pour le protocole semi-quantitatif et qualitatif, respectivement.

Le PC 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 une température inférieure à -70 °C et ne peut être décongelé qu'une seule fois.

### 9.3.1. Protocole semi-quantitatif

#### Préparation de la courbe d'étalonnage

Pour la dilution du PC reconstitué en étalons, veuillez consulter la Figure 2 et le Tableau 1. L'étalon peut être laissé à température ambiante jusqu'à 1 h avant utilisation. L'étalon doit être fraîchement préparé et ne peut pas être conservé en vue d'une utilisation ultérieure.



**Tableau 1** : Volumes pour diluer la courbe d'étalonnage.

Courbe d'étalonnage	PC (µl)	DIL (µl)
<b>A : 100 %</b>	10	1000
<b>À partir de 100 % (µl)</b>		
<b>B : 75 %</b>	225	75
<b>C : 50 %</b>	150	150
<b>D : 25 %</b>	75	225
<b>E : 12,5 %</b>	40	280
<b>F : 0 %</b>	0	300

**Figure 2** : Schéma de dilution pour la courbe d'étalonnage. Le contrôle positif reconstitué (PC) est mélangé avec le diluant du kit (DIL) conformément au tableau.

#### Reconstitution du contrôle d'activité (AC)

1. Tapoter doucement pour faire descendre toute la matière lyophilisée au fond du flacon et retirer l'opercule.
2. Ajouter immédiatement le volume d'eau distillée indiqué sur l'étiquette du CoA/AC directement à la matière lyophilisée.
3. Remettre le bouchon.
4. Laisser reposer le flacon sur de la glace pendant 5 minutes, puis l'agiter ou le faire tourbillonner délicatement jusqu'à dissolution complète.
5. 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 utilisation s'il est conservé entre 2 et 8 °C ou sur de la glace. Il doit être stocké à une température inférieure à -70 °C et ne peut être décongelé qu'une seule fois.

#### 9.3.2. Protocole qualitatif

Diluer le contrôle positif reconstitué selon les instructions de la section 9.4. : Dilution des échantillons.

#### 9.4. Manipulation du sérum

Décongeler partiellement les sérums congelés en les plaçant brièvement dans un bain-marie à 37 °C et en remuant doucement. Après décongélation partielle, placer immédiatement les tubes sur de la glace et les laisser là jusqu'à ce qu'ils soient complètement décongelés. Mélanger brièvement sur un agitateur vortex.

## Dilution des échantillons

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

## 10. PROCÉDURE D'ESSAI

### 10.1. Protocole de rinçage

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.

### 10.2. Disposition sur la plaque

#### 10.2.1. Protocole semi-quantitatif

Pipeter en double 100 µL/puits d'étalon (100 %-0 %), de NC, d'AC et d'échantillons de sérum dilué (P) conformément au Tableau 2. L'étalon à 0 % doit être utilisé comme un blanc.

**Tableau 2** : Disposition de plaque suggérée, protocole semi-quantitatif.

	1.	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100 %	12,5 %	P1									
<b>B</b>	100 %	12,5 %	P1									
<b>C</b>	75 %	0 %	P2									
<b>D</b>	75 %	0 %	P2									
<b>E</b>	50 %	NC	etc									
<b>F</b>	50 %	NC										
<b>G</b>	25 %	AC										
<b>H</b>	25 %	AC										

#### 10.2.2. Protocole qualitatif

Pipeter en double 100 µl/puit de diluant comme un blanc, de PC, de NC et d'échantillons de sérum dilués (P) conformément au Tableau 3.

**Tableau 3** : Disposition de plaque suggérée, protocole qualitatif.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Dil CP	P2										
<b>B</b>	Dil CP	P2										
<b>C</b>	PC	etc										
<b>D</b>	PC											
<b>E</b>	NC											
<b>F</b>	NC											
<b>G</b>	P1											
<b>H</b>	P1											

### 10.3. Protocole d'essai

Retirer uniquement le nombre de puits nécessaires pour les tests, en refermant soigneusement l'emballage en aluminium. Laisser toutes les solutions s'équilibrer à température ambiante (20-25 °C) avant l'analyse.

#### 1. Incubation des échantillons

Remplir la plaque conformément à la section 10.2. Laisser incuber pendant 60 à 70 minutes à +37 °C avec le couvercle. Veuillez noter qu'aucune incubation ne doit être effectuée sous une atmosphère de CO<sub>2</sub>. Si une armoire CO<sub>2</sub> est utilisée, assurez-vous que l'alimentation CO<sub>2</sub> est déconnectée/éteinte.

#### 2. Laver

Laver la plaque conformément à la section 10.1. : Protocole de rinçage.

#### 3. Incubation du conjugué

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

#### 4. Laver

Laver 3 fois comme avant.

#### 5. Incubation du substrat

Ajouter 100 µL de solution de substrat dans chaque puits, laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante (+20-25 °C).

#### 6. Lire la plaque

Mesurer l'absorbance (DO) à 405 nm sur un lecteur de microplaques.

Facultatif : Il est possible d'utiliser de l'EDTA 5 mM comme solution d'arrêt, à 100 µl/puits. Lire l'absorbance des puits dans les 60 minutes.

## 11. CONTRÔLE DE QUALITÉ

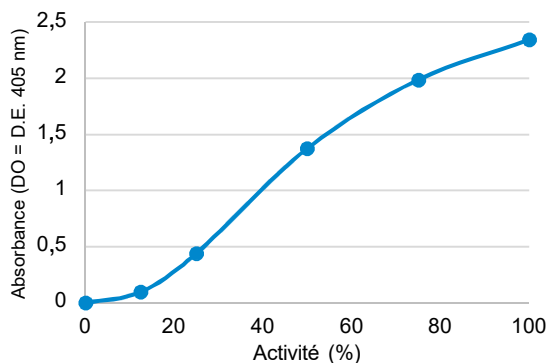
Le certificat d'analyse (CoA) inclus dans le kit est spécifique au lot et doit être utilisé pour vérifier les résultats obtenus par notre laboratoire. Les résultats indiqués sur le CoA doivent être utilisés à titre indicatif uniquement. Les résultats obtenus par votre laboratoire peuvent différer.

La DO du PC doit être > à 1,0 et la DO du NC < à 0,2 après soustraction du blanc (Dil CP, 0 %). Si l'un des contrôles n'est pas dans sa plage respective, le test doit être considéré comme non valide et doit être répété.

## 12. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

### 12.1. Protocole semi-quantitatif

Soustraire l'absorbance de l'étalon 0 % de toutes les valeurs DO. Une logistique d'ajustement de courbe à 4 paramètres (Marquardt) est recommandée. Voir un exemple de courbe standard dans la Figure 3.



**Figure 3 :** Exemple de courbe standard. La figure ci-dessus montre un exemple de courbe semi-quantitative standard et ne doit pas être utilisée pour l'interprétation réelle de l'échantillon du patient.

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

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir son propre niveau de référence et sa propre valeur seuil pour les déficits.

## 12.2. Protocole qualitatif

Il est recommandé d'utiliser les résultats DO pour calculer les valeurs d'activité du complément (% de PC) afin de faciliter l'interprétation. Ce calcul facilite également les comparaisons entre différentes analyses, car la DO est plus susceptible de changer d'une exécution à l'autre. La méthode utilisée pour calculer l'activité du complément est décrite ci-dessous.

1. Soustraire l'absorbance du blanc (diluant) des absorbances du NC, du PC et des échantillons.
2. Calculer les valeurs DO moyennes pour le NC, le PC et les échantillons.
3. Calculer l'activité du complément en utilisant la formule ci-dessous :

$$\text{Activité du complément (\% de PC)} = \frac{\text{Échantillon} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

Les NC et PC sont destinés à surveiller toute détérioration significative des réactifs. Le PC ne garantira pas la précision de la valeur seuil de l'essai. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir son propre niveau de référence et sa propre valeur seuil pour les déficits.

Un résultat négatif, c'est-à-dire un déficit, doit toujours être vérifié en testant un nouvel échantillon pour garantir qu'aucune activation accidentelle du complément n'a eu lieu *in vitro* avant l'exécution de l'essai.

## 13. CRITÈRES D'ÉVALUATION

### 13.1. Résultats attendus

Lorsque l'on observe des taux réduits de 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. L'augmentation des taux du complément est généralement une expression non spécifique d'une réponse de phase aiguë.

Le WIESLAB® Complement system Classical pathway peut être utile pour la détection des déficits du complément liés à la voie classique. Une évaluation fonctionnelle plus complète et plus approfondie des trois voies du complément peut être réalisée en utilisant le WIESLAB® Complement system Screen kit comme indiqué dans le tableau 4.

**Tableau 4** : Combinaison des résultats dans les différentes voies et éventuels déficits.

Voie classique	Voie MBL	Voie alterne	Déficit possible
Positive	Positive	Positive	Aucun
Négative	Positive	Positive	C1q, C1r, C1s
Positive	Positive	Négative	Facteur B, D et P
Positive	Négative	Positive	MBL, MASP-2
Négative	Négative	Négative	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Négative	Négative	Positive	C4, C2 ou combinaison

## 13.2. 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. Il est donc difficile d'obtenir une normalisation absolue des résultats.

Le test ne doit pas être considéré comme la seule base de décision en matière de traitement clinique, mais il doit être utilisé en combinaison avec les symptômes cliniques et les résultats d'autres tests disponibles. Le traitement ne doit pas être initié sur la base du résultat de l'essai du complément. Toute initiation ou modification d'un traitement ne doit pas s'appuyer sur les seuls changements des taux du complément, mais plutôt sur une observation clinique minutieuse.

## 14. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

### 14.1. Performances cliniques

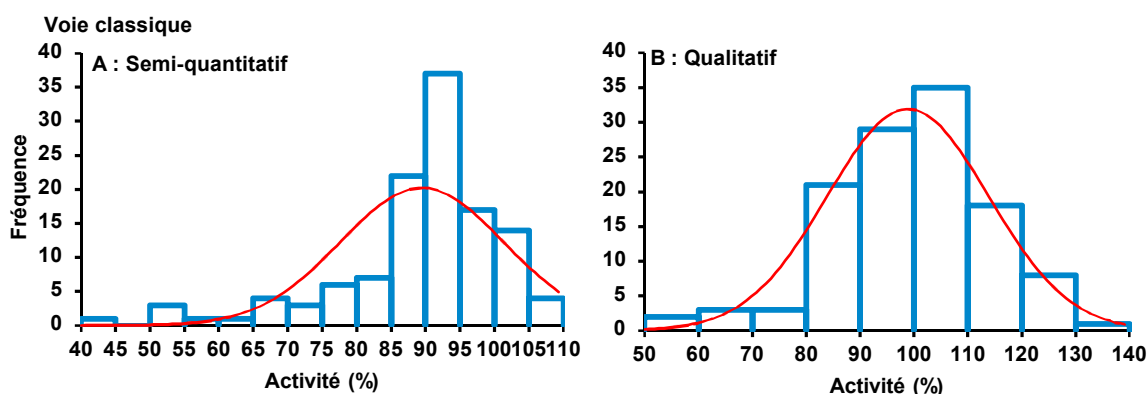
La distribution normale dans les 2SD (écart type) est indiquée dans la Figure 4 et le Tableau 5. Les résultats situés dans cette plage indiquent un fonctionnement normal de la voie classique. Il est recommandé à chaque laboratoire de confirmer ou d'établir sa propre plage de référence pour la population concernée.

Une valeur inférieure aux plages de référence indique soit une activation accrue, entraînant la consommation de la capacité de la voie classique du complément, soit une faible activité génétiquement déterminée.

Des valeurs inférieures à 5 % suggèrent fortement un déficit complet, causé soit par une activation excessive, soit par un déficit héréditaire de la voie concernée. Pour déterminer quel(s) facteur(s) du complément provoque(nt) la diminution de l'activité, une analyse plus approfondie des protéines du complément est nécessaire.

Un résultat négatif, c'est-à-dire la suspicion d'un déficit, doit toujours être vérifié par le test d'un nouvel échantillon, lequel doit être manipulé avec soin, pour s'assurer qu'aucune activation *in vitro* du complément n'a eu lieu.

Des sérums provenant de 120 donneurs de sang apparemment en bonne santé ont été testés dans l'application qualitative WIESLAB® Complement system Classical pathway. Pour l'application semi-quantitative, la plage normale est basée sur un calcul théorique mathématique. L'activité du complément des 120 donneurs de sang apparemment sains est résumée dans la figure 4 et le tableau 5. Dans l'étude, aucun donneur de sang n'était en dessous de 40 %.



**Figure 4 :** Histogramme de la population de référence analysée selon le protocole classique, semi-quantitatif (A) et qualitatif (B), respectivement.

**Tableau 5** : Valeurs pour les 120 dons de sang analysés avec un protocole semi-quantitatif et qualitatif, respectivement.

Protocole	n	Moyenne (%)	±2SD (%)	Médiane (%)
<b>Semi-quantitatif</b>	120	89	66-113*	92
<b>Qualitatif</b>	120	99	69-129*	100

\*) Il s'agit d'un calcul statistique qui ne garantit pas un véritable seuil. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir son propre niveau de référence et sa propre valeur seuil pour le déficit suspecté.

Des sérums présentant des déficits en complément connus et des sérums appauvris en facteurs spécifiques du complément ont été testés dans l'essai (Tableaux 6 et 7). Tous les sérums déficients/appauvris étaient faibles dans l'essai et ont donné des valeurs inférieures à 15 % et 5 %\*\*) dans les protocoles semi-quantitatif et qualitatif, respectivement.

\*\*) 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", for extended tests of deficient patient samples tested with qualitative application

**Tableau 6** : Échantillons présentant des déficits connus.

Déficit	C2	C3	C4	C5	C7	C8
<b>Nombre de patients</b>	5	1	1	1	2	2
<b>Nombre de sérums déficients détectés</b>	5	1	1	1	2	2

**Tableau 7** : Échantillons avec des composants appauvris.

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

## 14.2. Précision

### 14.2.1. Précision inter-essais

#### Protocole semi-quantitatif

**Tableau 8** : La précision inter-essais pour l'application semi-quantitative a été déterminée en testant sept échantillons dans huit répliques à trois occasions différentes.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Valeur moyenne %</b>	71	73	69	72	25	35	31
<b>SD</b>	9	9	6	11	1	2	2
<b>CV %</b>	13 %	13 %	9 %	15 %	4 %	5 %	5 %

#### Protocole qualitatif

**Tableau 9** : 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.

	1	2	3
<b>Valeur moyenne %</b>	98	92	21
<b>SD</b>	4,3	3,9	1,7
<b>CV %</b>	4	4	8

### 14.2.2. Précision intra-essais

#### Protocole semi-quantitatif

**Tableau 10 :** La précision intra-essais pour l'application semi-quantitative a été déterminée en testant sept échantillons différents dans huit répliques à une occasion.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Valeur moyenne %</b>	79	76	72	83	24	34	30
<b>SD</b>	10	11	6	9	0	1	1
<b>CV %</b>	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

#### Protocole qualitatif

**Tableau 11 :** La précision intra-essais pour l'application qualitative a été déterminée en testant un échantillon dans 40 puits.

Essai	Valeur moyenne %	SD	CV %
<b>CP</b>	85	2,9	3

### 14.2.3. Variation d'un lot à l'autre

#### Protocole semi-quantitatif

**Tableau 12 :** La variation d'un lot à l'autre dans l'application semi-quantitative a été déterminée en testant sept échantillons en double sur trois lots différents par trois personnes différentes.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Valeur moyenne %</b>	8	73	85	24	37	74	78
<b>SD</b>	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
<b>CV %</b>	10 %	20 %	15 %	5 %	5 %	10 %	8 %

### 14.3. Linéarité

#### Protocole semi-quantitatif

**Tableau 13 :** La récupération de dilution a été déterminée en testant cinq dilutions en série pour trois échantillons différents.

Échantillon	Dilution	Activité moyenne mesurée (%)	Activité théorique (%)	% de récupération corrigé pour la dilution
<b>1</b>	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
<b>2</b>	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
<b>3</b>	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

### 14.4. Limite de détection

#### Protocole semi-quantitatif

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

**Limite de détection (LoD) =** 8 %

## 15. DÉPANNAGE









PROBLÈME	CAUSES POSSIBLES	SOLUTION
<b>Valeurs de contrôle hors limites.</b>	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 soigneusement.
	Le trajet optique n'est pas propre.	Vérifier la présence de saleté ou de bulles d'air dans les puits. Essuyer le fond de la plaque et procéder à une nouvelle mesure.
	Les contrôles (contrôles positifs 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.
<b>Tous les résultats des tests sont négatifs.</b>	Un ou plusieurs réactifs n'ont pas été ajoutés, ou ont été ajoutés dans un mauvais ordre.	Revérifier la procédure. Vérifier la présence de réactifs non utilisés. Répéter le test.
	La plaque revêtue d'antigène est inactive.	Vérifier la présence d'humidité évidente dans les puits inutilisés. Essuyer le fond de la plaque et procéder à une nouvelle mesure.
	Sérum inactif.	Diluer de nouveaux échantillons.
<b>Tous les puits d'échantillons sont visiblement jaunes.</b>	Tampons ou réactifs contaminés.	Vérifier la turbidité de toutes les solutions.
	La solution de lavage est contaminée.	Utiliser un récipient propre. Vérifier la qualité de l'eau utilisée pour la préparation de la solution.
	Dilution incorrecte du sérum.	Répéter le test.
<b>Précision médiocre.</b>	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 ne sont pas équilibrés à température ambiante.	Mélanger tous les réactifs doucement mais complètement et équilibrer à température ambiante.
	L'ajout de réactif prend trop de temps, incohérence dans les intervalles de temps.	Employer une technique uniforme et 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 fond 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 uniformément. Distribuer le liquide au-dessus du niveau du réactif dans les puits. Après le dernier lavage, vider les puits en tapotant la barrette sur un papier absorbant.




## 16. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. J Immunol Methods. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. DESCRIPTION DES SYMBOLES

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l'emballage et l'étiquette :

	Numéro de lot.
	Référence catalogue.
	Date de péremption.
	Seuils de température.
	Risque biologique.
	Consulter la notice d'utilisation.
	Usage diagnostique in vitro.
	Fabricant.

	Contenu suffisant pour 96 tests.
	Conformité à la directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.
	Danger pour la santé.

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Ag</div>	Antigène (plaque revêtue).
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DIL</div>	Diluant.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BUF</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">WASH</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">30X</div>	Tampon de lavage, concentré 30x.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">+</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">LYO</div>	Contrôle positif.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">AC</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">LYO</div>	Contrôle d'activité lyophilisé.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">-</div>	Contrôle négatif.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONJ</div>	Conjugué.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">SUBS</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">pNPP</div>	Substrat pNPP.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CH</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">REP</div>	Représentant suisse.

## 18. HISTORIQUE DU DOCUMENT

Version	Modifications
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Modifications éditoriales majeures avec une nouvelle mise en page du document. Les procédures d'application semi-quantitative et qualitative ont été fusionnées et des sous-rubriques distinctes ont été introduites, le cas échéant.</p> <p>Ajout de l'information selon laquelle « L'analyse doit être effectuée par des professionnels de laboratoire qualifiés ».</p> <p>Ajout d'informations concernant la traçabilité métrologique.</p> <p>La spécification pour le contrôle positif est modifiée de &gt; 1 à &gt; 1,0 pour plus de clarté.</p> <p>Ajout d'informations concernant l'armoire CO<sub>2</sub>.</p>
LABEL-DOC-0031 v 7.0	<p>Transparence accrue dans la section 14.1 indiquant que les données semi-quantitatives sont basées sur un calcul théorique mathématique.</p> <p>Les valeurs des tableaux 6 et 10 ont été mises à jour pour correspondre à l'évaluation des performances publiée dans la version 5.0.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)

Anleitung  
**WIESLAB® Complement system**  
Classical pathway  
Qualitativer und semiquantitativer Test

Zur In-vitro-Diagnostik

Enzymimmunoassay zur Beurteilung der  
funktionellen Komplementaktivität

- Teilbare Mikrotitrationsstreifen (12 x 8) mit 96 Kavitäten
- Kit bei +2–8° C aufbewahren
- Positivkontrolle und Aktivitätskontrolle bei -20 °C aufbewahren



Dokument-Nr. LABEL-DOC-0031 7.0

Datum des Inkrafttretens: 22-Jan-2026

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Das WIESLAB® Complement system Classical pathway (CP) kit ist ein Enzymimmunoassay zur qualitativen und/oder semiquantitativen Bestimmung des funktionellen klassischen Komplementweges im Humanserum. Die Analyse sollte von geschulten Laborfachleuten durchgeführt werden.

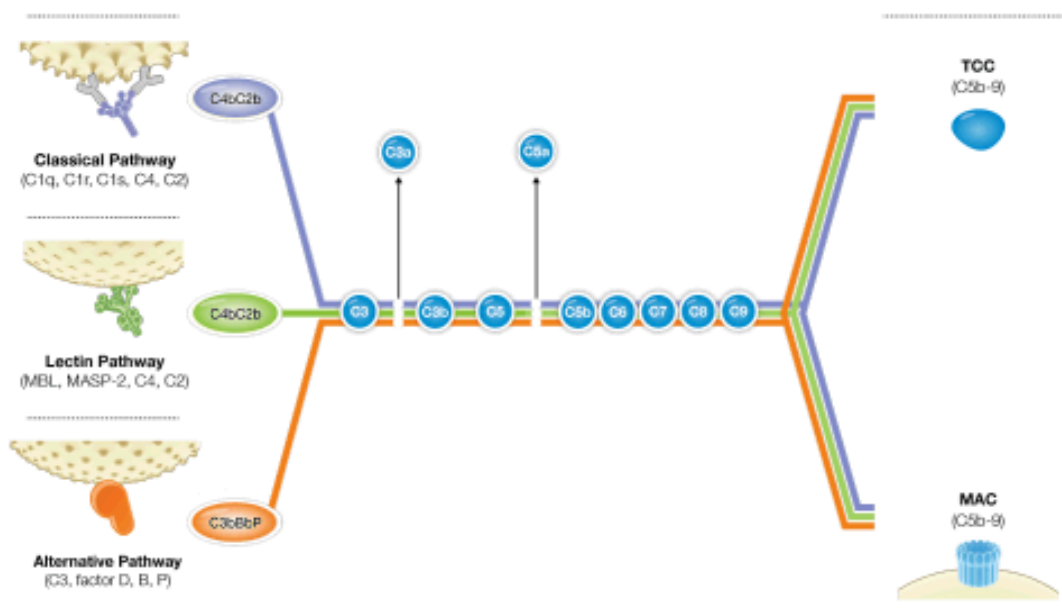
ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

## 2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Das Komplementsystem spielt eine wichtige Rolle bei chronischen, Autoimmun- und Infektionskrankheiten. Es gibt drei Wege der Komplementaktivierung (Abbildung 1) – der klassische Weg, der MBL(Lektin)-Weg und der alternative Weg.

Ist die Komplementaktivität gestört, sind die Betroffenen anfällig für wiederkehrende fulminante oder schwere Infektionen, und die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wird begünstigt. Eine fehlgeleitete Aktivierung des Komplementsystems trägt zu chronischen Entzündungen und Gewebeschäden bei.

*In vitro* führt die Aktivierung der Komplementkaskade zum Verbrauch von Komplementfaktoren, wodurch deren Konzentration abnimmt. Die Bestimmung von Komplementproteinen oder der Komplementaktivität dient also dazu, festzustellen, ob das Komplementsystem durch einen immunologischen und/oder pathogenen Mechanismus aktiviert wurde. Wird bei einem Patienten eine komplementaktivierende Erkrankung vermutet oder besteht der Verdacht auf einen hereditären Defekt, kommen sowohl funktionelle als auch immunchemische Komplementmessungen zum Einsatz. Funktionelle Tests wie *WIESLAB* Complement kits messen die Komplementaktivität und berücksichtigen dabei die Syntheserate, den Abbau und den Verbrauch der Komplementfaktoren und treffen somit eine Aussage über die Integrität der Aktivierungswege. Immunchemische Methoden dagegen messen spezifische Konzentrationen einzelner Komplementfaktoren.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Komplementsystems. Das Komplementsystem kann über den klassischen, den MBL(Lektin)- oder den alternativen Weg durch verschiedene aktivierende Moleküle aktiviert werden. Bei der Aktivierung werden C3-Konvertasen gebildet, die wiederum C3 spalten, wodurch anschließend C5 gespalten werden kann. Die Spaltung von C5 zu C5b initiiert die Bildung des MAC-Komplexes (auch „terminaler Komplementkomplex“ [TCC] oder C5b-9 genannt).

### 3. DAS PRINZIP DES WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY

Beim Assays WIESLAB® Complement system Classical pathway werden die Prinzipien des hämolytischen Tests zur Komplementaktivierung mit der Verwendung markierter Antikörper kombiniert, die spezifisch für Neoantigene sind, die wiederum als Ergebnis der Komplementaktivierung entstehen. Die Menge des erzeugten Neoantigens ist proportional zur funktionellen Aktivität des klassischen Wegs.

Im Complement system Classical pathway kit sind die Kavitäten der Mikrotiterstreifen mit einem spezifischen Aktivator des klassischen Wegs beschichtet. Die Platte sorgt in Kombination mit der Zusammensetzung des Probenverdünnungspuffers und dem Verdünnungsgrad des Patientenserums dafür, dass nur der klassische Weg aktiviert wird. Während der Inkubation des verdünnten Patientenserums in den Kavitäten wird das Komplement durch die spezifische Beschichtung aktiviert.

Anschließend werden die Kavitäten gewaschen und die Menge des auf der Plattenoberfläche gebildeten C5b-9-Komplexes wird mit einem spezifischen, mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörper gegen das C5b-9-Neoantigen nachgewiesen, das während der Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) gebildet wird.

Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt der Nachweis spezifischer Antikörper durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase-Substratlösung. Das Ausmaß der Komplementaktivierung korreliert mit der Farbintensität und wird anhand der Absorption (optische Dichte [OD]) gemessen.

#### Metrologische Rückführbarkeit

Der der Positivkontrolle zugewiesene Wert wird als 100 % einer normalen Komplementwegaktivität definiert und ist nicht auf SI-Einheiten rückführbar. Die Zuweisung erfolgt unter Verwendung gepoolter humaner Normalseren, die mit dem beschriebenen ELISA-Testverfahren mit einem internen Referenzsystem als höchste Kalibrierungshierarchieebene bewertet wurden.

### 4. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- ZUR *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK.
- Die zur Herstellung der Kontrollen im Kit verwendeten Humanserumkomponenten wurden mit von der FDA zugelassenen Methoden auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das humane Immundefizienz-Virus 1 und 2 (HIV 1 und 2), Hepatitis C (HCV) sowie Hepatitis-B-Oberflächenantigen getestet und für negativ befunden. Da keine Testmethoden eine vollständige Sicherheit dafür bieten können, dass HIV, HCV, Hepatitis-B-Virus oder andere Infektionserreger nicht vorhanden sind, sollten Proben und Reagenzien auf Humanbasis so gehandhabt werden, als ob sie Infektionserreger übertragen könnten.
- Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health empfehlen, mit potenziell infektiösen Erregern gemäß Biosicherheitsstufe 2 umzugehen.
- Alle Lösungen enthalten ProClin 300 als Konservierungsmittel. Pipettieren Sie niemals über den Mund und achten Sie darauf, dass Reagenzien oder Patientenproben nicht mit der Haut in Berührung kommen. Reagenzien, die ProClin enthalten, können reizend sein. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Bei Kontakt mit viel Wasser spülen.
- Sicherheitsdatenblätter für alle in diesem Kit enthaltenen gefährlichen Komponenten sind auf Anfrage bei Svar Life Science erhältlich.
- Verwenden Sie keine Komponenten nach dem Verfallsdatum.
- Die Reagenzien eines Kits sind kitspezifisch und sollten nicht zwischen Kit-Chargen gemischt werden.

- Entsorgen Sie alle verwendeten Komponenten, verwendeten/übrig gebliebenen Proben und übrig gebliebenen Kontrollen als biologisch gefährlichen Abfall entsprechend den örtlichen Bestimmungen. Entsorgen Sie andere übrig gebliebene Komponenten als gefährlichen Abfall entsprechend den örtlichen Bestimmungen.
- Jedes schwerwiegende Vorkommnis im Zusammenhang mit diesem Gerät muss Svar Life Science AB und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates oder des Landes gemeldet werden, in dem der Anwender/Patient ansässig ist.

Waschlösung (30-fach 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 Das Einatmen von Aerosolen vermeiden.  
 P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.  
 P280 Schutzhandschuhe tragen.  
 P333 + P313 Bei Hautreizungen oder Ausschlag: ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Verdünnungspuffer CP, Konjugatlösung, 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.

## 5. INHALT DES KITS

- 1 versiegelte Mikrotiterplatte mit teilbaren Kavitäten (12 x 8), beschichtet mit humanem IgM.
- 2 Fläschchen (35 mL) Verdünnungsmittel CP (Dil CP), blau beschriftet.
- 1 Fläschchen (0,2 ml) Negativkontrolle (NC) mit Humanserum (zu verdünnen wie für eine Patientenserumprobe).
- 1 Fläschchen (0,2 ml) Positivkontrolle (PC) mit lyophilisiertem Humanserum, siehe Abschnitt 9.3 „Rekonstitution der Positivkontrolle“ weiter unten.
- 1 Fläschchen (für Volumen siehe CoA) Aktivitätskontrolle (AC) für die semiquantitative Anwendung, enthält lyophilisiertes Humanserum (andere Herkunft als PC), siehe Abschnitt 9.3.1 „Rekonstitution der Aktivitätskontrolle“ unter den Verfahren für die semiquantitative Anwendung.
- 1 Fläschchen (13 ml) Konjugat mit mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörpern gegen C5b-9 (blaue Farbe).
- 1 Fläschchen (13 ml) Substratlösung pNPP, gebrauchsfertig.
- 1 Fläschchen (30 ml) Waschlösung, 30-fach konzentriert.

**Bitte beachten Sie:** Das Rekonstitutionsvolumen für die AC ist im Analysezertifikat (CoA) („XXX µl“) und auf dem AC-Etikett angegeben.

## 6. ERFORDERLICHE, ABER NICHT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN ODER AUSRÜSTUNG

- Mikroplatten-Lesegerät mit 405-nm-Filter.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen.
- Waschgerät für Streifen, saugfähiges Papier, Röhrchen und eine Zeitschaltuhr.
- Inkubator, der eine Temperatur von 37 °C konstant halten kann. Bei Verwendung eines CO<sub>2</sub>-Schanks ist darauf zu achten, dass die CO<sub>2</sub>-Versorgung unterbrochen/abgeschaltet ist.

## 7. HANDHABUNG UND LAGERUNG

- Die Reagenzien sollten mit Ausnahme der Positiv- und Aktivitätskontrolle bei 2–8°C gelagert werden.
- Alle Reagenzien im Kit sind gebrauchsfertig, mit Ausnahme der Waschlösung und der Kontrollen.
- Die Positiv- und Aktivitätskontrolle sollte bis zur Rekonstitution bei -20°C gelagert werden.
- Die rekonstituierte Positiv- und Aktivitätskontrolle sollte bei <-70°C gelagert werden und kann einmal aufgetaut werden.

## 8. PROBEVORBEREITUNG

Dieser Test wird an Serumproben durchgeführt. Die Blutproben müssen mittels aseptischer Venenpunktionstechnik entnommen und das Serum nach Standardverfahren gewonnen werden. Es wird empfohlen, mindestens 5 ml Vollblut zu entnehmen. Lassen Sie das Blut in Serumröhrchen 60–65 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C) gerinnen. Zentrifugieren Sie die Blutproben und überführen Sie das zellfreie Serum in ein sauberes Röhrchen.

Um eine *in vitro*-Komplementaktivierung zu verhindern, müssen Seren ordnungsgemäß gehandhabt werden. Zur längeren Lagerung oder zum Transport auf Trockeneis sollten Seren bei -70°C oder darunter in dicht verschlossenen Röhrchen eingefroren werden. Proben sollten nicht mehr als einmal eingefroren und aufgetaut werden.

Verwenden Sie keine ikterischen, lipämischen und hämolysierten Seren. Hitzeinaktivierte Seren können nicht verwendet werden. Plasma kann nicht verwendet werden. Das Clinical and Laboratory Standards Institute gibt Empfehlungen für die Lagerung von Blutproben (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. VORBEREITUNG UND HANDHABUNG DER REAGENZIEN

### 9.1. Vorbereitung der Waschlösung

Falls in dem Fläschchen mit der konzentrierten Waschlösung Salzkristalle beobachtet werden, stellen Sie das Fläschchen in ein 37°C warmes Wasserbad, bis sich die Kristalle aufgelöst haben, bevor Sie die Waschlösung verdünnen.

Verdünnen Sie 30 ml der 30-fach konzentrierten Waschlösung in 870 ml destilliertem Wasser. Bei Lagerung bei 2–8°C ist die verdünnte Waschlösung bis zum Verfallsdatum des Kits stabil.

### 9.2. Negativkontrolle (NC)

Die NC sollte wie eine Patientenserumprobe verdünnt werden.

### 9.3. Rekonstitution der Positivkontrolle (PC)

Rekonstruieren Sie die PC gemäß dem folgenden Verfahren:

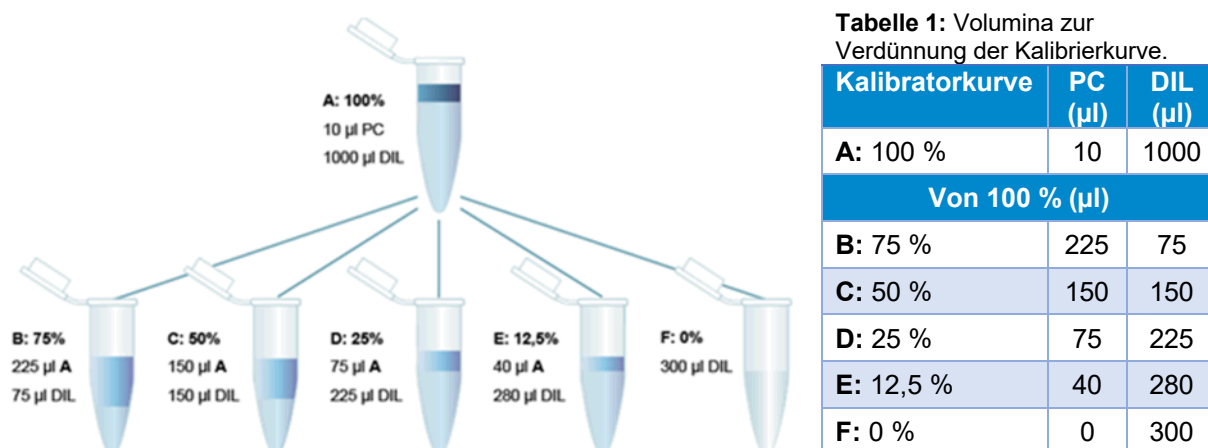
1. Klopfen Sie das gesamte lyophilisierte Material vorsichtig auf den Boden des Fläschchens und entfernen Sie die Schutzkappe.
2. Geben Sie sofort 200 µl destilliertes Wasser direkt zum lyophilisierten Material hinzu.
3. Setzen Sie die Schutzkappe wieder auf.
4. Lassen Sie das Fläschchen 5 Minuten lang auf Eis stehen und schütteln oder verrühren Sie es dann gelegentlich vorsichtig, bis sich das Material vollständig aufgelöst hat.
5. Informationen zur weiteren Verdünnung finden Sie im Abschnitt 9.3.1 bzw. 9.3.2 für das semiquantitative und qualitative Protokoll.

Die rekonstituierte PC kann bis zu 4 Stunden vor der Verwendung bei 2–8°C oder auf Eis aufbewahrt werden. Sie kann bei <-70°C eingefroren und einmal aufgetaut werden.

#### 9.3.1. Semiquantitatives Protokoll

##### Erstellung der Kalibrierkurve

Zur Verdünnung der rekonstituierten PC zu Kalibratoren siehe Abbildung 2 und Tabelle 1. Der Kalibrator kann vor der Verwendung bis zu 1 Stunde bei Raumtemperatur gelagert werden. Der Kalibrator muss frisch erstellt werden und kann nicht zur späteren Verwendung aufbewahrt werden.



**Abbildung 2:** Verdünnungsschema für die Kalibratorkurve. Die rekonstituierte Positivkontrolle (PC) wird gemäß der Tabelle mit dem Kit-Verdünnungsmittel (DIL) vermischt.

##### Rekonstitution der Aktivitätskontrolle (AC)

1. Klopfen Sie das gesamte lyophilisierte Material vorsichtig auf den Boden des Fläschchens und entfernen Sie die Schutzkappe.
2. Geben Sie sofort die auf dem CoA/AC-Etikett angegebene Menge destillierten Wassers direkt zum lyophilisierten Material hinzu.
3. Setzen Sie die Schutzkappe wieder auf.
4. Lassen Sie das Fläschchen 5 Minuten lang auf Eis stehen und schütteln oder verrühren Sie es dann vorsichtig, bis sich das Material vollständig aufgelöst hat.
5. Verdünnen Sie die rekonstituierte Kontrolle auf die gleiche Weise wie ein Patientenserumprobe.

Die rekonstituierte Aktivitätskontrolle kann bis zu 4 Stunden vor der Verwendung bei 2–8°C oder auf Eis aufbewahrt werden. Sie kann bei <-70 °C eingefroren und einmal aufgetaut werden.

### 9.3.2. Qualitatives Protokoll

Verdünnen Sie die rekonstituierte Positivkontrolle gemäß den Anweisungen in Abschnitt 9.4: Verdünnung der Proben.

### 9.4. Handhabung des Serums

Tauen Sie gefrorene Seren teilweise auf, indem Sie sie unter vorsichtigem Rühren kurz in ein 37 °C warmes Wasserbad legen. Stellen Sie die Röhrchen nach dem teilweisen Auftauen sofort in ein Eisbad und lassen Sie sie auf Eis, bis sie vollständig aufgetaut sind. Mit einem Vortex-Mixer kurz verrühren.

### Verdünnung der Proben

Verdünnen Sie das Serum 1/101 mit Verdünnungsmittel CP, blaues Etikett, (500 µL Verdünnungsmittel + 5 µL Serum) und mischen Sie es gründlich, aber vorsichtig auf einem vortex. Das verdünnte Serum kann vor der Analyse maximal 60 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

## 10. TESTVERFAHREN

### 10.1. Spülprotokoll

Die Kavitäten leeren und dreimal mit 300 µl Waschlösung waschen, wobei die Kavitäten jedes Mal gefüllt und geleert werden. Leeren Sie nach dem letzten Waschen die Kavitäten, indem Sie den Streifen auf einem saugfähigen Papiertuch ausklopfen.

### 10.2. Plattenanordnung

#### 10.2.1. Semiquantitatives Protokoll

Pipettieren Sie 100 µL/Kavität in zweifacher Ausführung des Kalibrators (100 %-0 %), der NC, der AC und der verdünnten Serumproben (P) gemäß Tabelle 2. Der 0-%-Kalibrator sollte als Leerprobe verwendet werden.

**Tabelle 2:** Empfohlene Plattenanordnung, semiquantitatives Protokoll.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100 %	12,5 %	P1									
<b>B</b>	100 %	12,5 %	P1									
<b>C</b>	75 %	0 %	P2									
<b>D</b>	75 %	0 %	P2									
<b>E</b>	50 %	NC	etc									
<b>F</b>	50 %	NC										
<b>G</b>	25 %	AC										
<b>H</b>	25 %	AC										

## 10.2.2. Qualitatives Protokoll

Pipettieren Sie 100 µL/Kavität in zweifacher Ausführung des Verdünnungsmittels als Leerprobe, PC, NC und verdünnte Serumproben (P) gemäß Tabelle 3.

**Tabelle 3:** Empfohlene Plattenanordnung, qualitatives Protokoll.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Dil CP	P2										
<b>B</b>	Dil CP	P2										
<b>C</b>	PC	etc										
<b>D</b>	PC											
<b>E</b>	NC											
<b>F</b>	NC											
<b>G</b>	P1											
<b>H</b>	P1											

## 10.3. Testprotokoll

Entfernen Sie nur die Anzahl der für die Tests benötigten Kavitäten und verschließen Sie die Aluminiumverpackung wieder sorgfältig. Warten Sie vor der Analyse, bis alle Lösungen die Raumtemperatur (20–25 °C) angenommen haben.

### 1. Inkubation der Proben

Füllen Sie die Platte gemäß Abschnitt 10.2. Abgedeckt für 60–70 Minuten bei +37°C inkubieren. Bitte beachten Sie, dass keine Inkubation unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre durchgeführt werden sollte. Bei Verwendung eines CO<sub>2</sub>-Schranks ist darauf zu achten, dass die CO<sub>2</sub>-Versorgung unterbrochen/abgeschaltet ist.

### 2. Waschen

Waschen Sie die Platte gemäß Abschnitt 10.1: Spülprotokoll.

### 3. Konjugatinkubation

Geben Sie 100 µl Konjugat in jede Kavität. Inkubieren Sie es für 30 Minuten bei Raumtemperatur (+20–25°C).

### 4. Waschen

Waschen Sie wie zuvor angegeben dreimal.

### 5. Substratinkubation

Geben Sie 100 µl Substratlösung in jede Kavität und inkubieren Sie sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur (+20–25°C).

### 6. Ablesen der Platte

Lesen Sie die Absorption (OD) bei 405 nm auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät ab.

Optional: Als Stopplösung können 5 mM EDTA, 100 µl/Kavität, verwendet werden. Lesen Sie die Absorption der Kavitäten innerhalb von 60 Minuten ab.

## 11. QUALITÄTSKONTROLLE

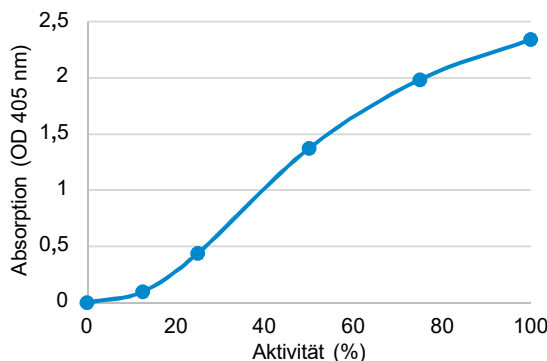
Das im Kit enthaltene Analysezertifikat (CoA) ist chargenspezifisch und dient zur Überprüfung der von unserem Labor ermittelten Ergebnisse. Die auf dem CoA angegebenen Ergebnisse dienen nur als Richtlinie. Die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse können abweichen.

Die OD der PC sollte >1,0 und die OD der NC <0,2 nach Abzug der Leerprobe (Dil CP, 0%) betragen. Wenn eine der Kontrollen nicht innerhalb ihres jeweiligen Bereichs liegt, sollte der Test als ungültig betrachtet und wiederholt werden.

## 12. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

### 12.1. Semiquantitatives Protokoll

Subtrahieren Sie die Absorption des 0%-Kalibrators von allen OD-Werten. Es wird eine 4-Parameter-Logistik-Kurvenanpassung (Marquardt) empfohlen. Ein Beispiel für eine Standardkurve finden Sie in Abbildung 3.



**Abbildung 3:** Beispiel einer Standardkurve. Die obige Abbildung zeigt ein Beispiel einer semiquantitativen Standardkurve und sollte nicht zur tatsächlichen Interpretation von Patientenproben verwendet werden.

In Fällen, in denen die ermittelten Probenwerte höher sind als die höchsten 100 % des Kalibrators, können die Proben 1/201 verdünnt und erneut getestet werden. Bitte beachten Sie, dass der ermittelte Aktivitätswert in diesem Fall entsprechend der angewandten Probenverdünnung angepasst werden sollte.

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzwert und Cut-off-Wert für Mängel festlegt.

### 12.2. Qualitatives Protokoll

Es wird empfohlen, zur Berechnung der Komplementaktivität (% der PC) die OD-Ergebnisse zu verwenden, um die Interpretation zu erleichtern. Diese Berechnung erleichtert auch den Vergleich zwischen verschiedenen Analysen, da die OD von Durchlauf zu Durchlauf anfälliger für Veränderungen wird. Die Methode zur Berechnung der Komplementaktivität wird im Folgenden beschrieben.

1. Subtrahieren Sie die Absorption der Leerprobe (Verdünnungsmittel) von den Absorptionen der NC, PC und der Proben.
2. Berechnen Sie die mittleren OD-Werte für die NC, PC und die Proben.
3. Berechnen Sie die Komplementaktivität mithilfe der folgenden Formel:

$$\text{Komplementaktivität (\% der PC)} = \frac{\text{Probe} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

Die NC und die PC sind zur Überwachung erheblicher Reagenzfehler vorgesehen. Die PC gewährleistet keine Präzision beim Test-Cut-off. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzwert und Cut-off-Wert für Mängel festlegt.

Ein negatives Ergebnis, d. h. ein Mangel, sollte immer durch Testen einer neuen Probe verifiziert werden, um sicherzustellen, dass vor der Durchführung des Tests keine unbeabsichtigte *in vitro*-Komplementaktivierung stattgefunden hat.

## 13. BEWERTUNGSKRITERIEN

### 13.1. Erwartete Ergebnisse

Wenn verminderte Komplementkomponenten- oder Komplementfunktionswerte festgestellt werden, liegt nach Ansicht von Ärzten ein Mangel oder ein andauernder immunologischer Prozess vor, der zu einem verstärkten Abbau von Komponenten und einer Senkung der Komplementwerte führt. Erhöhte Komplementwerte sind in der Regel ein unspezifischer Ausdruck einer Akutphasenreaktion.

Der WIESLAB® Complement system Classical pathway kann bei der Erkennung von Komplementmängeln im Zusammenhang mit dem klassischen Weg hilfreich sein. Eine umfassendere und detailliertere Funktionsbewertung aller drei Komplementwege kann mit dem WIESLAB® Complement system Screen kit durchgeführt werden, wie in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4:** Kombination der Ergebnisse in den verschiedenen Wegen und mögliche Mängel.

Klassischer Weg	MBL-Weg	Alternativer Weg	Möglicher Mangel
Positiv	Positiv	Positiv	Keiner
Negativ	Positiv	Positiv	C1q, C1r, C1s
Positiv	Positiv	Negativ	Faktor B, D und P
Positiv	Negativ	Positiv	MBL, MASP-2
Negativ	Negativ	Negativ	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativ	Negativ	Positiv	C4, C2 oder Kombination

### 13.2. Einschränkungen

Der Komplementwert eines einzelnen Patienten kann nicht als Maß für den Schweregrad der Erkrankung herangezogen werden, da er von Patient zu Patient variieren kann. Daher ist es schwierig, eine absolute Standardisierung der Ergebnisse zu erreichen.

Der Test sollte nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen über die klinische Therapie herangezogen werden, sondern sollte in Kombination mit klinischen Symptomen und den Ergebnissen anderer verfügbarer Tests verwendet werden. Eine Therapie sollte nicht auf der Grundlage des Ergebnisses des Komplementtests begonnen werden. Die Einleitung oder Änderung einer Behandlung sollte nicht allein auf der Grundlage von Änderungen der Komplementwerte, sondern vielmehr auf Grundlage einer sorgfältigen klinischen Beobachtung erfolgen.

## 14. LEISTUNGSMERKMALE

### 14.1. Klinische Leistung

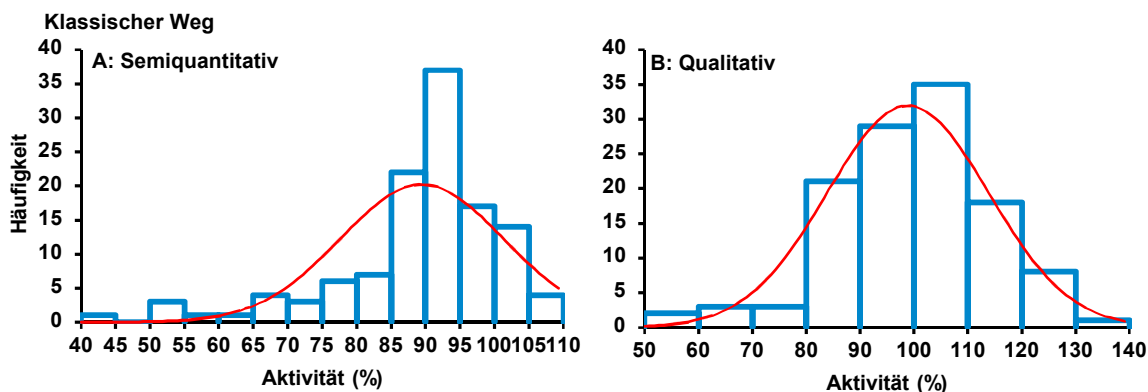
Die Normalverteilung innerhalb von 2SD (standard deviation [Standardabweichung]) ist in Abbildung 4 und Tabelle 5 angegeben. Ergebnisse innerhalb dieses Bereichs weisen auf eine normale Funktionalität des klassischen Wegs hin. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich für die Population, für die es zuständig ist, bestätigt oder festlegt.

Ein Wert unterhalb der Referenzbereiche deutet entweder auf eine erhöhte Aktivierung hin, die zu einem Verbrauch der klassischen Komplementkapazität führt, oder auf eine genetisch bedingte niedrige Aktivität.

Werte unter 5 % deuten stark auf einen vollständigen Mangel hin, der entweder durch eine übermäßige Aktivierung oder einen angeborenen Mangel im jeweiligen Weg verursacht wird. Um festzustellen, welche(r) Komplementfaktor(en) die Ursache für die verminderte Aktivität ist bzw. sind, ist eine weitere Analyse der Komplementproteine erforderlich.

Ein negatives Ergebnis, d. h. ein vermuteter Mangel, sollte immer durch Testen einer neuen, sorgfältig behandelten Probe verifiziert werden, um sicherzustellen, dass keine *in vitro*-Komplementaktivierung stattgefunden hat.

Seren von 120 scheinbar gesunden Blutspendern wurden in der WIESLAB® Complement system Classical pathway qualitativen Anwendung getestet. Bei der semiquantitativen Anwendung basiert der Normalbereich auf einer mathematischen theoretischen Berechnung. Die Komplementaktivität der 120 scheinbar gesunden Blutspender ist in Abbildung 4 und Tabelle 5 zusammengefasst. In der Studie lag kein Blutspender unter 40 %.



**Abbildung 4:** Histogramm der Referenzpopulation, die im klassischen Weg bzw. im semiquantitativen (A) und qualitativen (B) Protokoll analysiert wurde.

**Tabelle 5:** Werte für die 120 Blutspender, die jeweils mit einem semiquantitativen und qualitativen Protokoll analysiert wurden.

Protokoll	n	Mittel (%)	±2SD (%)	Median (%)
Semiquantitativ	120	89	66–113*	92
Qualitativ	120	99	69–129*	100

\*) Hierbei handelt es sich um eine statistische Berechnung, die keinen echten Cut-off garantiert. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzwert und Cut-off-Wert für vermutete Mängel festlegt.

Im Test wurden Seren mit bekannten Komplementmängeln und Seren mit spezifisch depletierten Komplementfaktoren getestet (Tabellen 6 und 7). Alle mangelhaften/depletierten Seren waren im Test niedrig und ergaben Werte unter 15 % bzw. 5 %\*\*) im semiquantitativen bzw. qualitativen Protokoll.

\*\*) 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 erweiterte Tests von mangelhaften Patientenproben, die mit einer qualitativen Anwendung getestet wurden.

**Tabelle 6:** Proben mit bekannten Mängeln.

Mangel	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Anzahl der Patienten	5	1	1	1	2	2
Anzahl der mangelhaften Seren	5	1	1	1	2	2

**Tabelle 7:** Proben mit depletierten Komponenten.

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

## 14.2. Präzision

### 14.2.1. Präzision zwischen den Tests

#### Semiquantitatives Protokoll

**Tabelle 8:** Die Präzision zwischen den Tests für die semiquantitative Anwendung wurde durch das Testen von sieben Proben in acht Replikaten zu drei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Mittelwert %</b>	71	73	69	72	25	35	31
<b>SD</b>	9	9	6	11	1	2	2
<b>CV %</b>	13 %	13 %	9 %	15 %	4 %	5 %	5 %

#### Qualitatives Protokoll

**Tabelle 9:** Die Präzision zwischen den Tests für die qualitative Anwendung wurde durch das Testen von drei Proben in doppelter Ausführung ermittelt. Es wurden Ergebnisse für sechs verschiedene Durchläufe ermittelt.

	1	2	3
<b>Mittelwert %</b>	98	92	21
<b>SD</b>	4,3	3,9	1,7
<b>CV %</b>	4	4	8

### 14.2.2. Präzision innerhalb eines Tests

#### Semiquantitatives Protokoll

**Tabelle 10:** Die Präzision innerhalb eines Tests für die semiquantitative Anwendung wurde durch das Testen von sieben verschiedenen Proben in acht Replikaten zu einem bestimmten Zeitpunkt ermittelt.

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

#### Qualitatives Protokoll

**Tabelle 11:** Die Präzision innerhalb eines Tests für die qualitative Anwendung wurde durch das Testen einer Probe in 40 Kavitäten ermittelt.

Test	Mittelwert %	SD	CV %
<b>CP</b>	85	2,9	3

### 14.2.3. Variation von Charge zu Charge

#### Semiquantitatives Protokoll

**Tabelle 12:** Die Abweichung von Charge zu Charge bei der semiquantitativen Anwendung wurde durch das Testen von sieben Proben in zweifacher Ausführung aus drei verschiedenen Chargen durch drei verschiedene Personen ermittelt.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Mittelwert %</b>	8	73	85	24	37	74	78
<b>SD</b>	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
<b>CV %</b>	10 %	20 %	15 %	5 %	5 %	10 %	8 %

### 14.3. Linearität

#### Semiquantitatives Protokoll

**Tabelle 13:** Die Verdünnungswiederfindung wurde durch Testen von fünf seriellen Verdünnungen für drei verschiedene Proben ermittelt.

Probe	Verdünnung	Durchschnittliche gemessene Aktivität (%)	Theoretische Aktivität (%)	Nach Verdünnung korrigierte Wiederfindung in %
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
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

### 14.4. Nachweisgrenze

#### Semiquantitatives Protokoll

**Messbereich des Kalibrators:** 12,5 %–100 %

**Nachweisgrenze (LoD) = 8 %**

## 15. FEHLERBEHEBUNG









PROBLEM	MÖGLICHE URSACHEN	LÖSUNG
<b>Kontrollwerte außerhalb des zulässigen Bereichs.</b>	Falsche Temperatur, Zeit oder falsches Pipettieren, Reagenzien werden nicht gemischt.	Überprüfen, ob Zeit und Temperatur korrekt waren. Test wiederholen.
	Kreuzkontamination von Kontrollen.	Vorsichtig pipettieren.
	Optischer Pfad nicht sauber.	Die Kavitäten auf Schmutz oder Luftblasen überprüfen. Plattenboden abwischen und erneut ablesen.
	Kontrollen (Positiv- und/oder Aktivitätskontrollen) werden nicht korrekt rekonstituiert. Unsachgemäße Verdünnung des Kalibrators.	Positivkontrollen überprüfen und eine neue auflösen. Vorbereitung überprüfen und eine neue Verdünnung herstellen.
<b>Alle Testergebnisse negativ.</b>	Ein oder mehrere Reagenzien wurden nicht oder in der falschen Reihenfolge hinzugefügt.	Vorgehensweise erneut prüfen. Auf nicht verwendete Reagenzien prüfen. Test wiederholen.
	Antigenbeschichtete Platte ist inaktiv.	Ungenutzte Kavitäten auf augenscheinliche Feuchtigkeit überprüfen. Plattenboden abwischen und erneut ablesen.
	Serum inaktiv.	Neue Proben verdünnen.
<b>Alle Probenkavitäten sind sichtbar gelb.</b>	Kontaminierte Puffer oder Reagenzien.	Alle Lösungen auf Trübung überprüfen.
	Waschlösung verunreinigt.	Sauberen Behälter verwenden. Qualität des zur Herstellung der Lösung verwendeten Wassers überprüfen.
	Unsachgemäße Verdünnung des Serums.	Test wiederholen.
<b>Geringe Präzision.</b>	Pipettenabgabe, CV >5 % oder Proben nicht gemischt.	Kalibrierung der Pipette überprüfen. Eine reproduzierbare Technik verwenden. Luftblasen in der Pipettenspitze vermeiden.
	Serum oder Reagenzien nicht ausreichend vermischt oder nicht auf Raumtemperatur gebracht.	Alle Reagenzien vorsichtig aber gründlich mischen und auf Raumtemperatur bringen.
	Reagenzienzugabe dauert zu lange, die Zeitintervalle sind inkonsistent.	Eine konsistente, einheitliche Technik entwickeln und ein Gerät mit mehreren Spitzen oder einem automatischen Spender verwenden, um die Zeit zu verkürzen.
	Optischer Pfad nicht sauber.	Die Kavitäten auf Luftblasen überprüfen. Plattenboden abwischen und erneut ablesen.
	Waschen nicht konsistent, es finden sich Luftblasen oder Waschlösung in den Kavitäten.	Überprüfen, ob alle Kavitäten gleichmäßig gefüllt und abgesaugt wurden. Flüssigkeit über dem Reagenzienstand in der Kavität abgeben. Leeren Sie nach dem letzten Waschen die Kavitäten, indem Sie den Streifen auf einem saugfähigen Papiertuch ausklopfen.




## 16. LITERATURVERWEISE

- 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. J Immunol Methods. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. BESCHREIBUNG DER SYMBOLE

Die folgenden Symbole können auf der Verpackung und dem Etikett zu finden sein:

	Chargencode.
	Katalognummer.
	Verfallsdatum.
	Temperaturgrenze.
	Biologisches Risiko.
	Gebrauchsanweisung beachten.
	Zur In-vitro-Diagnostik.
	Hersteller.

	Ausreichend für 96 Tests.
	Konformität mit der Richtlinie 98/79/EG über in-vitro-Diagnostika.
	Gesundheitsrisiko.

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Ag</div>	Antigen (beschichtete Platte).
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DIL</div>	Verdünnungsmittel.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BUF</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">WASH</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">30X</div>	Waschpuffer, 30-fach konzentriert.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">+</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">LYO</div>	Positivkontrolle.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">AC</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">LYO</div>	Lyophilisierte Aktivitätskontrolle.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">-</div>	Negativkontrolle.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONJ</div>	Konjugat.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">SUBS</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">pNPP</div>	Substrat pNPP.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CH</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">REP</div>	Vertreter in der Schweiz.

## 18. DOKUMENTENHISTORIE

Version	Änderungen
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Wesentliche redaktionelle Änderungen mit neuem Dokumentlayout. Die Verfahren zur semiquantitativen und qualitativen Anwendung wurden zusammengeführt und ggf. eigene Unterüberschriften eingeführt.</p> <p>Information „Die Analyse sollte von geschulten Laborfachleuten durchgeführt werden“ hinzugefügt.</p> <p>Informationen zur metrologischen Rückführbarkeit hinzugefügt.</p> <p>Die Spezifikation für die Positivkontrolle zur Verdeutlichung von „&gt;1“ auf „&gt;1,0“ geändert.</p> <p>Informationen zum CO<sub>2</sub>-Schrank hinzugefügt.</p>
LABEL-DOC-0031 v 7.0	<p>Erhöhte Transparenz in Abschnitt 14.1, dass die semiquantitativen Daten auf mathematischen theoretischen Berechnungen beruhen.</p> <p>Die Werte in Tabelle 6 und 10 wurden aktualisiert, um der in Version 5.0 veröffentlichten Leistungsbewertung zu entsprechen.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)

Használati utasítás  
**WIESLAB<sup>®</sup> Complement system**  
Classical pathway  
Kvalitatív és félkvantitatív teszt

In vitro diagnosztikai használatra

Enzim immunvizsgálat  
a komplementrendszer funkcionális aktivitásának értékelésére

- Letörhető mikrotitráló csíkok (12x8), 96 mélyedéssel.
- A kitet +2–8 °C-on tárolja.
- A pozitív kontrollt és az aktivitás kontrollt -20 °C-on tárolja.



Dokumentumszám: LABEL-DOC-0031 7.0

Hatálybalépés dátuma: 22-Jan-2026

## 1. RENDELTETÉSSZERŰ HASZNÁLAT

A WIESLAB® Complement system Classical pathway (CP) készlet egy enzim immunvizsgálat a funkcionális klasszikus komplementútvonalon minőségi és/vagy szemikvantitatív meghatározására humán szérumban. Az elemzést képzett laboratóriumi szakembereknek kell elvégezniük.

IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA.

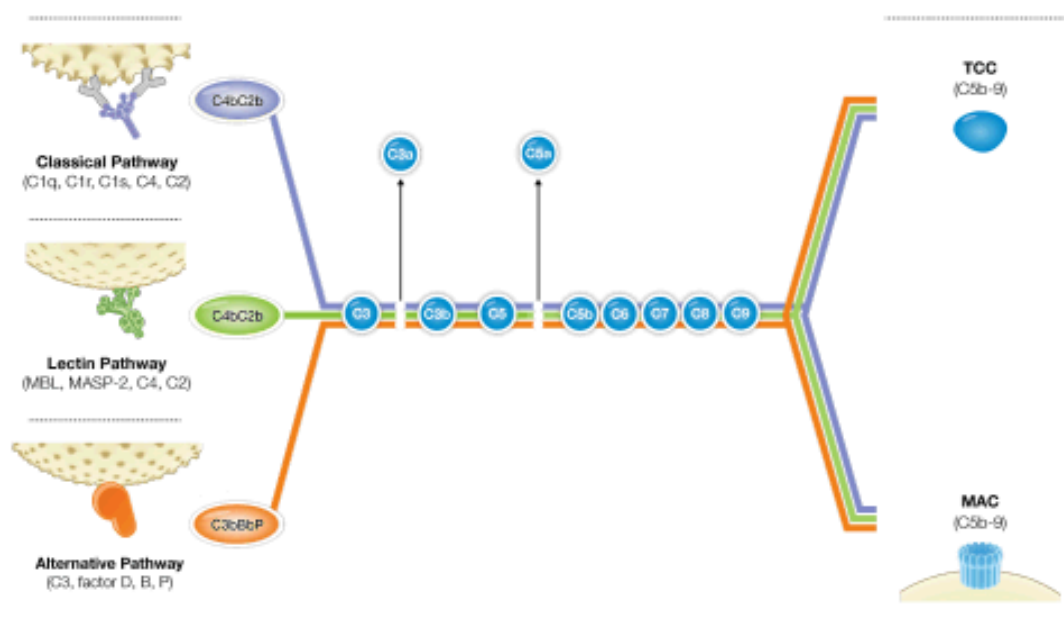
## 2. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS MAGYARÁZAT

A komplementrendszer alapvető szerepet játszik a krónikus, autoimmun és fertőző betegségekben. A komplementaktiválás három úton mehet végbe (1. ábra), nevezetesen a klasszikus, az MBL (lektin) és az alternatív útvonalon keresztül.

A nem megfelelő komplementaktivitás emberek esetén ismétlődő fulmináns vagy súlyos fertőzésekre való hajlamot eredményez, és hozzájárulhat az autoimmun betegségek kialakulásához. A komplementrendszer nem megfelelő aktiválódása hozzájárul a krónikus gyulladáshoz és szövetkárosodáshoz.

A komplementkaskád *in vitro* aktiválódása a komplement komponensek felhasználásához vezet, és ennek hatására csökken ezek koncentrációja. Így a komplementfehérjék vagy a komplementaktivitás meghatározása révén kimutatható, hogy a komplementrendszert immunológiai és/vagy patogén mechanizmus aktiválta-e. Ha komplementrendszer aktiváló betegség gyanúja merül fel, vagy fennáll az örökletes hiánybetegség lehetősége, a betegek kivizsgálására funkcionális és immunkémiai komplementmérést is alkalmaznak.

A komplementaktivitás funkcionális vizsgálatokkal, mint például a WIESLAB komplementrendszer készletek tesztel kapott szintje figyelembe veszi a komponensek szintézisének, lebomlásának és fogyásának sebességét, és megmutatja az útvonalak integritását, szemben az immunkémiai módszerekkel, amelyek specifikusan a különféle komplementkomponensek koncentrációját mérik.



**1. ábra:** A komplementrendszer sematikus ábrája. A komplementrendszer a klasszikus, az MBL (lektin), vagy más aktiváló molekulákon keresztül az alternatív útvonalon keresztül aktiválódhat. Az aktiválódás során C3 konvertázok termelődnek, melyek elhasítják a C3-at, és ezt követően lehetővé válik a C5 hasítása. A C5 hasításával C5b keletkezik, amelyik kiváltja a MAC komplex (más néven terminális komplement komplex (TCC) vagy C5b-9) formációját.

### 3. A WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY MŰKÖDÉSI ELVE

A WIESLAB® Complement system Classical pathway vizsgálata ötvözi a komplementaktivációt mérő hemolitikus teszt alapelvét a komplementaktiválódás eredményeképp termelt neoantigénre specifikus jelölt antitestek használatával. A keletkezett neoantigén mennyisége arányos a klasszikus útvonal funkcionális aktivitásával.

A Complement system Classical pathway kitben a mikrotiter csíkok mélyedései a klasszikus útvonal specifikus aktivátorával vannak bevonva. A lemez a mintahígító puffer összetételével és a betegtől nyert szérum hígítási szintjével együttesen biztosítja, hogy kizárólag a klasszikus útvonal aktiválódjon. A betegtől származó hígított szérum a mélyedésekben történő inkubációja során a specifikus bevonat aktiválja a komplementrendszer.

Ezt követően történik a mélyedések mosása, és a lemez felületén kialakult C5b-9 komplex mennyiségének meghatározása egy specifikus, a Membrane Attack Complex (membránkárosító komplex, MAC) formációja során kialakuló C5b-9 neoantigénre specifikus, alkalikus foszfatázzal jelölt antitest segítségével.

Egy további mosási lépés után a specifikus antigéneket az alkalikus foszfatáz szubsztrátjának oldatával történő inkubáció révén határozzák meg. A komplementaktiválódás mértéke arányos a színintenzitással, és az abszorbancia (optical density [optikai denzitás], OD) formájában mérhető.

#### Metrológiai visszavezethetőség

A komplementútvonal normális, 100%-os aktivitását a pozitív kontrollhoz hozzárendelt értéként határozzák meg, és nem visszavezethető semmilyen SI mértékegységre. Az értéket poolozott humán normál szérumminták alapján állapítják meg, a leírt ELISA vizsgálati eljárás segítségével, mely során a legmagasabb kalibrációs hierarchiai szintet egy belső referenciarendszer adja.

### 4. FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

- *IN VITRO* DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA.
- A kitben található kontrollok elkészítéséhez használt humán szérumkomponenseket az FDA által jóváhagyott módszerekkel tesztelték az 1-es és 2-es humán immundeficiencia vírus (HIV 1 és 2), a hepatitis C (HCV), valamint a hepatitis B felületi antigén elleni antitestek jelenlétére, és negatívnak találták. Mivel egyetlen vizsgálati módszer sem nyújthat teljes biztosítékot arra, hogy HIV, HCV, hepatitis B vírus vagy más fertőző ágensek nincsenek jelen, a mintákat és az emberi alapú reagenseket úgy kell kezelni, mintha képesek lennének fertőző ágensek átvitelére.
- A Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health azt javasolta, hogy a potenciálisan fertőző ágenseket 2-es biológiai biztonság szintjén kezeljék.
- Minden oldat tartalmaz ProClin 300-at tartósítószerként. Soha ne pipettázzon szájon át, és ne engedje, hogy a reagensek vagy a betegminta bőrrel érintkezzen. A ProClin-t tartalmazó reagensek irritatív hatásúak lehetnek. Kerülje a bőrrel és szemmel való érintkezést. Érintkezés esetén öblítse le bő vízzel.
- A kitben található összes veszélyes összetevő biztonsági adatlapja kérésre beszerezhető a Svar Life Science vállalattól.
- Ne használja az összetevőket a lejáratú időn túl.
- A kit reagensei a kitre specifikusak, és nem cserélhetők fel a kitek között.
- Az összes használt összetevőt, a használt/maradék mintákat és a megmaradt kontrollokat biológiailag veszélyes hulladékként semmisítse meg, a helyi előírásoknak megfelelően. A többi megmaradt összetevőt veszélyes hulladékként ártalmatlanítsa a helyi előírásoknak megfelelően.
- Az eszközzel kapcsolatos minden súlyos eseményt jelenteni kell a Svar Life Science AB és azon EU-tagállam vagy ország illetékes hatóságára felé, ahol a felhasználó/beteg tartózkodik.

Mosóoldat (30x konc.)



### FIGYELMEZTETÉS

**Tartalom:** Az alábbiakból álló reakciótömeg: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] és 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Allergiás bőrreakciót válthat ki.  
 H412 Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.  
 P261 Kerülje a permet belélegzését.  
 P273 Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását.  
 P280 Védőkesztyű használata kötelező.  
 P333 + P313 Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni.

CP hígítópuffer, konjugátum oldat, negatív kontroll, pNPP szubsztrát

EUH208 Tartalom: „Az alábbiakból álló reakciótömeg: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] és 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)”.  
 Allergiás reakciót válthat ki.

EUH210 Biztonsági adatlap kérésre elérhető.

## 5. A KIT TARTALMA

- 1 lezárt mikrotitráló lemez letörhető, humán IgM-mel bevont mélyedésekkel (12x8).
- 2 üveg (35 ml) CP oldószer (Dil CP), kék címkével.
- 1 üveg (0,2 ml) negatív kontroll (NC), amely humán szérumot tartalmaz (a beteg szérummintájához hasonlóan hígítandó).
- 1 üveg (0,2 ml) pozitív kontroll (PC), amely liofilizált humán szérumot tartalmaz, lásd alább a 9.3. „A pozitív kontroll feloldása” című pontot.
- 1 üveg (térfogat, lásd a CoA-t) activity control (aktivitáskontroll, AC) félkvantitatív alkalmazáshoz, amely liofilizált humán szérumot tartalmaz (más eredetű, mint az PC), lásd a 9.3.1 „Az aktivitáskontroll feloldása” című részt a félkvantitatív alkalmazásra vonatkozóan.
- 1 üveg (13 ml) konjugátum, amely alkalikus foszfátazzal jelölt C5b-9 antitesteket tartalmaz (kék színű).
- 1 üveg (13 ml) pNPP szubsztrát oldat, használatra kész.
- 1 üveg (30 ml) mosóoldat, 30x koncentrált.

**Kérjük, vegye figyelembe:** Az AC feloldási térfogata (XXX µl) az Certificate of Analysis (elemzési tanúsítvány, CoA) dokumentumban és az AC címkéjén van feltüntetve.

## 6. SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK VAGY BERENDEZÉSEK

- Mikrolemez-olvasó 405 nm-es szűrővel.
- Precíziós pipetták eldobható hegyekkel.
- Mosókészülék a csíkokhoz, nedvszívó kendő, csövek és stopperóra.
- Inkubátor, amely képes 37 °C fenntartására. CO<sub>2</sub>-szekrény használata esetén győződjön meg róla, hogy a CO<sub>2</sub>-ellátás le van választva/ki van kapcsolva.

## 7. KEZELÉS ÉS TÁROLÁS

- A reagenseket, a pozitív kontroll és az aktivitáskontroll kivételével 2–8 °C-on kell tárolni.
- A kitben lévő összes reagens használatra kész, kivéve a mosóoldatot és a kontrollokat.
- A pozitív kontrollt és az aktivitáskontrollt a feloldásig -20 °C-on kell tárolni.
- A feloldott pozitív kontrollt és aktivitáskontrollt -70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten kell tárolni, és egyszerűen olvashatók fel.

## 8. MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

Ezt a vizsgálatot szérummintákon kell elvégezni. A vérmintákat aseptikus vénapunkciós technikával kell levenni, és a szérumot standard eljárásokkal kell kinyerni. Legalább 5 ml teljes vér javasolt. Hagyja a vért alvadni a szérumcsövekben 60–65 percig szobahőmérsékleten (20–25 °C). Centrifugálja a vérmintákat, és vigye át a sejtmentes szérumot egy tiszta csőbe.

A szérummintákat megfelelően kell kezelni a *in vitro* komplementaktiválódás megelőzése érdekében. A szérummintákat -70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten kell lefagyasztani szorosan lezárt csövekben hosszabb tárolás vagy szárazjégen történő szállítás esetén. A mintákat nem szabad egynél többször lefagyasztani és felolvasztani.

Ne használjon ikerikus, lipémiás vagy hemolizált szérumot. Hővel inaktivált szérum nem használható. Plazma nem használható. A Clinical and Laboratory Standards Institute ajánlásokat ad a vérminták tárolására (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE ÉS KEZELÉSE

### 9.1. Mosóoldat elkészítése

Abban az esetben, ha a tömény mosóoldatot tartalmazó üvegben sókristályok észlelhetők, a mosóoldat hígítása előtt helyezze az üveget 37 °C-os vízfürdőbe, amíg a kristályok fel nem oldódnak.

Hígítson fel 30 ml-t a 30-szoros koncentrált mosóoldatból 870 ml desztillált vízzel. 2–8 °C-on tárolva a hígított mosóoldat a kit lejáratí dátumáig stabil.

### 9.2. Negatív kontroll (NC)

A NC-t ugyanúgy kell hígítani, mint a beteg szérummintáját.

### 9.3. A pozitív kontroll (PC) feloldása

A PC-t a következő eljárás szerint oldja fel:

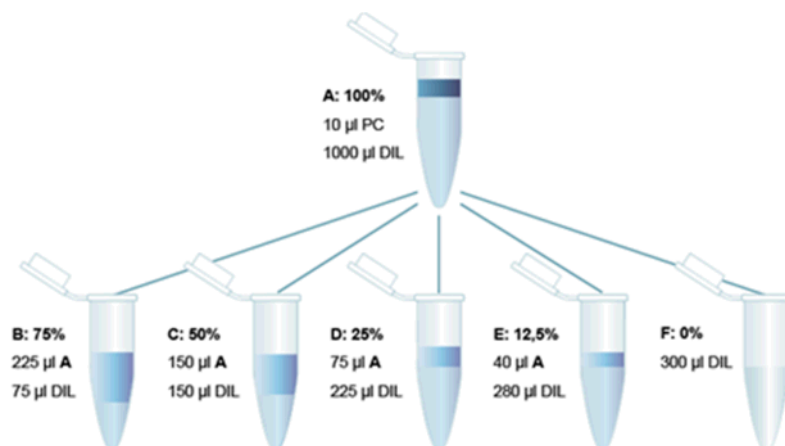
1. Finoman ütögesse le az összes liofilizált anyagot az üveg aljára, és távolítsa el a kupakot.
2. Azonnal adjon hozzá 200 µL desztillált vizet közvetlenül a liofilizált anyaghoz.
3. Helyezze vissza a kupakot.
4. Hagyja állni az üveget 5 percig jégen, majd időnként óvatosan rázza vagy vortexelje, amíg teljesen fel nem oldódik.
5. A további hígításhoz a félkvantitatív protokoll esetén lásd a 9.3.1. szakaszt, a kvalitatív protokoll esetén pedig a 9.3.2. szakaszt.

A feloldott PC felhasználás előtt legfeljebb 4 órán keresztül tárolható, 2-8 °C-on vagy jégen. -70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tárolandó, és egyszer olvasható fel.

### 9.3.1. Félkvantitatív protokoll

#### Kalibrációs görbe elkészítése

A feloldott PC kalibrátorokhoz való hígítását lásd a 2. ábrán és az 1. táblázatban. A kalibrátor használat előtt legfeljebb 1 óráig szobahőmérsékleten hagyható. A kalibrátort frissen kell elkészíteni, és nem tárolható későbbi felhasználásra.



**1. táblázat:** A kalibrációs görbe hígításához szükséges térfogatok.

Kalibrációs görbe	PC (µl)	DIL (µl)
A: 100%	10	1000
100%-tól (µl)		
B: 75%	225	75
C: 50%	150	150
D: 25%	75	225
E: 12.5%	40	280
F: 0%	0	300

**2. ábra:** A kalibrációs görbe hígítási sémája. A feloldott pozitív kontrollt (PC) összekeverjük a kit oldószerrel (DIL) a táblázat szerint.

#### Az aktivitáskontroll (AC) feloldása

1. Finoman ütögesse le az összes liofilizált anyagot az üveg aljára, és távolítsa el a kupakot.
2. Azonnal adjon hozzá a CoA-ban/az AC címkéjén feltüntetett térfogatú desztillált vizet közvetlenül a liofilizált anyaghoz.
3. Tegye vissza a kupakot.
4. Hagyja állni az üveget 5 percig jégen, majd időnként finoman rázza vagy vortexelje, amíg teljesen fel nem oldódik.
5. A feloldott kontrollt ugyanúgy hígítsa fel, mint a beteg szérummintáját.

A feloldott aktivitáskontrollt felhasználás előtt legfeljebb 4 órán keresztül tárolható, 2–8 °C-on vagy jégen. -70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tárolandó, és egyszer olvasható fel.

### 9.3.2. Kvalitatív protokoll

Hígítsa fel a feloldott pozitív kontrollt a 9.4: A minták hígítása című pontban leírtak szerint.

#### 9.4. A szérum kezelése

Részlegesen olvassa fel a fagyasztott szérumot úgy, hogy enyhe keverés közben rövid időre 37 °C-os vízfürdőbe helyezze. Részleges felolvasztás után azonnal helyezze a csöveket jégre, és hagyja ott, amíg teljesen felolvadnak. Keverje össze rövid ideig egy vortex keverőn.

#### A minták hígítása

Hígítsa a szérumot 1/101 arányban a kék címkével ellátott CP oldószerrel (500 µl oldószer + 5 µl szérum), és alaposan, de óvatosan keverje össze vortex keverőn. A hígított szérum az elemzés előtt legfeljebb 60 percig szobahőmérsékleten hagyható.

## 10. VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

### 10.1. Öblítési protokoll

Ürítse ki az mélyedéseket, és mossa le háromszor 300 µl mosóoldattal, minden alkalommal feltöltve és kiürítve a mélyedéseket. Az utolsó mosás után ürítse ki a mélyedéseket úgy, hogy a csíkot egy nedvszívó kendőhöz ütögeti.

### 10.2. A lemez elrendezése

#### 10.2.1. Félkvantitatív protokoll

Két párhuzamos mérést előkészítve pipetázzon mélyedésenként 100 µl-t a kalibrátorból (100%–0%) az NC-ből, az AC-ből és a hígított szérumszámítákból (P) a 2. táblázat szerint. Vakmintaként a 0%-os kalibrátort kell használni.

**2. táblázat:** A lemez javasolt elrendezése, félkvantitatív protokoll.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100%	12,5%	P1									
<b>B</b>	100%	12,5%	P1									
<b>C</b>	75%	0%	P2									
<b>D</b>	75%	0%	P2									
<b>E</b>	50%	NC	etc									
<b>F</b>	50%	NC										
<b>G</b>	25%	AC										
<b>H</b>	25%	AC										

#### 10.2.2. Kvalitatív protokoll

Két párhuzamos mérést előkészítve pipetázzon mélyedésenként 100 µl-t az oldószerből vakminta gyanánt, a PC-ből, az NC-ből és a hígított szérumszámítákból (P), az 3. táblázat szerint.

**3. táblázat:** A lemez javasolt elrendezése, kvalitatív protokoll.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Dil CP	P2										
<b>B</b>	Dil CP	P2										
<b>C</b>	PC	etc										
<b>D</b>	PC											
<b>E</b>	NC											
<b>F</b>	NC											
<b>G</b>	P1											
<b>H</b>	P1											

### 10.3. Vizsgálati protokoll

Csak annyi mélyedést válasszon le, amennyi a teszteléshez szükséges, és gondosan zárja vissza az alumíniumcsomagot. Hagyja az összes oldatot szobahőmérsékletre (20–25 °C) melegedni az elemzés előtt.

#### 1. A minták inkubálása

Töltse fel a lemezt a 10.2. pont szerint. Inkubáljuk 60–70 percig +37 °C-on, lefedve. Felhívjuk a figyelmét, hogy CO<sub>2</sub> atmoszférában nem szabad inkubálni. CO<sub>2</sub>-szekrény használata esetén győződjön meg róla, hogy a CO<sub>2</sub>-ellátás le van választva/ki van kapcsolva.

#### 2. Mosás

Mossa le a lemezt a 10.1: Öblítési protokoll című pontban leírtak szerint.

#### 3. Konjugátum inkubáció

Adjon 100 µl konjugátumot mindegyik mélyedésbe. Inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten (+20–25 °C).

#### 4. Mosás

Végezze el a mosást a korábbiakhoz hasonlóan, 3-szor.

#### 5. Szubsztrát inkubáció

Mérjen be 100 µL szubsztrát oldatot minden mélyedésbe, és inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten (+20–25 °C).

#### 6. A lemez leolvasása

Olvassa le az abszorbanciát (OD) 405 nm-en mikrolemez-leolvasón.

Választható: Stop oldatként használható 5 mM EDTA használható, mélyedésenként 100 µl mennyiségben. A mélyedések abszorbanciáját 60 percen belül mérje meg.

## 11. MINŐSÉGELLENŐRZÉS

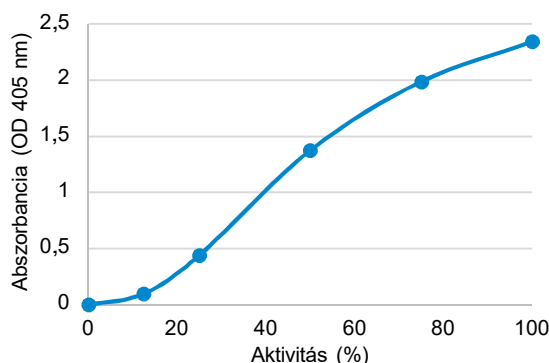
A kitben található Certificate of Analysis (elemzési tanúsítvány, CoA) tétel-specifikus, és a saját laboratóriumunk által kapott eredmények ellenőrzésére szolgál. A CoA-n feltüntetett eredmények csak iránymutatásként használhatók. Az Önök laboratóriuma által kapott eredmények eltérőek lehetnek.

A vakminta kivonása után a PC OD-értékének legalább 1,0-nak kell lennie, az NC OD-értékének pedig legfeljebb 0,2-nek (Dil CP, 0%). Ha valamelyik kontroll nincs a megfelelő tartományon belül, a tesztet érvénytelennek kell tekinteni, majd meg kell ismételni.

## 12. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

### 12.1. Félkvantitatív protokoll

Vonja ki a 0%-os kalibrátor abszorbanciáját az összes OD-értékből. Javasolt a 4 paraméteres logisztikus (Marquardt) görbeillesztés. A szokásos görbe példáját lásd a 3. ábrán.



**3. ábra:** Szokásos görbe példája. A fenti ábra egy szemikvantitatív standard görbére mutat példát, és nem használható tényleges betegminta értelmezésére.

Azokban az esetekben, amikor a kapott mintaértékek magasabbak, mint a legmagasabb, 100%-os kalibrátor értéke, a minták 1/201 arányban hígíthatók és újra tesztelhetők. Felhívjuk figyelmét, hogy a kapott aktivitási értéket ebben az esetben az alkalmazott mintahígításnak megfelelően kell korrigálni.

Javasoljuk, hogy minden laboratórium határozza meg a saját referenciaszintjét és határértékét a hiányra vonatkozóan.

## 12.2. Kvalitatív protokoll

Javasoljuk, hogy az értelmezés megkönnyítése érdekében az OD-eredményeket használja komplementaktivitás kiszámításához (a PC értékének %-ában). Ez a számítási mód megkönnyíti a különböző elemzések összehasonlítását is, mivel az OD hajlamosabb a változásra két mérés között. A komplementaktivitás kiszámítására használt módszert az alábbiakban ismertetjük.

1. Vonja le a vakminta (oldószer) abszorbanciáját az NC, a PC és a minták abszorbanciájából.
2. Számítsa ki az OD átlagértékeit az NC, a PC és a minták esetén.
3. Számítsa ki a komplementaktivitást az alábbi képlet segítségével:

$$\text{Komplementaktivitás (a PC \% - a)} = \frac{\text{minta} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

Az NC és a PC a reagens esetleges jelentős hibás működésének ellenőrzésére szolgál. A PC nem biztosítja a pontosságot a vizsgálat határértékénél. Javasoljuk, hogy minden laboratórium határozza meg a saját referenciaszintjét és határértékét a hiányra vonatkozóan.

A negatív eredményt, azaz a hiányt minden esetben egy új minta tesztelésével kell igazolni, hogy megbizonyosodjunk arról, nem történt-e véletlen *in vitro* komplementaktiváció a vizsgálat végrehajtása előtt.

## 13. ÉRTÉKELÉSI KRITÉRIUMOK

### 13.1. Várható eredmények

Ha a komplementkomponensek szintje vagy a komplement funkció csökkentnek bizonyult, akkor a klinikusok mérlegelik a hiánybetegség vagy valamilyen folyamatban lévő immunológiai folyamat jelenlétét, amely a komponensek fokozott lebomlásához és a komplementfehérjék szintjének csökkenéséhez vezet. A komplement fehérjék megnövekedett szintje általában az akut fázis válasz nem specifikus kifejeződése.

A WIESLAB® Complement system Classical pathway hasznos lehet a klasszikus útvonallal kapcsolatos komplementhiányok kimutatásában. A WIESLAB® Complement system Screen kit segítségével lehetőség nyílik a három komplement útvonal teljesebb és alaposabb, egyszerre történő funkcionális értékelésére a 4. táblázat szerint.

**4. táblázat:** A különböző útvonalak és lehetséges hiányállapotok eredményeinek kombinációja.

Klasszikus útvonal	MBL útvonal	Alternatív útvonal	Lehetséges hiány
Pozitív	Pozitív	Pozitív	Nincs
Negatív	Pozitív	Pozitív	C1q, C1r, C1s
Pozitív	Pozitív	Negatív	B, D és P faktor
Pozitív	Negatív	Pozitív	MBL, MASP-2
Negatív	Negatív	Negatív	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negatív	Negatív	Pozitív	C4, C2 vagy ezek kombinációja

## 13.2. Korlátozások

Az egyes betegek komplement szintje nem használható a betegség súlyosságának mérőszámaként, mivel ez betegenként változhat. Vagyis az eredmények abszolút standardizálása nehezen kivitelezhető.

A tesztet nem szabad a klinikai terápiára vonatkozó döntések kizárólagos alapjaként használni, hanem a klinikai tünetekkel és más rendelkezésre álló tesztek eredményeivel kombinálva kell felhasználni. Nem szabad terápiát elkezdni a komplementvizsgálat eredménye alapján. A kezelés megkezdése vagy módosítása nem alapulhat kizárólag a komplement szint változásain, hanem körültekintő klinikai megfigyelésen.

## 14. TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

### 14.1. Klinikai teljesítmény

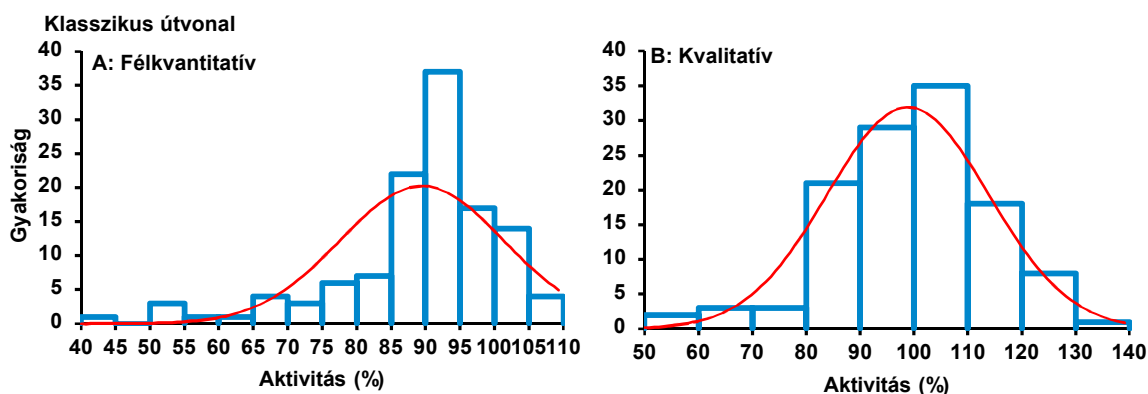
A 2SD-n (szórásértéken) belüli normál eloszlást a 4. ábra és a 5. táblázat mutatja. Az ezen a tartományon belüli eredmények a klasszikus útvonal normális működését jelzik. Javasoljuk, hogy minden laboratórium erősítse meg vagy állítsa fel saját referenciatartományát az általa kiszolgált populációra.

A referenciatartományok alatti érték vagy megnövekedett aktivációt jelez, ami a klasszikus komplementútvonal kapacitásának kimerítését eredményezi, vagy genetikailag meghatározott alacsony aktivitást jelez.

Az 5% alatti értékek erősen a teljes hiányra utalnak, amelyet vagy a túlzott aktiváció okoz, vagy az adott útvonalat érintő örökletes hiánybetegség. Annak megállapításához, hogy mely komplementfaktorok okozzák a csökkent aktivitást, a komplementfehérjék további elemzésére van szükség.

A negatív eredményt, azaz gyanított hiányt minden esetben egy új, körültekintően kezelt minta tesztelésével kell igazolni, hogy megbizonyosodjunk arról, nem történt-e véletlen *in vitro* komplementaktiváció a vizsgálat végrehajtása előtt.

120 látszólag egészséges vérador szérumát vizsgálták a(z) WIESLAB® Complement system Classical pathway kvalitatív alkalmazásban. A szemikvantitatív alkalmazás esetében a normál tartomány matematikai elméleti számításán alapul. A 120 egészségesnek tűnő véradó komplementaktivitását a 4. ábra és az 5. táblázat foglalja össze. A vizsgálatban egyetlen véradó sem volt 40% alatt.



**4. ábra:** A klasszikus útvonal szempontjából szemikvantitatív (A) és kvalitatív (B) protokoll szerint elemzett referenciapopuláció hisztogramja.

**5. táblázat:** A 120 véradó értékeit a szemikvantitatív és a kvalitatív protokoll szerint is elemeztük.

Protokoll	n	Átlag (%)	±2SD (%)	Medián (%)
Félkvantitatív	120	89	66-113*	92
Kvalitatív	120	99	69-129*	100

\*) Ez egy statisztikai számítás, és nem garantálja a valódi határértéket. Javasoljuk, hogy minden laboratórium határozza meg a saját referenciaszintjét és határértékét a gyanított hiányra vonatkozóan.

A vizsgálat során teszteltek ismert komplementhiányos szérumokat és a specifikus komplement faktor szempontjából depletált szérumokat is (6. és 7. táblázat). Minden hiányt mutató/depléciós szérum alacsony eredményt adott a vizsgálatban, és a félkvantitatív protokoll során 15%, a kvalitatív protokoll során pedig 5%\*\* alatti értéket adott.

\*\*\*) A kvalitatív alkalmazás szerint vizsgált, hiányt mutató betegminták kiterjesztett vizsgálatait lásd: „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”.

**6. táblázat:** Ismert hiánnyal rendelkező minták.

Hiány	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Betegek száma	5	1	1	1	2	2
Az észlelt hiányos szérumok száma	5	1	1	1	2	2

**7. táblázat:** Komponensek szempontjából depletált minták.

Depléción	C1q	C3	C4	C5	C7
Depletált szérumok száma	2	1	1	1	1
Kimutatott depléciók száma	2	1	1	1	1

## 14.2. Pontosság

### 14.2.1. Vizsgálatok közötti pontosság

#### Félkvantitatív protokoll

**8. táblázat:** A félkvantitatív alkalmazás esetén a vizsgálatok közötti pontosságot hét minta nyolc párhuzamosának három különböző alkalommal történő tesztelésével határozták meg.

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

#### Kvalitatív protokoll

**9. táblázat:** A kvalitatív alkalmazás esetén a vizsgálatok közötti pontosságot három minta két párhuzamosként történő tesztelésével határozták meg. Az eredményeket hat különböző mérés során rögzítették.

	1	2	3
%-os átlagérték	98	92	21
SD	4,3	3,9	1,7
CV %	4	4	8

## 14.2.2. Egy vizsgálaton belüli pontosság

### Félkvantitatív protokoll

**10. táblázat:** A félkvantitatív alkalmazás esetén a -vizsgálaton belüli pontosságot hét különböző minta nyolc párhuzamosának egy alkalommal történő tesztelésével határozták meg.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>%-os átlagérték</b>	79	76	72	83	24	34	30
<b>SD</b>	10	11	6	9	0	1	1
<b>CV %</b>	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

### Kvalitatív protokoll

**11. táblázat:** A kvalitatív alkalmazás esetén a vizsgálaton belüli pontosságot egy minta 40 mélyedésben történő tesztelésével határozták meg.

Vizsgálat	%-os átlagérték	SD	CV %
<b>CP</b>	85	2,9	3

## 14.2.3 Tételek közötti variáció

### Félkvantitatív protokoll

**12. táblázat:** A félkvantitatív alkalmazásban a gyártási tételek közötti eltéréseket hét minta két párhuzamosként történő vizsgálatával határozták meg, három különböző tételt használva, három különböző személy által.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>%-os átlagérték</b>	8	73	85	24	37	74	78
<b>SD</b>	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
<b>CV %</b>	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

## 14.3. Linearitás

### Félkvantitatív protokoll

**13. táblázat:** A hígítás visszanyerését három különböző minta öt hígítási sorozatának vizsgálatával határozták meg.

Minta	Hígítás	Átlagos mért aktivitás (%)	Elméleti aktivitás (%)	Hígítással korrigált %-os visszanyerés
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
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

#### **14.4. Kimutatási határérték**

##### **Félkvantitatív protokoll**

**Kalibrátor mérési tartománya:** 12,5%–100%

**Limit of Detection (kimutatási határérték, LoD) = 8%**

## 15. HIBAELHÁRÍTÁS









PROBLÉMA	LEHETSÉGES OKOK	MEGOLDÁS
<b>A kontrollok értékei a tartományon kívül vannak</b>	Nem megfelelő hőmérséklet, időzítés vagy pipettázás; a reagensek nincsenek összekeverve.	Ellenőrizze, hogy az idő és a hőmérséklet megfelelő-e. Ismételje meg a tesztet.
	A kontrollok keresztszennyeződése.	Körültekintően pipettázzon.
	Az optikai útvonal nem tiszta.	Ellenőrizze, hogy nincs-e szennyeződés vagy légbuborék a mélyedésekben. Törölje le a lemez alját, és olvassa le újra.
	A kontrollok (pozitív és/vagy aktivitáskontrollok) nincsenek megfelelően feloldva. A kalibrátor hígítása nem megfelelő.	Ellenőrizze a kontrollokat, oldjon fel egy újat. Ellenőrizze az elkészített oldatot, és készítsen új hígítást.
<b>Minden vizsgálati eredmény negatív</b>	Egy vagy több reagens nincs hozzáadva, vagy rossz sorrendben lett hozzáadva.	Ellenőrizze újra az eljárást. Ellenőrizze, van-e fel nem használt reagens. Ismételje meg a tesztet.
	Az antigénnel bevont lemez inaktív.	Ellenőrizze, hogy nincs-e egyértelműen látható nedvesség a fel nem használt mélyedésekben. Törölje le a lemez alját, és olvassa le újra.
	A szérum inaktív.	Hígítson új mintákat.
<b>Minden mintatartó mélyedés láthatóan sárga</b>	Szennyezett pufferek vagy reagensek.	Ellenőrizze az összes oldatot, nem zavarosak-e.
	A mosóoldat szennyezett.	Használjon tiszta edényt. Ellenőrizze az oldat elkészítéséhez használt víz minőségét.
	A szérum nem megfelelő hígítása.	Ismételje meg a tesztet.
<b>Nem megfelelő pontosság</b>	A pipetta adagolási CV-értéke >5%, vagy a minták nincsenek összekeverve.	Ellenőrizze a pipetta kalibrálását. Alkalmazzon reprodukálható technikát. Kerülje el a légbuborékok képződését a pipetta hegyében.
	A szérum vagy a reagensek nincsenek megfelelően összekeverve, vagy nincsenek szobahőmérsékletűre melegedve.	Óvatosan, de alaposan keverje össze az összes reagenst, és hagyja szobahőmérsékletre melegedni őket.
	A reagens hozzáadása túl sokáig tart, az időintervallumok változóak.	Fejlesszen ki következetes, egységes technikát, és használjon több hegygel rendelkező eszközt vagy automatikus adagolót az idő csökkentése érdekében.
	Az optikai útvonal nem tiszta.	Ellenőrizze, hogy nincsenek-e légbuborékok a mélyedésekben. Törölje le a lemez alját, és olvassa le újra.
	Nem egyenletes a mosás, beszorult légbuborékok, mosóoldat maradt a mélyedésekben.	Ellenőrizze, hogy minden mélyedés meg van-e töltve és a felszívás egységes volt-e. Mérjen be folyadékot a reagens szintje fölé a mélyedésben. Az utolsó mosás után ürítse ki a mélyedéseket úgy, hogy a csíkot egy nedvszívó kendőhöz ütögeti.




## 16. SZAKIRODALMI HIVATKOZÁSOK

- 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. J Immunol Methods. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. SZIMBÓLUMOK LEÍRÁSA

A következő szimbólumok jelenhetnek meg a csomagoláson és a címkén:

	Tételkód.
	Katalógusszám.
	Lejáratási idő.
	Hőmérsékleti határ.
	Biológiai kockázat.
	Olvassa el a használati utasítást.
	In vitro diagnosztikai használatra.
	Gyártó.

	96 teszthez elegendő mennyiséget tartalmaz.
	Megfelelés az in vitro diagnosztikai orvostechnikai eszközökre vonatkozó 98/79/EK irányelvnek.
	Egészségügyi veszély.

<b>Ag</b>	Antigén (bevont lemez).
<b>DIL</b>	Oldószer.
<b>BUF</b> <b>WASH</b> <b>30X</b>	Mosópuffer, 30x koncentrátum.
<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>LYO</b>	Pozitív kontroll.
<b>CONTROL</b> <b>AC</b> <b>LYO</b>	Liofilizált aktivitáskontroll.
<b>CONTROL</b> <b>-</b>	Negatív kontroll.
<b>CONJ</b>	Konjugátum.
<b>SUBS</b> <b>pNPP</b>	pNPP szubsztrát.
<b>CH</b> <b>REP</b>	Svájci képviselő.

## 18. DOKUMENTUMTÖRTÉNET

Változat	Változások
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Jelentős szerkesztési változások az új dokumentumelrendezés miatt. A félkvantitatív és a kvalitatív alkalmazáshoz tartozó eljárásokat össze lettek vonva, és adott esetben külön alcímek lettek feltüntetve.</p> <p>Hozzáadva az információ, hogy „Az elemzést képzett laboratóriumi szakembereknek kell elvégezniük.”</p> <p>A metrológiai nyomon követhetőségre vonatkozó információk hozzáadva.</p> <p>Az egyértelműség kedvéért a pozitív kontroll specifikációja legalább 1-ről legalább 1,0-ra módosult.</p> <p>A CO<sub>2</sub>-szekrényel kapcsolatos információk hozzáadva.</p>
LABEL-DOC-0031 v 7.0	<p>Fokozott átláthatóság a 14.1. szakaszban, miszerint a félkvantitatív adatok matematikai elméleti számításokon alapulnak.</p> <p>A 6. és 10. táblázatban szereplő értékeket frissítettük, hogy megfeleljenek az 5.0-s verzióban közzétett teljesítményértékelésnek.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)

Leiðbeiningar  
**WIESLAB<sup>®</sup> Complement system**  
Classical pathway  
Eigindlegt og hálfmeginlegt próf

Til in vitro greiningar

Ensímónæmismæling fyrir mat  
á magnavirkni

- Brjótið í sundur örtítrunarræmur (12x8) 96 gata
- Geymið settið við +2-8°C
- Geymið jákvæða samanburðarefnið og virka samanburðarefnið við -20°C



Skjal nr. LABEL-DOC-0031 7.0

Gildisdagsetning: 22-Jan-2026



### 3. MEGINREGLA UM WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY

WIESLAB® Complement System Classical pathway greiningin sameinar meginreglur rauðalosgreiningar fyrir virkjun magna og notkun á merktum mótefnum sem eru sértæk fyrir nýmótefnavaka sem myndast vegna magnavirkjunar. Magn nýmótefna sem myndast er í réttu hlutfalli við virkni klassíska ferlisins.

Í klassíska ferlisettinu fyrir magnakerfið eru holurnar á örtítrunarræmunum húðaðar með sérstökum ræsi klassíska ferlisins. Platan ásamt samsetningu sýnisins af útþynningarjöfnunni og útþynningarmagni sermis sjúklingsins tryggja að aðeins klassíska ferlið er virkjað. Á meðan á ræktun útþynnts sermis sjúklingsins í brunnunum stendur er magni virkjaður með húðuninni.

Brunnarnir eru svo skolaðir og magnið af C5b-9 flókanum sem myndast á yfirborði plötunnar er greint með sérstökum alkalískum fosfatasa sem merktur er sem mótefni gegn C5b-9 nýmótefninu sem myndast á meðan á myndun götunarfléttunnar stendur (MAC).

Eftir eitt þvottaskref til viðbótar er greining á sérstökum mótefnum framkvæmd með kvíun með alkalískri efnisímhvarfefnislausn. Magn magnavirkjunar er í beinu samræmi við litastyrkinn og er mælt út frá gleypni (ljóspéttni, optical density, OD).

#### Mælieiningarfræðilegur rekjanleiki

Gildið sem jákvæða samanburðarefninu er úthlutað er skilgreint sem 100% af eðlilegri virkni magnaferlis og er ekki rekjanlegt í SI-einingar. Því er úthlutað með blöndu af heilbrigðu blóðvatni úr mönnum sem metið er með lýstu ELISA prófunarferli með innra tilvísunarkerfi sem hæsta stigi kvörðunarstigveldis.

### 4. VIÐVARANIR, VARNADARORÐ OG VARÚÐARRÁÐSTAFANIR

- TIL *IN VITRO* GREININGAR.
- Efnisþættir sermis úr mönnum sem notaðir eru til að búa til samanburðarefnin í settinu hafa verið prófaðir til að kanna hvort mótefni gegn ónæmisbrestsveiru 1 & 2 (HIV 1&2), gegn lifrabólgu C (HCV) sem og hvort yfirborðsmótefnisvakar lifrabólgu B séu til staðar, með aðferðum sem samþykktar eru af Matvæla- og lyfjaeftirliti Bandaríkjanna og niðurstöður hafi verið neikvæðar. Þar sem engar prófunaraðferðir geta veitt algjöra fullvissu fyrir því að HIV, HCV, lifrabólga B veira eða aðrir smitberar séu ekki til staðar, ætti að meðhöndla sýni og virk efni úr mönnum eins og þau geti borið með sér smitbera.
- Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health mælti með því að mögulegir smitberar væru meðhöndlaðir á lífverndarstigi 2.
- Allar lausnir innihalda ProClin 300 sem rotvarnarefni. Aldrei skal nota mælípípu um munn eða leyfa virkum efnum eða sýnum úr sjúklingum að komast í snertingu við húð. Virk efni sem innihalda ProClin gætu verið ertandi. Forðist snertingu við húð og augu. Ef um snertingu er að ræða skal skola með miklu vatni.
- Sé beðið um það er hægt að fá öryggisblöð fyrir alla hættulega efnisþætti sem er að finna í þessu setti frá Svar Life Science.
- Ekki nota efnisþætti sem eru komnir fram yfir fyrningardagsetningu.
- Virk efni í setti eru eingöngu ætluð viðkomandi setti og skulu ekki notuð í settum með öðrum framleiðslulutum.
- Fargið öllum notuðum efnisþáttum, notuðum/afgangssýnum og afgangssamanburðarefnum sem lífsýnahættulegum úrgangi í samræmi við reglur sem gilda á viðkomandi svæði. Fargið öðrum efnisþáttum sem eftir eru sem hættulegum úrgangi í samræmi við staðbundnar reglur.
- Tilkynnt skal um öll alvarleg tilvik sem hafa komið upp í tengslum við þetta tæki til Svar Life Science AB og lögbærs yfirvalds aðildarríkis ESB eða lands þar sem notandinn/sjúklingurinn hefur búsetu.

Þvottalaun (30x styrkur)



## VIÐVÖRUN

**Inniheldur:** Hvarfmassa með: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] og 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317	Getur valdið ofnæmisviðbrögðum í húð.
H412	Skaðlegt lífríki í vatni með langvarandi áhrifum.
P261	Forðast skal að anda að sér úða.
P273	Forðist losun út í umhverfið.
P280	Notið hlífðarhanska.
P333 + P313	Ef húðerting eða útbrot koma fram: Leitið læknisráðs/aðstoðar.

Útþynningarjafnalaun CP, blandprótínslaun, neikvætt samanburðarefni, ensímhvarfefni pNPP

**EUH208** Inniheldur „hvarfmassa með: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] og 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)“ Getur valdið ofnæmisviðbrögðum.

**EUH210** Öryggisblað fánlegt sé þess óskað.

## 5. INNIHALD SETTS

- 1 innsiglið örtítrunarplata með brunnum sem hægt er að taka í sundur (12x8), húðuð með IgM úr mönnum.
- 2 hettuglös (35 ml) af þynningarlausn CP (Dil CP), blámerkt.
- 1 hettuglas (0,2 ml) neikvætt samanburðarefni (NC) sem inniheldur sermi úr mönnum (sem skal þynna út eins og sýni af sermi sjúklings).
- 1 hettuglas (0,2 ml) jákvætt samanburðarefni (PC) sem inniheldur frostþurrkað sermi úr mönnum, sjá kafla 9.3 „Enduruppbygging jákvæðs samanburðarefnis“ hér að neðan.
- 1 hettuglas (magn, sjá CoA) virknistýring (AC) fyrir hálfmegindelega notkun, sem inniheldur frostþurrkað sermi úr mönnum (annar uppruni en PC), sjá kafla 9.3.1 „Blöndun jákvæðs samanburðarefnis“ samkvæmt aðferð fyrir hálfmegindelega notkun.
- 1 hettuglas (13 ml) blandprótínslaun sem inniheldur mótefni merkt með alkalískum fosfatasa gegn C5b-9 (blár litur).
- 1 hettuglas (13 ml) ensímhvarfefnislaun pNPP, tilbúin til notkunar.
- 1 hettuglas (30 ml) þvottalaun, 30x styrkur.

**Vinsamlegast athugið:** Finna má blöndunarmagn fyrir AC í greiningarvottorðinu (CoA) (XXX µl) og á AC miðanum.

## 6. NAUÐSYNLEG EFNI EÐA BÚNAÐUR SEM FYLGJA EKKI

- Örplötulesari með 405 nm síu.
- Nákvæmnimælípúr með einnota endum.
- Þvottabúnaður fyrir ræmur, rakadrægar þurrkur, pípur og tímamælir.
- Hitaskápur sem getur haldið 37°C hita. Ef CO<sub>2</sub> skápur er notaður skal ganga úr skugga um að CO<sub>2</sub> rennslið sé aftengt eða það sé slökkt á því.

## 7. MEÐHÖNDLUN OG GEYMSLA

- Geyma skal virk efni við 2-8°C fyrir utan jákvæða samanburðarefnið og virka samanburðarefnið.
- Öll virk efni í settinu eru tilbúin til notkunar nema þvottalaun og samanburðarefni.

- Geyma skal jákvæða samanburðarefnið og virka samanburðarefnið við -20°C þar til blöndun fer fram.
- Blandaða jákvæða samanburðarefnið og virka samanburðarefnið skal geymt við <-70°C og það má þíða einu sinni.

## 8. UNDIRBÚNINGUR SÝNA

Þessi prófun er framkvæmd á sermissýnum. Taka skal blóðsýni með smitgát í bláæðaástungum og sermi skal fengið með stöðluðum aðferðum. Mælt er með að minnsta kosti 5 ml af heilblóði. Leyfið blóðinu að storkna í sermípípum, í 60-65 mínútur við stofuhita (20-25°C). Skiljið blóðsýni og flytjið frumulaust sermið í hreina pípu.

Blóðvatn skal meðhöndlað rétt til að fyrirbyggja *in vitro* magnavirkjun. Blóðvatn skal fryst við -70°C eða lægra í vel lokuðum pípum til lengri geymslu eða í flutningi á þurrís. Ekki má frysta sýni og þíða oftár en einu sinni.

Ekki skal nota blóðvatn sem er með gulu, blóðfitu og blóðrofa. Ekki má nota hitaóvirkjað blóðvatn. Ekki má nota blóðvökva. Clinical and Laboratory Standards Institute veitir ráðleggingar um geymslu á blóðsýnum (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. UNDIRBÚNINGUR OG MEÐHÖNDLUN VIRKRA EFNA

### 9.1. Undirbúningur þvottalausnar

Ef saltkristallar sjást í hettuglasinu með óblandaðri þvottalausn skal setja hettuglasið í vatn við 37°C þar til kristallarnir eru leystir upp, áður en þvottalausnin er þynnt.

Þynnið 30 ml af þvottalausn af styrknum 30x í 870 ml af eimuðu vatni. Þegar þynnta þvottalausnin er geymd við 2-8°C er hún stöðug þar til settið er komið fram yfir fyrningardagsetningu.

### 9.2. Neikvætt samanburðarefni (NC)

Þynna skal NC sem sermissýni úr sjúklingi.

### 9.3. Blöndun jákvæðs samanburðarefnis (PC)

Blandið PC samkvæmt eftirfarandi aðferð:

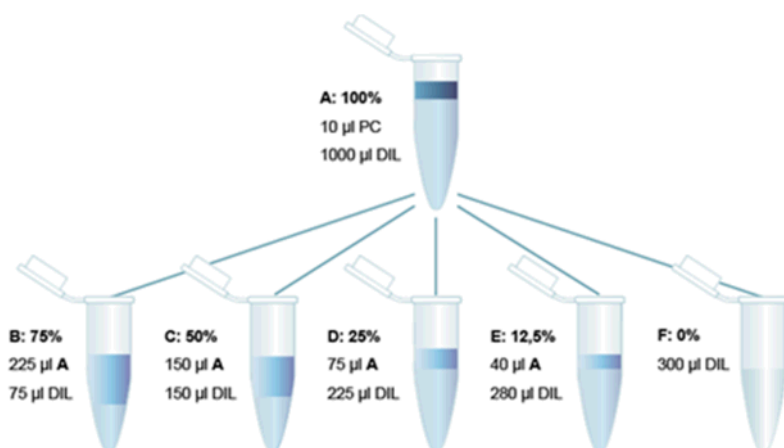
1. Bankið varlega þar til allt frostþurrkað efni er fallið á botn hettuglassins og fjarlægið hettuna.
2. Bætið strax 200 µL af eimuðu vatni beint við frostþurrkaða efnið.
3. Skiptið um hettuna.
4. Leyfið hettuglasinu að standa á ís í 5 mínútur og hristið síðan varlega öðru hverju eða í vortex-blandara þar til það er leyst upp að fullu.
5. Ef þynna á enn frekar, sjáið kafla 9.3.1 eða 9.3.2 fyrir hálfmegindelega og eigindlega aðferðarlýsingu, í þessari röð.

Geyma má blandað PC í allt að 4 klukkustundir fyrir notkun ef það er geymt við 2-8°C eða á ís. Það skal geymt við <-70°C og má þíða það einu sinni.

#### 9.3.1. Hálfmegindeleg aðferðarlýsing

##### Undirbúningur kvörðunarferils

Sjá mynd 2 og töflu 1 fyrir þynningu á blönduðu PC í kvörðunarefni. Skilja má kvörðunarefnið eftir við stofuhita í 1 klst. fyrir notkun. Kvörðunarefnið verður að vera nýblandað og ekki má geyma það til að nota síðar.



**Tafla 1:** Magn til að þynna kvörðunarferilinn.

Kvörðunarferill	PC (µl)	DIL (µl)
<b>A: 100%</b>	10	1000
Frá 100% (µl)		
<b>B: 75%</b>	225	75
<b>C: 50%</b>	150	150
<b>D: 25%</b>	75	225
<b>E: 12,5%</b>	40	280
<b>F: 0%</b>	0	300

**Mynd 2:** Þynningarkerfi fyrir kvörðunarferil. Blönduðu jákvæðu samanburðarefni (PC) er blandað saman við þynningarefni settsins (DIL) samkvæmt töflunni.

### Blöndun virks samanburðarefnis (AC)

1. Bankið varlega þar til allt frostþurrkað efni er fallið á botn hettuglassins og fjarlægið hettuna.
2. Bætið strax magninu af eimaða vatninu sem gefið er upp á CoA/AC merkingum við frostþurrkaða efnið.
3. Setjið hettuna aftur á.
4. Leyfið hettuglasinu að vera á ís í 5 mínútur og hristið síðan varlega eða í vortex-blandara þar til það er leyst upp að fullu.
5. Þynnið blandaða samanburðarefnið á sama hátt og sermisýni úr sjúklingi.

Geyma má blandaða virka samanburðarefnið í allt að 4 klukkustundir fyrir notkun ef það er geymt við 2-8°C eða á ís. Það skal geymt við <-70°C og má þíða það einu sinni.

### 9.3.2. Eigindleg aðferðarlýsing

Þynnið blandaða jákvæða samanburðarefnið samkvæmt leiðbeiningunum í kafla 9.4: Útþynning sýna.

### 9.4. Meðhöndlun á sermi

Þíðið frosið blóðvatn með því að setja það í stuttan tíma í vatn við 37°C og látið blandast varlega. Setjið pípurnar strax á ís eftir að efnið hefur þiðnað að hluta til og látið þær vera þar þangað til þær hafa þiðnað að fullu. Blandið í stutta stund í vortex blandara.

### Útþynning sýna

Þynnið sermið í hlutfallinu 1/101 með þynningarefni CP, blá merking, (500 µL þynningarefni + 5 µL sermi) og blandið vel en varlega á vortex. Skilja má útþynnta sermið eftir við stofuhita í mest 60 mínútur áður en greining fer fram.

## 10. PRÓFUNARFERLI

### 10.1. Aðferðarlýsing við skolon

Tæmið brunnana og skolið 3 sinnum með 300 µL skolunarlausn, fyllið og tæmið brunnana í hvert skipti. Eftir síðasta þvottinn skal tæma brunnana með því að banka á ræmuna á rakadrægri þurrku.

### 10.2. Niðurröðun plötu

#### 10.2.1. Hálfmeginndleg aðferðarlýsing

Píplið 100 µL/brunn í samstæðu kvörðunarefna (100%-0%), NC, AC og þynntra sermisýna (P) samkvæmt töflu 2. Nota skal 0% kvörðunarefni sem núll.

**Tafla 2:** Tillaga að niðurröðun plötu, hálfmeginndleg aðferðarlýsing.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
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										

#### 10.2.2. Eigindleg aðferðarlýsing

Píplið í 100 µL/brunn samstæðu af þynningarefni sem núll, PC, NC og þynntum sermisýnum (P) samkvæmt töflu 3.

**Tafla 3:** Tillaga að niðurröðun plötu, eigindleg aðferðarlýsing.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dil CP	P2										
B	Dil CP	P2										
C	PC	etc										
D	PC											
E	NC											
F	NC											
G	P1											
H	P1											

### 10.3. Aðferðarlýsing við prófanir

Fjarlægið aðeins þann fjölda brunna sem þarf fyrir prófunina og lokið álpakkningunni aftur vandlega. Látið allar lausnir ná jafnvægi við stofuhita (20-25°C) áður en greining á sér stað.

#### 1. Kvíun sýna

Fyllið plötuna samkvæmt kafla 10.2. Ræktið í 60-70 mínútur við +37°C með loki. Vinsamlegast athugið að ekki ætti að framkvæma ræktun í CO<sub>2</sub> andrúmslofti. Ef CO<sub>2</sub> skápur er notaður skal ganga úr skugga um að CO<sub>2</sub> rennslið sé aftengt eða það sé slökkt á því.

#### 2. Þvoið

Þvoið plötuna samkvæmt kafla 10.1: Aðferðarlýsing við skolun.

#### 3. Ræktun blandprótínslausnar

Bætið 100 µL af blandprótínslausn í hvern brunn. Ræktið í 30 mínútur við stofuhita (+20-25°C).

#### 4. Þvoið

Þvoið 3 sinnum eins og áður.

#### 5. Ræktun ensímshvarfefnis

Bætið 100 µL af ensímshvarfefnislausn í hvern brunn og ræktið í 30 mínútur við stofuhita (+20-25°C).

#### 6. Að lesa plötuna

Lesið gleypni (OD) við 405 nm á örplötulesara.

Valfrjálst: Hægt er að nota 5 mM EDTA sem stöðvunarlausn, 100 µL/brunn. Lesið gleypni brunnanna innan 60 mínútna.

## 11. GÆÐASTJÓRNUN

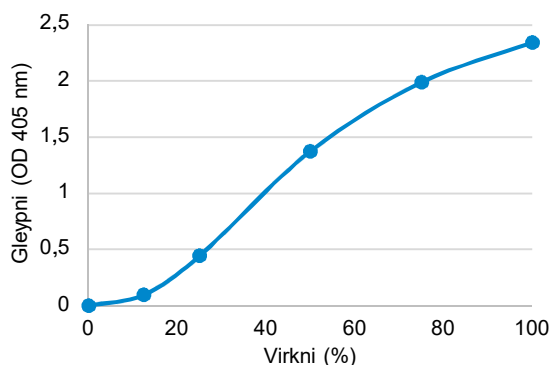
Greiningarvottorð (CoA) sem fylgir settinu á við um tiltekna framleiðslulotu og það skal notað til að sannreyna niðurstöður sem fengnar eru á rannsóknarstofu okkar. Niðurstöðurnar sem tilgreindar eru á CoA skulu aðeins notaðar til leiðsagnar. Niðurstöðurnar á rannsóknarstofu þinni geta verið mismunandi.

OD fyrir PC ætti að vera >1,0 og OD fyrir NC <0,2 eftir að núllið hefur verið dregið frá (Dil CP, 0%). Ef eitthvað af samanburðarefnum er ekki innan viðeigandi marka ætti prófið að teljast ógilt og það svo endurtekið.

## 12. TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

### 12.1. Hálfmeginndleg aðferðarlýsing

Dragið gleypni 0% - kvörðunarefnisins frá öllum OD gildum. Mælt er með 4 færíbreyta s-laga kúrfu af veldisfalli (Marquardt). Sjá dæmi um staðlaða kúrfu á mynd 3.



**Mynd 3:** Dæmi um staðlaða kúrfu. Myndin hér að ofan sýnir dæmi um hálfmeginndlega staðlaða kúrfu og ekki ætti að nota hana við túlkun á raunverulegum sýnum úr sjúklingum.

Í þeim tilfellum þar sem fengin sýnisgildi eru hærri en hæsta kvörðunarefnið 100%, má þynna sýnin 1/201 og prófa aftur. Vinsamlegast athugið að það ætti að breyta virknigildinu sem fæst í þessu tilfelli í samræmi við þá þynningu sýnis sem notast er við.

Mælt er með því að hver rannsóknarstofa ákveði sitt eigið viðmiðunarstig og viðmiðunargildi fyrir annmarka.

## 12.2. Eigindleg aðferðarlýsing

Mælt er með því að nota niðurstöður fyrir OD til að reikna út gildi fyrir magnavirkni (% af PC) svo að túlkun sé auðveldari. Þessi útreikningur auðveldar einnig samanburð á mismunandi greiningum þar sem líklegra er að OD breytist á milli keyrslna. Sjá má lýsingu á aðferðinni við að reikna út magnavirkni hér að neðan.

1. Dragið gleypni núllsins (útþynningar) frá gleypni NC, PC og sýnanna.
2. Reiknið meðaltalsgildi OD fyrir NC, PC og sýnin.
3. Reiknið magnavirkni með því að nota formúluna hér að neðan:

$$\text{Magnavirkni (\% af PC)} = \frac{\text{Sýni} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

NC og PC eru ætluð til að fylgjast með verulegum annmörkum virkra efna. PC tryggir ekki nákvæmni við viðmiðanir prófana. Mælt er með því að hver rannsóknarstofa ákveði sitt eigið viðmiðunarstig og viðmiðunargildi fyrir annmarka.

Alltaf ætti að sannreyna neikvæðar niðurstöður, þ.e.a.s. annmarka, með því að prófa nýtt sýni til að tryggja að engin óviljandi *in vitro* magnavirkjun hafi átt sér stað áður en prófunin er framkvæmd.

## 13. MATSVIÐMIÐ

### 13.1. Væntanlegur árangur

Þegar lægra þéttmagn magnapátta eða magnavirkni fyrirfinnst, íhuga læknar hvort til staðar séu annmarkar eða viðvarandi, ónæmisfræðilegt ferli, sem leiðir til aukins niðurbrots efnispátta og bælingar á magnastigi. Hærra magnastig er vanalega ósérhæft merki um bráðasvar.

WIESLAB® Complement system Classical pathway getur verið gagnlegt til að greina magnaskort sem tengist klassíska ferlinu. Hægt er að framkvæma ítarlegra og dýpra mat á virkni allra þriggja magnaferlanna með WIESLAB® Complement System Screen Kit setti eins og sýnt er í töflu 4.

**Tafla 4:** Samsetning á niðurstöðum í mismunandi ferlum og mögulegir annmarkar.

Klassískt ferli	MBL-ferli	Stuttferli	Mögulegir annmarkar
Jákvætt	Jákvætt	Jákvætt	Ekkert
Neikvætt	Jákvætt	Jákvætt	C1q, C1r, C1s
Jákvætt	Jákvætt	Neikvætt	Þáttur B, D og P
Jákvætt	Neikvætt	Jákvætt	MBL, MASP-2
Neikvætt	Neikvætt	Neikvætt	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Neikvætt	Neikvætt	Jákvætt	C4, C2 eða samsetning

## 13.2. Takmarkanir

Ekki er hægt að nota magnastig einstaka sjúklinga sem mælikvarða á alvarleika sjúkdóms þar sem það getur verið mismunandi eftir sjúklingum. Því er erfitt að staðla niðurstöður fyllilega.

Ekki ætti að treysta á prófið sem eina grundvöll ákvarðana um klíniska meðferð heldur ætti að nota það samhliða klínískum einkennum og niðurstöðum annarra tiltækra prófa. Ekki ætti að hefja meðferð á grundvelli niðurstaðna magnaprófana. Upphaf eða breytingar á meðferð ættu ekki að byggjast á breytingum á magnastigi eingöngu heldur frekar á ítarlegri klínískri skoðun.

## 14. EINKENNI AFKASTA

### 14.1. Klínísk afköst

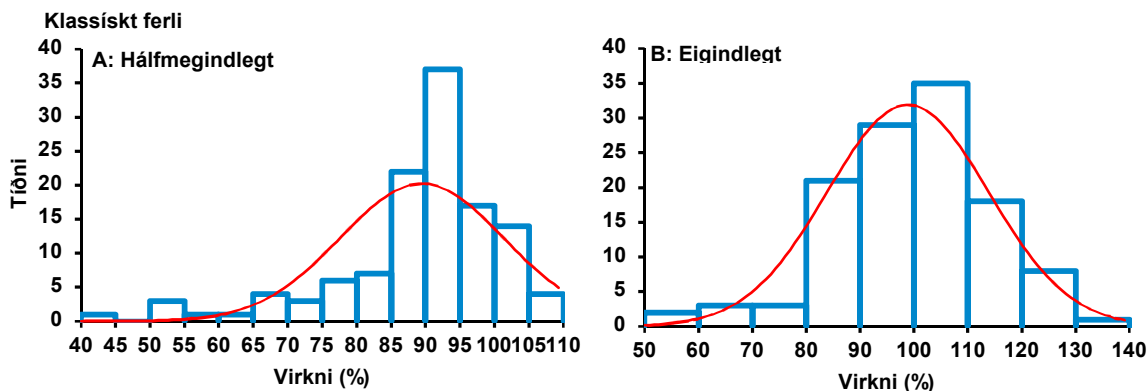
Eðlileg dreifing innan 2SD (staðalfrávik) er sýnd á mynd 4 og töflu 5. Niðurstöður innan þessa bils gefa til kynna eðlilega virkni klassísks ferlis. Mælt er með því að hver rannsóknarstofa staðfesti eða ákveði sitt eigið viðmiðunarbíl fyrir þýðið sem hún þjónar.

Gildi fyrir neðan viðmiðunarmörkin gefur annað hvort til kynna aukna virkjun sem leiðir til tæringar á getu klassísks magnaferlis eða lágrar virkni af erfðafræðilegum orsökum.

Gildi undir 5% benda eindregið til algjörs skorts, annaðhvort af völdum of mikillar virkjunar eða arfgengra annmarka á viðkomandi ferli. Til að komast að því hvaða magnapáttur/þættir valda minni virkni þarf frekari greiningu á magnaprótínum.

Alltaf ætti að sannreyna neikvæðar niðurstöður, þ.e. grun um annmarka, með því að prófa nýtt, vandlega meðhöndlað sýni til að tryggja að engin *in vitro* magnavirkjun hafi átt sér stað.

Sermi frá 120 heilbrigðum blóðgjöfum var prófað WIESLAB® Complement system Classical pathway í þáttbundna hlutanum. Fyrir hálfmagnbundna hlutann er eðlilegt bil byggt á fræðilegum stærðfræðilegum útreikningi. Magnavirkni 120 heilbrigðu blóðgjafanna er tekin saman á mynd 4 og í töflu 5. Í rannsókninni var enginn blóðgjafi undir 40%.



**Mynd 4:** Stuðlarit fyrir viðmiðunarpýði sem greint var í klassíska ferlinu, hálfmegindeleg (A) og eigindeleg (B) aðferðarlýsing, í þessari röð.

**Tafla 5:** Gildi fyrir 120 blóðgjafa sem greindir voru með hálfmegindelegri og eigindelegri aðferðarlýsingu, í þessari röð.

Aðferðarlýsing	n	Meðaltal (%)	±2SD (%)	Miðgildi (%)
Hálfmegindelegt	120	89	66-113*	92
Eigindelegt	120	99	69-129*	100

\*) Þetta er tölfræðilegur útreikningur og mun ekki tryggja sanna viðmiðun. Mælt er með því að hver rannsóknarstofa ákveði sitt eigið viðmiðunargildi og viðmiðunargildi fyrir grun um annmarka.

Blóðvatn með þekktu magnaannmarka og skert blóðvatn fyrir tiltekinn magna var athugað í prófuninni (tafla 6 og 7). Allt ófullnægjandi/skert blóðvatn var lágt í prófuninni og fékk gildi undir 15% og 5%\*\* í hálfmegindelegri og eigindelegri aðferðarlýsingu, í þessari röð.

\*\* Sjá „M.A. Seelen o.fl, 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

**Tafla 6:** Sýni með þekktum annmörkum.

Annmarkar	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Fjöldi sjúklinga	5	1	1	1	2	2
Fjöldi ófullnægjandi blóðvatnssýna sem greindust	5	1	1	1	2	2

**Tafla 7:** Sýni með skerta magna.

Skerðing	C1q	C3	C4	C5	C7
Fjöldi skerts blóðvatns	2	1	1	1	1
Fjöldi greindra skerðinga	2	1	1	1	1

## 14.2. Nákvæmni

### 14.2.1. Nákvæmni milli prófana

#### Hálfmegindeleg aðferðarlýsing

**Tafla 8:** Skorið var úr um nákvæmni milli prófana fyrir hálfmegindelega notkun með því að prófa sjö sýni í 8 eftirmyndum við þrjú mismunandi tækifæri.

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

#### Eigindeleg aðferðarlýsing

**Tafla 9:** Skorið var úr um nákvæmni milli prófana fyrir eigindelega notkun með því að prófa þrjú sýni í samstæðu. Niðurstöður fengust fyrir sex mismunandi keyrslur.

	1	2	3
Meðalgildi %	98	92	21
SD	4,3	3,9	1,7
CV %	4	4	8

### 14.2.2. Nákvæmni innan prófana

#### Hálfmegindeleg aðferðarlýsing

**Tafla 10:** Skorið var úr um nákvæmni innan prófana fyrir hálfmegindelega notkun með því að prófa sjö sýni í 8 eftirmyndum í eitt skipti.

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

## Eigindleg aðferðarlýsing

**Tafla 11:** Skorið var úr um nákvæmni innan prófana með því að prófa eitt sýni í 40 brunnum.

Prófun	Meðalgildi %	SD	CV %
CP	85	2,9	3

### 14.2.3. Afbrigði frá lotu til lotu

#### Hálfmeginndleg aðferðarlýsing

**Tafla 12:** Skorið var úr um afbrigði frá lotu til lotu við hálfmeginndlega notkun með því að prófa sjö sýni í samstæðu í þremur mismunandi lotum af þremur mismunandi einstaklingum.

	1	2	3	4	5	6	7
Meðalgildi %	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%

### 14.3. Línuleiki

#### Hálfmeginndleg aðferðarlýsing

**Tafla 13:** Skorið var úr um endurheimt þynningar með því að prófa fimm raðþynningar fyrir þrjú mismunandi sýni.

Sýni	Þynning	Meðaltal mældrar virkni (%)	Fræðileg virkni (%)	Leiðrétt þynning !% endurheimt
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
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

### 14.4. Greiningarmörk

#### Hálfmeginndleg aðferðarlýsing

Mælisvið kvörðunarefna: 12,5% - 100%

Greiningarmörk (LoD) = 8%

## 15. ÚRRÆÐALEIT

VANDAMÁL	MÖGULEGAR ORSAKIR	LAUSN
<b>Samanburðargildi utan bils.</b>	Rangt hitastig, tímasetning eða píplun, virkum efnunum er ekki blandað saman.	Athugið hvort tími og hitastig hafi verið rétt. Endurtakið prófið.
	Krossmengun samanburðarefna.	Píplið vandlega.
	Sjónferli er ekki hreint.	Athugið hvort óhreinindi eða loftbólur séu í brunnunum. Þurrkið botn plötunnar og lesið aftur.
	Samanburðarefni (jákvæð og/eða virk samanburðarefni) eru ekki rétt blönduð. Óviðeigandi útþynning á kvörðunarefni.	Athugið samanburðarefnin, leysið upp ný. Athugið lögunina og gerið nýja útþynningu.
<b>Allar niðurstöður úr prófunum neikvæðar.</b>	Einu eða fleiri virkum efnunum er ekki bætt við eða þeim bætt við í rangri röð.	Athugið verklagið aftur. Athugið hvort ónotuð virk efni séu til staðar. Endurtakið prófið.
	Plata húðuð með mótefnisvaka er óvirk.	Athugið hvort augljós merki um raka séu til staðar í ónotuðum brunnunum. Þurrkið botn plötunnar og lesið aftur.
	Sermi óvirkt.	Þynntu út ný sýni.
<b>Allir sýnabrunnar eru sýnilega gulir.</b>	Mengaðar jafnalausnir eða virk efni.	Athugið allar lausnir með tilliti til gruggs.
	Þvottalausn er menguð.	Notið hreint ílát. Athugið gæði vatns sem notað er við lögun lausnar.
	Óviðeigandi útþynning á sermi.	Endurtakið prófið.
<b>Lítill nákvæmni.</b>	Flæði mælípípu CV >5% eða sýni ekki blandað.	Athugið kvörðun mælípípu. Notist við aðferð sem hægt er að endurtaka. Forðist loftbólur í enda mælípípu.
	Sermi eða virkum efnunum er ekki blandað nægilega saman eða ekki komin í jafnvægi við stofuhita.	Blandið öllum virkum efnunum varlega en vandlega saman og látið þau ná jafnvægi við stofuhita.
	Það tekur of langan tíma að bæta við virkum efnunum, ósamræmi er til staðar hvað varðar tímasetningu.	Þróið samkvæma og samræmda aðferð og notið búnað með mörgum endum eða sjálfvirkan skammtara til að stytta tíma.
	Sjónferli ekki hreint.	Athugið hvort loftbólur séu í brunnunum. Þurrkið botn plötunnar og lesið aftur.
	Þvottur ekki í samræmi, loftbólur sem eru fastar, þvottalausn eftir í brunnunum.	Gakktu úr skugga um að allir brunnar séu fylltir og sogað sé jafnt út úr þeim. Setjið vökva í þannig að hann sé yfir stigi virkra efna í brunnunum. Eftir síðasta þvott skal tæma brunnana með því að banka á ræmuna á rakadrægri þurrku.

## 16. HEIMILDASKRÁ

- 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. J Immunol Methods. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. LÝSING Á TÁKNUM

Eftirfarandi tákn geta verið á umbúðum og merkingum:

	Lotukóði.
	Vörunúmer.
	Fyrningardagsetning.
	Hitastigsmörk.
	Líffræðileg hættu.
	Skoðið notkunarleiðbeiningar.
	Notkun fyrir In vitro greiningu.
	Framleiðandi.
	Inniheldur nóg fyrir 96 próf.
	Samræmt 98/79/EB um tilskipun um in vitro lækningatæki.
	Hætta gagnvart heilsu.

Ag	Mótefnavaki (húðuð plata).
DIL	Þynningarefni.
BUF WASH 30X	Þvottalausn, 30x styrkur.
CONTROL + LYO	Jákvætt samanburðarefni.
CONTROL AC LYO	Frostþurrkað virkt samanburðarefni.
CONTROL -	Neikvætt samanburðarefni.
CONJ	Blandprótínslausn.
SUBS pNPP	Ensímhvarfefni pNPP.
CH REP	Fulltrúi í Sviss.

## 18. SKJALASAGA

Útgáfa	Breytingar
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Meiriháttar ritstjórnarlegar breytingar með nýrri skjalaskipan. Verklagsreglur um hálfmegindega og eigindlega notkun hafa verið sameinaðar og sérstakar undirfyrirsagnir teknar upp þar sem við á.</p> <p>Upplýsingarnar „Greiningin skal framkvæmd af þjálfuðum sérfræðingum á rannsóknarstofum“.</p> <p>Upplýsingum um mælieiningarfræðilegan rekjanleika bætt við.</p> <p>Forskrift fyrir jákvætt samanburðarefni er breytt úr &gt;1 í &gt;1,0 til skýringar.</p> <p>Upplýsingum varðandi CO<sub>2</sub> skáp bætt við.</p>
LABEL-DOC-0031 útg. 7.0	<p>Aukið gagnsæi í kafla 14.1 um að fyrir hálfmegindega hlutann sé eðlilegt bil byggt á fræðilegum stærðfræðilegum útreikningi.</p> <p>Gildi í töflu 6 og 10 voru uppfærð til samræmis við virknimatíð sem birt var í útgáfu 5.0.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)

Istruzioni  
**WIESLAB<sup>®</sup> Complement system**  
Classical pathway  
Test qualitativo e semi-quantitativo

Per uso diagnostico in vitro

Immunoanalisi enzimatica per la valutazione della  
attività funzionale del complemento

- 96 pozzetti separabili in strisce per microtitolazione (12x8)
- Conservare il kit a +2–8 °C
- Conservare il controllo positivo a -20 °C



Doc. n. LABEL-DOC-0031 7.0

Data di efficacia: 22-Jan-2026

## 1. USO PREVISTO

Il WIESLAB® Complement system Classical pathway (CP) kit è un immunodosaggio enzimatico per la determinazione qualitativa e/o semi-quantitativa della via funzionale classica del complemento nel siero umano. L'analisi deve essere eseguita da personale professionale di laboratorio qualificato.

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

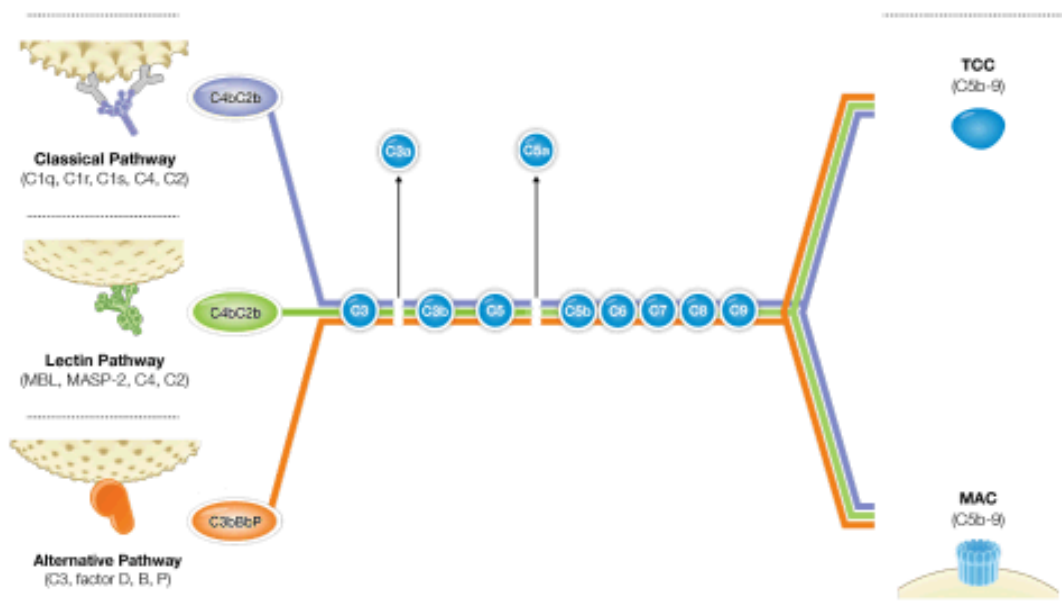
## 2. SOMMARIO E SPIEGAZIONE

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

Un'attività compromessa del complemento rende gli esseri umani soggetti a infezioni ripetute, fulminanti o gravi e può contribuire allo sviluppo di malattie autoimmuni.

Un'attivazione inopportuna del complemento contribuisce alle infiammazioni croniche e ai traumatismi tissutali.

L'attivazione *in vitro* della cascata del complemento porta al consumo dei componenti del complemento, il che provoca, a sua volta, una diminuzione della loro concentrazione. Pertanto, la determinazione delle proteine del complemento o dell'attività del complemento viene utilizzata per mostrare se il sistema del complemento è stato attivato da un meccanismo immunologico e/o patogeno. Per valutare i pazienti quando si sospetta una malattia che attiva il complemento, o quando è possibile un deficit ereditario, vengono utilizzate sia le misurazioni funzionali che quelle immunochimiche del complemento. La valutazione del livello di attività del complemento con analisi funzionali come i WIESLAB Complement kit, tiene conto della velocità di sintesi, della riduzione delle prestazioni e del consumo dei componenti e fornisce una misura dell'integrità delle vie, a differenza dei metodi immunochimici che misurano specificamente la concentrazione dei vari componenti del complemento.



**Figura 1:** Rappresentazione schematica del sistema del complemento. Il sistema del complemento può essere attivato tramite la via classica, la via della MBL (lectina) o la via alternativa da diverse molecole attivatrici. Dopo l'attivazione si formano C3 convertasi, che a loro volta clivano il C3; successivamente, può verificarsi il clivaggio anche del C5. Il clivaggio del C5 in C5b dà inizio alla formazione del complesso MAC (detto anche "complesso del complemento terminale" (TCC) o C5b-9).

### 3. PRINCIPIO DEL WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY

L'analisi WIESLAB® Complement system Classical pathway combina i principi dell'analisi emolitica per l'attivazione del complemento con l'uso di anticorpi marcati specifici per un neoantigene prodotto a seguito dell'attivazione del complemento. La quantità di neoantigene generata è proporzionale all'attività funzionale della via classica.

Nel Complement system Classical pathway kit, i pozzetti delle strisce per microtitolazione sono rivestiti con uno specifico attivatore della via classica. La piastra, in combinazione con la composizione del tampone di diluizione del campione e il livello di diluizione del siero del paziente, garantisce che venga attivata soltanto la via classica. Durante l'incubazione del siero diluito del paziente nei pozzetti, il complemento viene attivato dal rivestimento specifico.

I pozzetti vengono quindi lavati e la quantità di complesso C5b-9 formatosi sulla superficie della piastra viene rilevata con un anticorpo specifico marcato con fosfatasi alcalina contro il neoantigene C5b-9 formatosi durante la formazione del complesso di attacco alla membrana (MAC).

Dopo un'ulteriore fase di lavaggio, la rilevazione degli anticorpi specifici si ottiene mediante incubazione con una soluzione substrato per la fosfatasi alcalina. Il livello di attivazione del complemento è correlato all'intensità del colore e viene misurato in termini di assorbanza (densità ottica, OD).

#### Tracciabilità metrologica

Il valore assegnato al controllo positivo è definito come il 100% di un'attività normale della via del complemento e non è riconducibile alle unità SI. Viene assegnato utilizzando sieri umani normali aggregati, valutati con la procedura di analisi ELISA descritta, con un sistema di riferimento interno come livello gerarchico di calibrazione più alto.

### 4. AVVERTENZE, AVVISI E PRECAUZIONI

- PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.
- I componenti del siero umano utilizzati per la preparazione dei controlli inclusi nel kit sono stati testati per la presenza di anticorpi contro il virus dell'immunodeficienza umana 1 e 2 (HIV 1 e 2), l'epatite C (HCV) e l'antigene di superficie dell'epatite B mediante metodi approvati dalla FDA e sono risultati negativi. Poiché nessun metodo di test può offrire la certezza assoluta dell'assenza di HIV, HCV, virus dell'epatite B o altri agenti infettivi, i campioni e i reagenti di origine umana devono essere manipolati come potenziali cause di trasmissione di agenti infettivi.
- I Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health raccomandano di manipolare gli agenti potenzialmente infettivi al livello di biosicurezza 2.
- Tutte le soluzioni contengono ProClin 300 come conservante. Non pipettare mai con la bocca ed evitare che i reagenti o il campione del paziente entrino in contatto con la pelle. I reagenti contenenti ProClin possono essere irritanti. Evitare il contatto con la pelle e gli occhi. In caso di contatto, risciacquare abbondantemente con acqua.
- La scheda dati di sicurezza di tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit può essere richiesta a Svar Life Science.
- Non utilizzare i componenti dopo la data di scadenza.
- I reagenti del kit sono specifici del kit e non devono essere miscelati con reagenti di altri lotti di kit.
- Smaltire tutti i componenti utilizzati, i campioni utilizzati/rimanenti e i controlli rimanenti come rifiuti biologici pericolosi, in conformità alle normative locali. Smaltire gli altri componenti rimanenti come rifiuti pericolosi in conformità alle normative locali.
- Eventuali incidenti gravi verificatisi in relazione al presente dispositivo devono essere segnalati a Svar Life Science AB e all'autorità competente dello Stato membro dell'UE o del Paese dell'utilizzatore/del paziente.

Soluzione di lavaggio (conc. 30x)



### ATTENZIONE

**Contiene** Massa di reazione di: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] e 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 il prodotto nebulizzato.  
 P273 Non disperdere nell'ambiente.  
 P280 Indossare guanti protettivi.  
 P333 + P313 In caso di irritazione o eruzione cutanea: consultare un medico/chiedere assistenza medica.

Tampone di diluizione per CP, soluzione coniugata, controllo negativo, substrato pNPP

**EUH208** Contiene "Massa di reazione di: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] e 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)". Può provocare una reazione allergica.

**EUH210** Scheda di dati di sicurezza disponibile su richiesta.

## 5. CONTENUTO DEL KIT

- 1 piastra per microtitolazione sigillata con pozzetti separabili (12x8) rivestiti con IgM umana.
- 2 flaconcini (35 ml) di diluente per CP (Dil CP), etichettati in blu.
- 1 flaconcino (0,2 ml) di controllo negativo (NC) contenente siero umano (da diluire come un campione di siero del paziente).
- 1 flaconcino (0,2 ml) di controllo positivo (PC) contenente siero umano liofilizzato; vedere la sezione 9.3, "Ricostituzione del controllo positivo", di seguito.
- 1 flaconcino (per il volume, vedere il CoA) di controllo di attività (AC) per l'applicazione semi-quantitativa, contenente siero umano liofilizzato (di origine diversa rispetto al PC); vedere la sezione 9.3.1, "Ricostituzione del controllo di attività", nella procedura per l'applicazione semi-quantitativa.
- 1 flaconcino (13 ml) di coniugato contenente anticorpi marcati con fosfatasi alcalina contro il C5b-9 (colore blu).
- 1 flaconcino (13 ml) di soluzione substrato pNPP, pronta all'uso.
- 1 flaconcino (30 ml) di soluzione di lavaggio, concentrazione 30x.

**Nota:** il volume di ricostituzione dell'AC è indicato nel certificato di analisi (CoA) (XXX µl) e sull'etichetta dell'AC.

## 6. APPARECCHIATURE O MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Lettore per micropiastre con filtro 405 nm.
- Pipette di precisione con puntali monouso.
- Lavatrice per strisce, salviette assorbenti, provette e timer.
- Incubatrice in grado di mantenere una temperatura di 37 °C. Se si utilizza un armadio per CO<sub>2</sub>, assicurarsi che l'erogatore di CO<sub>2</sub> sia scollegato/spento.

## 7. MANIPOLAZIONE E CONSERVAZIONE

- I reagenti devono essere conservati a 2–8 °C, ad eccezione del controllo positivo e del controllo di attività.
- Tutti i reagenti inclusi nel kit sono pronti all'uso, ad eccezione della soluzione di lavaggio e dei controlli.
- I controlli positivo e di attività devono essere conservati a -20 °C fino alla loro ricostituzione.
- Il controllo positivo e il controllo di attività ricostituiti devono essere conservati a <-70 °C e possono essere scongelati una volta.

## 8. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Questo test viene eseguito su campioni di siero. I campioni di sangue devono essere raccolti utilizzando la tecnica asettica della venipuntura e il siero deve essere ottenuto utilizzando procedure standard. È consigliabile un minimo di 5 ml di sangue intero. Lasciare coagulare il sangue nelle provette per siero per 60–65 minuti a temperatura ambiente (20–25 °C). Centrifugare i campioni di sangue e trasferire il siero privo di cellule in una provetta pulita.

I sieri devono essere maneggiati correttamente per impedire l'attivazione del complemento in vitro. Per la conservazione per un periodo prolungato o per il trasporto su ghiaccio secco, i sieri devono essere congelati a una temperatura pari o inferiore a -70 °C in provette sigillate ermeticamente. I campioni non devono essere congelati e scongelati più di una volta.

Non utilizzare sieri itterici, lipemici ed emolizzati. Non è possibile utilizzare sieri inattivati termicamente. Il plasma non può essere utilizzato. Il Clinical and Laboratory Standards Institute fornisce raccomandazioni per la conservazione dei campioni di sangue (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. PREPARAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI REAGENTI

### 9.1. Preparazione della soluzione di lavaggio

Nel caso in cui si osservino cristalli di sale nel flaconcino con soluzione di lavaggio concentrata, porre il flaconcino a bagnomaria a 37 °C fino alla dissoluzione dei cristalli prima di diluire la soluzione di lavaggio.

Diluire 30 ml della soluzione di lavaggio con concentrazione 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.

### 9.2. Controllo negativo (NC)

Il controllo NC deve essere diluito come un campione di siero del paziente.

### 9.3. Ricostituzione del controllo positivo (PC)

Ricostituire il PC ossevando la seguente procedura:

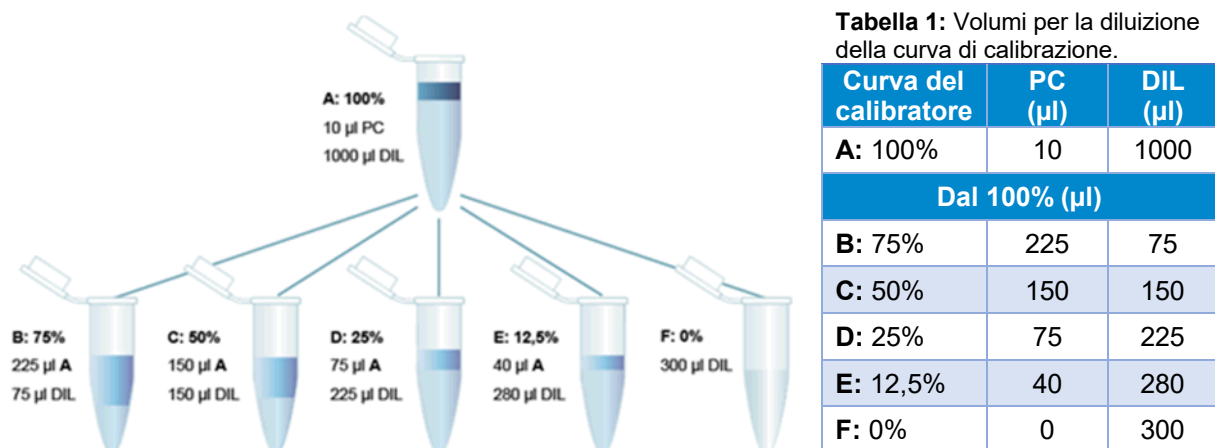
1. Premere delicatamente tutto il materiale liofilizzato sul fondo del flaconcino e rimuovere il tappo.
2. Aggiungere immediatamente 200 µl di acqua distillata direttamente al materiale liofilizzato.
3. Riapplicare il tappo.
4. Lasciare riposare il flaconcino su ghiaccio per 5 minuti, quindi agitare delicatamente o vortexare di tanto in tanto fino alla completa dissoluzione.
5. Per un'ulteriore diluizione, vedere le sezioni 9.3.1 o 9.3.2 per il protocollo semi-quantitativo e qualitativo, rispettivamente.

Il PC ricostituito può essere conservato fino a 4 ore prima dell'uso se conservato a 2–8 °C o su ghiaccio. Deve essere conservato a <-70 °C e può essere scongelato una volta.

### 9.3.1. Protocollo semi-quantitativo

#### Preparazione della curva di calibrazione

Per la diluizione del PC ricostituito nei calibratori, vedere la Figura 2 e la Tabella 1. Il calibratore può essere lasciato a temperatura ambiente fino a 1 ora prima dell'uso. Il calibratore deve essere preparato fresco e non può essere conservato per un uso successivo.



**Figura 2:** Schema di diluizione per la curva del calibratore. Il controllo positivo (PC) ricostituito viene miscelato con il diluente del kit (DIL) in base alla tabella.

#### Ricostituzione del controllo di attività (AC)

1. Premere delicatamente tutto il materiale liofilizzato sul fondo del flaconcino e rimuovere il tappo.
2. Aggiungere immediatamente il volume di acqua distillata indicato sull'etichetta del CoA/dell'AC direttamente al materiale liofilizzato.
3. Riapplicare il tappo.
4. Lasciare riposare il flaconcino su ghiaccio per 5 minuti, quindi agitare o vortexare delicatamente fino alla completa dissoluzione.
5. Diluire il controllo ricostituito nello stesso modo del campione di siero del paziente.

Il controllo di attività ricostituito può essere conservato fino a 4 ore prima dell'uso se conservato a 2–8 °C o su ghiaccio. Deve essere conservato a <-70 °C e può essere scongelato una volta.

### 9.3.2. Protocollo qualitativo

Diluire il controllo positivo ricostituito secondo le istruzioni della sezione 9.4: Diluizione dei campioni.

#### **9.4. Manipolazione del siero**

Scongelare parzialmente i sieri congelati immergendoli per poco tempo a bagnomaria a 37 °C, miscelando delicatamente. Dopo lo scongelamento parziale, posizionare immediatamente le provette su ghiaccio e lasciarvele fino al completo scongelamento. Miscelare per poco tempo con un mixer vortex.

#### **Diluizione dei campioni**

Diluire il siero 1/101 con diluente per CP, etichettato in blu, (500 µL di diluente + 5 µL di siero) e miscelare accuratamente, ma delicatamente, su un vortex. Il siero diluito può essere lasciato a temperatura ambiente per un massimo di 60 minuti prima dell'analisi.

## 10. PROCEDURA DI ANALISI

### 10.1. Protocollo di risciacquo

Svuotare i pozzetti e lavare 3 volte con 300 µl di soluzione di lavaggio, riempiendo e svuotando i pozzetti ogni volta. Dopo l'ultimo lavaggio, svuotare i pozzetti picchiando la striscia su una salvietta assorbente.

### 10.2. Layout della piastra

#### 10.2.1. Protocollo semi-quantitativo

Pipettare 100 µl per pozzetto, in duplicato, di calibratore (100% – 0%), NC, AC e campioni di siero diluiti (P) in base alla Tabella 2. Il calibratore 0% deve essere utilizzato come bianco.

**Tabella 2:** Layout della piastra suggerito, protocollo semi-quantitativo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
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										

#### 10.2.2. Protocollo qualitativo

Pipettare 100 µl per pozzetto, in duplicato, di diluente utilizzato come bianco, PC, NC e campioni di siero diluiti (P) in base alla Tabella 3.

**Tabella 3:** Layout della piastra suggerito, protocollo qualitativo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dil CP	P2										
B	Dil CP	P2										
C	PC	ecc.										
D	PC											
E	NC											
F	NC											
G	P1											
H	P1											

### 10.3. Protocollo di analisi

Rimuovere solo il numero di pozzetti necessari per il test, risigillando con cura la confezione di alluminio. Attendere che tutte le soluzioni raggiungano la temperatura ambiente (20–25 °C) prima dell'analisi.

#### 1. Incubazione dei campioni

Riempire la piastra come indicato nella sezione 10.2. Incubare per 60–70 minuti a +37 °C con coperchio di protezione. Non eseguire mai le incubazioni in atmosfera contenente CO<sub>2</sub>. Se si utilizza un armadio per CO<sub>2</sub>, assicurarsi che l'erogatore di CO<sub>2</sub> sia scollegato/spento.

#### 2. Lavaggio

Lavare la piastra come indicato nella sezione 10.1: Protocollo di risciacquo.

#### 3. Incubazione in coniugato

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

#### 4. Lavaggio

Lavare 3 volte come prima.

#### 5. Incubazione del substrato

Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato a ciascun pozzetto e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (+20–25 °C).

#### 6. Lettura della piastra

Leggere l'assorbanza (OD) a 405 nm su un lettore per micropiastre.

Facoltativo: come soluzione di arresto si può utilizzare EDTA 5 mM, 100 µl/pozzetto. Leggere l'assorbanza dei pozzetti entro 60 minuti.

## 11. CONTROLLO DI QUALITÀ

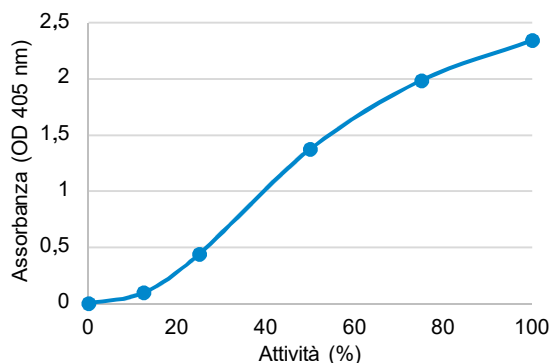
Il certificato di analisi (CoA) incluso nel kit è specifico per ogni lotto e deve essere utilizzato per verificare i risultati ottenuti dal nostro laboratorio. I risultati indicati nel CoA devono essere utilizzati solo come linee guida. I risultati ottenuti dal proprio laboratorio potrebbero differire.

L'OD del PC dovrebbe essere >1,0 e l'OD dell'NC dovrebbe essere <0,2 dopo la sottrazione del bianco (Dil CP, 0%). Se uno qualsiasi dei controlli non rientra nel rispettivo intervallo, il test deve essere considerato non valido e quindi ripetuto.

## 12. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

### 12.1. Protocollo semi-quantitativo

Sottrarre l'assorbanza del calibratore 0% da tutti i valori OD. Si consiglia un adattamento della curva logistica a 4 parametri (Marquardt). Un esempio di curva standard è riportato nella Figura 3.



**Figura 3:** Esempio di curva standard. La figura in alto mostra un esempio di curva standard semi-quantitativa e non deve essere utilizzata per l'interpretazione dei campioni dei pazienti effettivi.

Nei casi in cui i valori del campione ottenuti siano superiori al calibratore 100% (più alto), i campioni possono essere diluiti (1/201) e rianalizzati. Nota: in questo caso, il valore di attività ottenuto deve essere corretto in base alla diluizione del campione applicata.

È consigliabile che ogni laboratorio stabilisca il proprio livello di riferimento e il proprio valore di cut-off per i deficit.

## 12.2. Protocollo qualitativo

Si consiglia di utilizzare i risultati relativi all'OD per calcolare i valori dell'attività del complemento (% di PC) per facilitare l'interpretazione. Questo calcolo facilita anche il confronto tra diverse analisi perché l'OD è più soggetto a variazioni da un'analisi all'altra. Di seguito viene descritto il metodo utilizzato per calcolare l'attività del complemento.

1. Sottrarre l'assorbanza del bianco (diluente) dalle assorbanze dell'NC, del PC e dei campioni.
2. Calcolare i valori medi dell'OD per l'NC, il PC e i campioni.
3. Calcolare l'attività del complemento utilizzando la formula seguente:

$$\text{Attività del complemento (\% di PC)} = \frac{\text{Campione} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

L'NC e il PC servono a monitorare eventuali difetti sostanziali dei reagenti. Il PC non garantisce la precisione del valore di cut-off dell'analisi. È consigliabile che ogni laboratorio stabilisca il proprio livello di riferimento e il proprio valore di cut-off per i deficit.

Un risultato negativo, ossia un deficit, deve sempre essere verificato analizzando un nuovo campione per accertarsi che non si sia verificata un'attivazione involontaria del complemento *in vitro* prima dell'esecuzione del test.

## 13. CRITERI DI VALUTAZIONE

### 13.1. Risultati attesi

Quando si riscontrano bassi livelli di componenti del complemento o della sua funzione, i medici prendono in considerazione un deficit o un processo immunologico in corso che porta a una maggiore riduzione delle prestazioni dei componenti e a una maggiore riduzione dei livelli del complemento. Di solito, l'aumento dei livelli del complemento è un'espressione specifica di una risposta in fase acuta.

Il WIESLAB® Complement system Classical pathway kit può essere utile per rilevare i deficit del complemento correlati alla via classica. Una valutazione funzionale più completa e approfondita di tutte e tre le vie del complemento può essere ottenuta utilizzando il WIESLAB® Complement system Screen kit, come mostrato nella Tabella 4.

**Tabella 4:** Combinazione dei risultati relativi alle varie vie e possibili deficit.

Via classica	Via della MBL	Via alternativa	Possibile deficit
Positivo	Positivo	Positivo	Nessuno
Negativo	Positivo	Positivo	C1q, C1r, C1s
Positivo	Positivo	Negativo	Fattori B, D e P
Positivo	Negativo	Positivo	MBL, MASP-2
Negativo	Negativo	Negativo	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativo	Negativo	Positivo	C4, C2 o loro combinazione

## 13.2. Limiti

Il livello del complemento del singolo paziente non può essere utilizzato come misura della gravità della malattia perché questo valore può variare da paziente a paziente. Pertanto, è difficile raggiungere una standardizzazione assoluta dei risultati.

Il test non deve essere utilizzato come unica base per le decisioni relative alla terapia clinica, ma deve essere valutato in combinazione con i sintomi clinici e i risultati degli altri test disponibili. La terapia non deve essere iniziata sulla base del risultato del test del complemento. L'inizio o la modifica del trattamento non deve basarsi esclusivamente sulle variazioni dei livelli del complemento, ma su un'attenta osservazione clinica.

## 14. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

### 14.1. Prestazione clinica

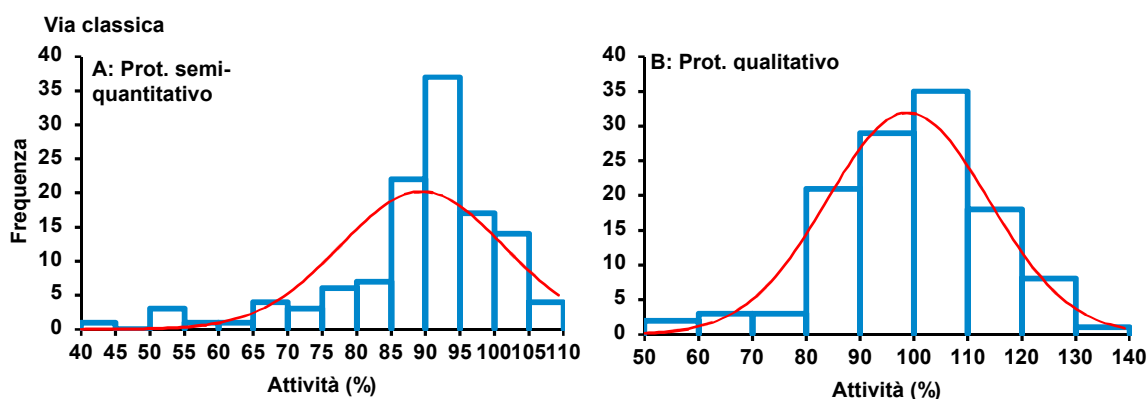
La distribuzione normale entro il parametro 2SD (deviazione standard) è indicata nella Figura 4 e nella Tabella 5. I risultati all'interno di questo intervallo indicano una funzionalità normale della via classica. È consigliabile che ogni laboratorio confermi o stabilisca il proprio intervallo di riferimento per la popolazione assistita.

Un valore al di sotto degli intervalli di riferimento indica una maggiore attivazione, con un conseguente consumo della capacità della via classica del complemento, oppure una bassa attività determinata geneticamente.

Valori inferiori al 5% suggeriscono fortemente un deficit completo causato da un'attivazione eccessiva o un deficit ereditario nella via interessata. Per stabilire quali fattori del complemento causano una ridotta attività sono necessarie ulteriori analisi delle proteine del complemento.

Un risultato negativo, ossia un sospetto di deficit, deve sempre essere verificato analizzando un nuovo campione manipolato attentamente per accertarsi che non si sia verificata un'attivazione involontaria del complemento *in vitro*.

I sieri di 120 donatori di sangue apparentemente sani sono stati analizzati con WIESLAB® Complement system Classical pathway, applicazione qualitativa. Per l'applicazione semi-quantitativa, l'intervallo normale si basa su calcoli matematici teorici. L'attività del complemento dei 120 donatori di sangue apparentemente sani è riepilogata nella Figura 4 e nella Tabella 5. Nello studio nessun donatore di sangue era al di sotto del 40%.



**Figura 4:** Istogramma della popolazione di riferimento per l'analisi della via classica, con protocollo semi-quantitativo (A) e qualitativo (B), rispettivamente.

**Tabella 5:** Valori per i 120 donatori di sangue analizzati con protocollo semi-quantitativo e qualitativo, rispettivamente.

Protocollo	n	Valore medio (%)	±2SD (%)	Valore mediano (%)
<b>Prot. semi-quantitativo</b>	120	89	66–113*	92
<b>Prot. qualitativo</b>	120	99	69–129*	100

\*) Questo è un calcolo statistico e non garantisce un effettivo valore di cut-off. È consigliabile che ogni laboratorio stabilisca il proprio livello di riferimento e il proprio valore di cut-off per il sospetto di deficit.

Il test ha analizzato sieri con deficit noti del complemento e sieri con impoverimento di specifici fattori del complemento (Tabelle 6 e 7). Tutti i sieri carenti/impoveriti presentavano risultati di analisi bassi e fornivano valori inferiori al 15% e al 5%\*\* per i protocolli semi-quantitativo e qualitativo, rispettivamente.

\*\*\*) 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 estes dei campioni di pazienti con deficit analizzati con l'applicazione qualitativa.

**Tabella 6:** Campioni con deficit noti.

Deficit	C2	C3	C4	C5	C7	C8
<b>Numero di pazienti</b>	5	1	1	1	2	2
<b>Numero di sieri con deficit rilevati</b>	5	1	1	1	2	2

**Tabella 7:** Campioni con componenti impoveriti.

Impoverimento	C1q	C3	C4	C5	C7
<b>Numero di sieri impoveriti</b>	2	1	1	1	1
<b>Numero di casi di impoverimento rilevati</b>	2	1	1	1	1

## 14.2. Precisione

### 14.2.1. Precisione inter-analisi

#### Protocollo semi-quantitativo

**Tabella 8:** La precisione inter-analisi dell'applicazione semi-quantitativa è stata determinata analizzando sette campioni in otto replicati in tre diverse occasioni.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Valore medio %</b>	71	73	69	72	25	35	31
<b>SD</b>	9	9	6	11	1	2	2
<b>CV%</b>	13%	13%	9%	15%	4%	5%	5%

#### Protocollo qualitativo

**Tabella 9:** La precisione inter-analisi dell'applicazione qualitativa è stata determinata analizzando tre campioni in triplicato. Sono stati ottenuti risultati per sei diverse analisi.

	1	2	3
<b>Valore medio %</b>	98	92	21
<b>SD</b>	4,3	3,9	1,7
<b>CV%</b>	4	4	8

### 14.2.2. Precisione intra-analisi

#### Protocollo semi-quantitativo

**Tabella 10:** La precisione intra-analisi dell'applicazione semi-quantitativa è stata determinata analizzando sette diversi campioni in otto replicati in una occasione.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Valore medio %</b>	79	76	72	83	24	34	30
<b>SD</b>	10	11	6	9	0	1	1
<b>CV%</b>	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

#### Protocollo qualitativo

**Tabella 11:** La precisione intra-analisi dell'applicazione qualitativa è stata determinata analizzando un campione in 40 pozzetti.

Analisi	Valore medio %	SD	CV%
<b>CP</b>	85	2,9	3

### 14.2.3. Variazione da lotto a lotto

#### Protocollo semi-quantitativo

**Tabella 12:** La variazione da lotto a lotto nell'applicazione semi-quantitativa è stata determinata analizzando sette campioni in duplicato su tre lotti diversi di tre persone diverse.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Valore medio %</b>	8	73	85	24	37	74	78
<b>SD</b>	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
<b>CV%</b>	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

### 14.3. Linearità

#### Protocollo semi-quantitativo

**Tabella 13:** Il recupero della diluizione è stato determinato analizzando cinque diluizioni seriali per tre campioni diversi.

Campione	Diluizione	Attività media misurata (%)	Attività teorica (%)	Recupero % corretto della diluizione
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
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

### 14.4. Limite di rilevamento

#### Protocollo semi-quantitativo

**Intervallo di misurazione del calibratore:** 12,5%–100 %

**Limite di rilevamento (LoD) = 8%**

## 15. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI









PROBLEMA	POSSIBILI CAUSE	SOLUZIONE
<b>Valori di controllo fuori intervallo.</b>	Temperatura, tempi o pipettaggio non corretti, reagenti non miscelati.	Controllare che l'ora e la temperatura siano corrette. Ripetere il test.
	Contaminazione crociata dei controlli.	Pipettare con attenzione.
	Il percorso ottico non è pulito.	Controllare che i pozzetti non contengano sporco o bolle d'aria. Pulire il fondo della piastra e rieseguire la lettura.
	I controlli (positivi e/o di attività) non sono stati ricostituiti correttamente. Diluizione non corretta del calibratore.	Controllare i controlli, disciogliere un controllo nuovo. Controllare la preparazione ed effettuare una nuova diluizione.
<b>Tutti i risultati dei test sono negativi.</b>	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti nell'ordine sbagliato.	Ricontrollare la procedura. Controllare che non vi siano reagenti inutilizzati. Ripetere il test.
	La piastra rivestita con antigene è inattiva.	Controllare che nei pozzetti inutilizzati non vi sia umidità evidente. Pulire il fondo della piastra e rieseguire la lettura.
	Siero inattivo.	Diluire nuovi campioni.
<b>Tutti i pozzetti dei campioni sono visibilmente gialli.</b>	Tamponi o reagenti contaminati.	Controllare tutte le soluzioni per verificare se sono torbide.
	La soluzione di lavaggio è contaminata.	Utilizzare un contenitore pulito. Controllare la qualità dell'acqua utilizzata per la preparazione della soluzione.
	Diluizione non corretta del siero.	Ripetere il test.
<b>Scarsa precisione.</b>	CV >5% erogato dalla pipetta o campioni non miscelati.	Controllare la calibrazione della pipetta. Utilizzare tecniche riproducibili. Evitare la formazione di bolle d'aria nel puntale della pipetta.
	Il siero o i reagenti non sono sufficientemente miscelati o non sono equilibrati a temperatura ambiente.	Miscelare tutti i reagenti delicatamente ma accuratamente ed equilibrare a temperatura ambiente.
	L'aggiunta di reagente richiede troppo tempo, incoerenza negli intervalli di temporizzazione.	Sviluppare una tecnica uniforme e coerente e utilizzare un dispositivo multi-puntale o un erogatore automatico per ridurre i tempi.
	Percorso ottico non pulito.	Controllare la presenza di bolle d'aria nei pozzetti. Pulire il fondo della piastra e rieseguire la lettura.
	Lavaggio incoerente, bolle intrappolate, soluzione di lavaggio rimasta nei pozzetti.	Controllare che tutti i pozzetti vengano riempiti e aspirati in modo uniforme. Dispensare il liquido sopra il livello del reagente nel pozzetto. Dopo l'ultimo lavaggio, svuotare i pozzetti picchiando la striscia su una salvietta assorbente.




## 16. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. J Immunol Methods. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. DESCRIZIONE DEI SIMBOLI

Sulla confezione e sull'etichetta possono essere presenti i seguenti simboli:

	Codice lotto.
	Numero di catalogo.
	Data di scadenza.
	Limite di temperatura.
	Rischio biologico.
	Consultare le istruzioni per l'uso.
	Uso diagnostico in vitro.
	Fabbricante.

	Contiene materiale sufficiente per 96 test.
	Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.
	Pericolo per la salute.

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Ag</div>	Antigene (piastra rivestita).
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DIL</div>	Diluente.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BUF</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">WASH</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">30X</div>	Tampone di lavaggio, concentrazione 30x.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">+</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">LYO</div>	Controllo positivo.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">AC</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">LYO</div>	Controllo di attività liofilizzato.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">-</div>	Controllo negativo.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONJ</div>	Coniugato.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">SUBS</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">pNPP</div>	Substrato pNPP.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CH</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">REP</div>	Rappresentante per la Svizzera.

**18. CRONOLOGIA DEL DOCUMENTO**

<b>Versione</b>	<b>Modifiche</b>
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Importanti modifiche editoriali con nuovo layout del documento. Le procedure per le applicazioni semi-quantitativa e qualitativa sono state unite e, laddove possibile, sono stati introdotti sottotitoli separati.</p> <p>Aggiunta l'informazione "L'analisi deve essere eseguita da personale professionale di laboratorio qualificato".</p> <p>Aggiunte informazioni relative alla tracciabilità metrologica.</p> <p>La specifica per il controllo positivo è stata modificata da &gt;1 in &gt;1,0 per una maggiore chiarezza.</p> <p>Aggiunte informazioni relative all'armadio per CO<sub>2</sub>.</p>
LABEL-DOC-0031 v 7.0	<p>Maggiore trasparenza nella sezione 14.1, in cui si afferma che i dati semi-quantitativi si basano su calcoli matematici teorici.</p> <p>I valori nelle Tabelle 6 e 10 sono stati aggiornati per corrispondere alla valutazione delle prestazioni pubblicata nella versione 5.0.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)

Bruksanvisning  
**WIESLAB<sup>®</sup> Complement system**  
Classical pathway  
Kvalitativ og semi-kvantitativ test

Til in vitro-diagnostisk bruk

Enzymimmunanalyse for bestemmelse av  
funksjonell komplementaktivitet

- Ta fra hverandre mikrotitreringsstrips (12 x 8), 96 brønner
- Oppbevar settet ved +2–8 °C
- Oppbevar den positive kontrollen og aktivitetskontrollen ved -20 °C



Dok.nr. LABEL-DOC-0031 7.0  
Ikraftredelsesdato: 22-Jan-2026

## 1. TILTENKT BRUK

Settet WIESLAB® Complement system Classical pathway (CP) er en enzymimmunanalyse for kvalitativ og/eller semi-kvantitativ bestemmelse av funksjonell, klassisk komplementvei i humant serum. Analysen skal utføres av utdannet laboratoriepersonell.

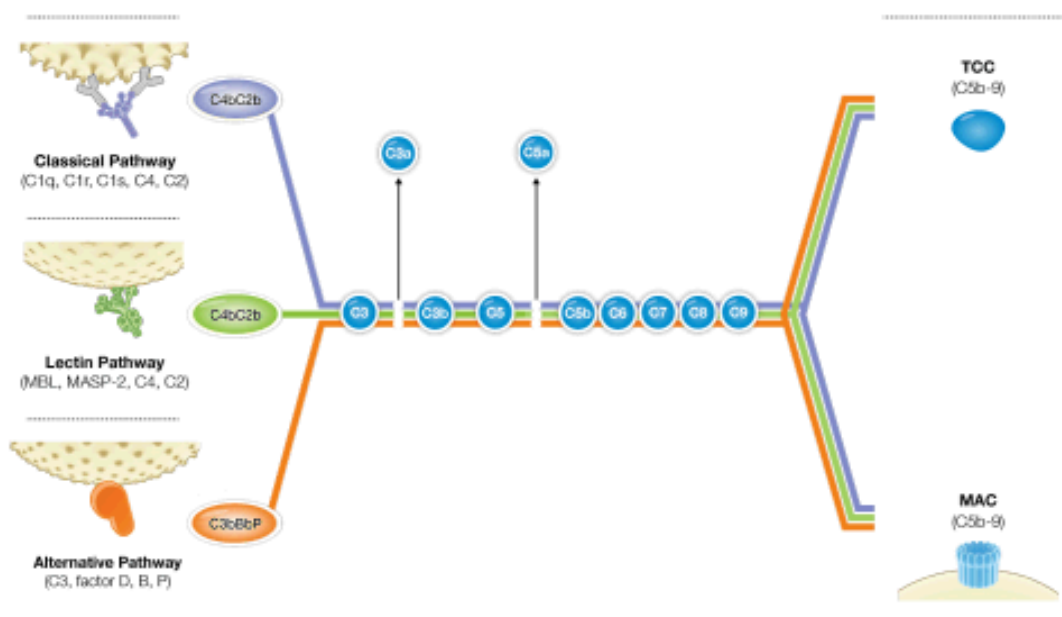
TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK.

## 2. SAMMENDRAG OG FORKLARING

Komplementsystemet spiller en viktig rolle ved kroniske og autoimmune sykdommer samt infeksjonssykdommer. Det er tre veier for komplementaktivering (figur 1), nemlig den klassiske veien, MBL-veien (lektin) og den alternative veien.

Nedsatt komplementaktivitet fører til at personer blir utsatt for gjentatte fulminante eller alvorlige infeksjoner, og kan bidra til utvikling av autoimmun sykdom. U hensiktsmessig aktivering av komplement bidrar til kronisk betennelse og vevsskade.

*In vitro*-aktivering av komplementkaskaden fører til forbruk av komplementkomponenter, som igjen fører til en reduksjon i konsentrasjonen av komponenter. Bestemmelse av komplementproteiner eller komplementaktivitet blir derfor brukt for å indikere om komplementsystemet har blitt aktivert av en immunologisk og/eller patogen mekanisme. Både funksjonelle og immunkjemiske komplementmålinger brukes til å evaluere pasienter når det er mistanke om en komplementaktiverende sykdom eller en arvelig defekt. Nivået av komplementaktivitet som evalueres ved funksjonelle analyser, f.eks. WIESLAB Complementsettene, tar hensyn til syntesens hastighet, nedbrytning og forbruk av komponenter og gir et mål på veienes integritet i motsetning til immunkjemiske metoder, som spesifikt måler konsentrasjonen av forskjellige komplementkomponenter.



**Figur 1:** Skjematisk figur av komplementsystemet. Komplementsystemet kan aktiveres via den klassiske veien, MBL-veien (lektin), eller den alternative veien av forskjellige aktiverende molekyler. Ved aktivering dannes C3-konvertaser som igjen spalter C3, og deretter kan C5 spaltes. Spaltning av C5 til C5b initierer dannelsen av MAC-komplekset (også kalt terminalt komplementkompleks (TCC) eller C5b-9).

### 3. PRINSIPPET FOR WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY

Analysen WIESLAB® Complement system Classical pathway kombinerer prinsippene ved hemolytisk analyse for komplementaktivering med bruken av merkede antistoffer som er spesifikke for et neoantigen som produseres som et resultat av komplementaktivering. Mengden neoantigen som genereres, er proporsjonal med den funksjonelle aktiviteten i den klassiske veien.

I Complement system Classical pathway-settet er brønnene på mikrotitreringsstripsene belagt med en spesifikk aktivator for den klassiske veien. Platen i kombinasjon med sammensetningen av prøvefortynningsbufferen og fortynningsnivået for pasientserumet sikrer at bare den klassiske veien aktiveres. Under inkubasjonen av det fortyndede pasientserumet i brønnene aktiveres komplementet av det spesifikke belegget.

Brønnene blir deretter vasket, og mengden av C5b-9-kompleks som dannes på plateoverflaten, påvises med et spesifikt alkalisk fosfatasemerket antistoff mot C5b-9-neoantigenet som dannes under formasjonen av Membrane Attack Complex (membranangrepskomplekset – MAC).

Etter et ytterligere vasketrinn oppnås påvisning av spesifikke antistoffer ved inkubering med alkalisk fosfatase-substratløsning. Mengden av komplementaktivering samsvarer med fargeintensiteten og måles i form av absorbans (optisk tetthet – OD).

#### Metrologisk sporbarhet

Verdien som er tilordnet den positive kontrollen, er definert som 100 % av normal komplementveiaktivitet og kan ikke spores til SI-enheter. Den tilordnes ved å bruke sammenslåtte humane normale sera vurdert med den beskrevne ELISA-analyseprosedyren med et internt referansesystem som høyeste nivå i kalibreringshierarkiet.

### 4. ADVARSLER, FORSIKTIGHETSREGLER OG FORHOLDSREGLER

- TIL *IN VITRO*-DIAGNOSTISK BRUK.
- De humane serumkomponentene som er brukt i klargjøringen av kontrollene i settet, er testet for tilstedeværelse av antistoffer mot humant immunsviktvirus 1 og 2 (HIV 1 og 2), hepatitt C (HCV) samt hepatitt B-overflateantigen ved FDA-godkjente metoder, og resultatet var negativt. Etersom ingen testmetoder kan gi fullstendig sikkerhet for at HIV, HCV, hepatitt B-virus eller andre smittestoffer er fraværende, skal prøver og humanbaserte reagenser håndteres som om de kan overføre smittestoffer.
- Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health i USA anbefaler at potensielt smittefarlige stoffer håndteres på biosikkerhetsnivå 2.
- Alle løsninger inneholder ProClin 300 som konserveringsmiddel. Pipetter aldri med munnen, og la aldri reagenser eller pasientprøver komme i kontakt med huden. Reagenser som inneholder ProClin, kan være irriterende. Unngå kontakt med hud og øyne. Ved kontakt, skyll med store mengder vann.
- Sikkerhetsdatablad for alle farlige komponenter i dette settet er tilgjengelig på forespørsel fra Svar Life Science.
- Ikke bruk komponenter etter utløpsdatoen.
- Reagenser i settene er spesifikke for det aktuelle settet, og reagenser fra ulike partier skal ikke blandes.
- Kast alle brukte komponenter, brukte prøver, rester av prøver og restkontroller som farlig biologisk avfall i henhold til lokale forskrifter. Andre rester av komponenter skal kastes som farlig avfall i henhold til lokale forskrifter.
- Alle alvorlige hendelser som oppstår i forbindelse med denne enheten, skal rapporteres til Svar Life Science AB og pågjeldende myndighet i EU-medlemsstaten eller landet der brukeren/pasienten befinner seg.

Vaskeløsning (30x kons.)



#### ADVARSEL

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

H317 Kan forårsake en allergisk hudreaksjon.  
 H412 Skadelig for vannlevende organismer med langvarige effekter.  
 P261 Unngå innånding av spraytåke.  
 P273 Unngå utslipp i miljøet.  
 P280 Bruk vernehansker.  
 P333 + P313 Ved hudirritasjon eller utslett: Søk legehjelp.

Fortynningsbuffer CP, konjugatløsning, negativ kontroll, substrat pNPP

EUH208 Inneholder «Reaksjonsmasse av: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] og 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)». Kan gi en allergisk reaksjon.

EUH210 Sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på forespørsel.

## 5. INNHOLD I SETTET

- 1 forseglet mikrotitreringsplate med delte brønner (12 x 8) belagt med humant IgM.
- 2 hetteglass (35 ml) Diluent CP (Dil CP), merket blått.
- 1 hetteglass (0,2 ml) negativ kontroll (NC) som inneholder humant serum (skal fortynnes som for en pasientserumprøve).
- 1 hetteglass (0,2 ml) positiv kontroll (PC) som inneholder lyofilisert humant serum, se avsnitt 9.3 «Rekonstituering av positiv kontroll» nedenfor.
- 1 hetteglass (vol., se CoA) aktivitetskontroll (AC) for semi-kvantitativ anvendelse, inneholdende lyofilisert humant serum (annen opprinnelse enn PC), se avsnitt 9.3.1 «Rekonstituering av aktivitetskontroll» under prosedyren for semi-kvantitativ anvendelse.
- 1 hetteglass (13 ml) konjugat som inneholder alkalisk fosfatase-merkede antistoffer mot C5b-9 (blå farge).
- 1 hetteglass (13 ml) substratløsning pNPP, klar til bruk.
- 1 hetteglass (30 ml) vaskeløsning, 30x konsentrert.

**NB:** Rekonstitusjonsvolumet for AC er angitt i analysesertifikatet (CoA) (XXX µl) og på AC-etiketten.

## 6. PÅKREVD MATERIALER ELLER UTSTYR SOM IKKE FØLGER MED

- Mikroplateleser med filter på 405 nm.
- Presisjonspipetter med engangsspisser.
- Vaskemaskin for strips, absorberende materiale, rør og en tidtaker.
- Inkubator som kan holde 37 °C. Hvis du bruker et CO<sub>2</sub>-skap, må du sørge for at CO<sub>2</sub>-tilførselen er frakoblet eller avslått.

## 7. HÅNDTERING OG OPPBEVARING

- Reagensene skal oppbevares ved 2–8 °C bortsett fra den positive kontrollen og aktivitetskontrollen.
- Alle reagenser i settet er klare til bruk, bortsett fra vaskeløsningen og kontrollene.
- Den positive kontrollen og aktivitetskontrollen skal oppbevares ved -20 °C fram til rekonstituering.

- Den rekonstituerte positive kontrollen og aktivitetskontrollen skal oppbevares ved  $< -70$  °C og kan tines én gang.

## 8. PRØVEKLARGJØRING

Denne testen utføres på serumprøver. Blodprøver skal tas ved hjelp av aseptisk venepunksjon og serum innhentes ved hjelp av standardprosedyrer. Minst 5 ml fullblod anbefales. 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 riktig for å forhindre *in vitro* komplementaktivering. Sera skal fryses ved  $-70$  °C eller lavere i tett forseglede rør for oppbevaring over lengre tid eller for transport på tørris. Prøver skal ikke fryses og tines mer enn én gang.

Ikke bruk sera som er ikterisk, lipemisk og hemolysert. Varmeinaktiverte sera kan ikke brukes. Plasma kan ikke brukes. Clinical and Laboratory Standards Institute gir anbefalinger for oppbevaring av blodprøver (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. KLARGJØRING OG HÅNTERING AV REAGENSER

### 9.1. Klargjøring av vaskeløsning

Hvis det observeres saltkrystaller i hetteglasset med konsentrert vaskeløsning, må hetteglasset plasseres 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. Fortynnet vaskeløsning som oppbevares ved 2–8 °C, er stabil frem til utløpsdatoen for settet.

### 9.2. Negativ kontroll (NC)

NC skal fortynnes som en pasientserumprøve.

### 9.3. Rekonstituering av positiv kontroll (PC)

Rekonstituer PC i henhold til følgende prosedyre:

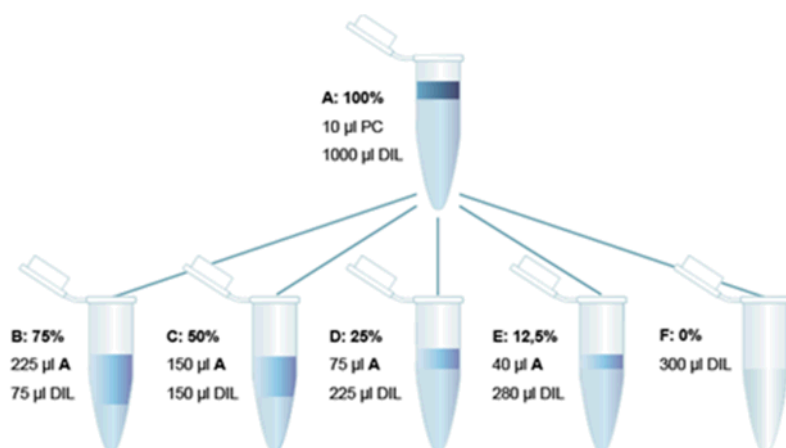
1. Bank forsiktig ned alt lyofilisert materiale til bunnen av hetteglasset, og fjern lokket.
2. Tilsett umiddelbart 200 µl destillert vann direkte i det lyofiliserte materialet.
3. Sett på lokket igjen.
4. La hetteglasset stå på is i 5 minutter, og rist det deretter forsiktig eller roter av og til helt til alt er fullstendig oppløst.
5. For ytterligere fortynning, se avsnitt 9.3.1 eller 9.3.2 for henholdsvis semi-kvantitativ og kvalitativ protokoll.

Den rekonstituerte PC kan oppbevares i opptil 4 timer før bruk hvis den oppbevares ved 2–8 °C eller på is. Den skal oppbevares ved  $< -70$  °C og kan tines én gang.

#### 9.3.1. Semi-kvantitativ protokoll

##### Utarbeidelse av kalibreringskurve

For fortynning av rekonstituert PC til kalibratorer, se figur 2 og tabell 1. Kalibratoren kan stå i romtemperatur opptil 1 time før bruk. Kalibratoren må tilberedes fersk og kan ikke lagres for senere bruk.



**Tabell 1:** Volumer for fortynning av kalibreringskurven.

Kalibrator-kurve	PC (µl)	DIL (µl)
A: 100 %	10	1000
Fra 100 % (µl)		
B: 75 %	225	75
C: 50 %	150	150
D: 25 %	75	225
E: 12,5 %	40	280
F: 0 %	0	300

**Figur 2:** Fortynningsskjema for kalibratorkurve. Rekonstituert positiv kontroll (PC) blandes med fortynningsmiddel (DIL) i henhold til tabellen.

### Rekonstituering av aktivitetskontroll (AC)

1. Bank forsiktig ned alt lyofilisert materiale til bunnen av hetteglasset, og fjern lokket.
2. Tilsett umiddelbart volumet destillert vann som er angitt på CoA/AC-etiketten, direkte i det lyofiliserte materialet.
3. Sett på lokket igjen.
4. La hetteglasset stå på is i 5 minutter, og rist eller roter det deretter forsiktig helt til alt er fullstendig oppløst.
5. Fortynn den rekonstituerte kontrollen på samme måte som en pasientserumprøve.

Den rekonstituerte aktivitetskontrollen kan oppbevares i opptil 4 timer før bruk hvis den oppbevares ved 2–8 °C eller på is. Den skal oppbevares ved <-70 °C og kan tines én gang.

### 9.3.2. Kvalitativ protokoll

Fortynn den rekonstituerte positive kontrollen i henhold til instruksjonene i avsnitt 9.4: Fortynning av prøver.

### 9.4. Håndtering av serum

La frosne sera tine delvis ved å plassere dem en kort stund i et vannbad på 37 °C og blande forsiktig. Når de er delvis tint, plasser du rørene umiddelbart på is og lar dem stå til de er helt tint. Bland dem raskt med en vortex-mikser.

### Fortynning av prøver

Fortynn serumet 1/101 med Diluent CP, blå etikett, (500 µl Diluent + 5 µl serum), og bland grundig men forsiktig på en vortex. Det fortyndede serumet kan stå i romtemperatur i maksimalt 60 minutter før analyse.

## 10. ANALYSEPROSEDYRE

### 10.1. Skulleprotokoll

Tøm brønnene, og vask dem 3 ganger med 300 µl vaskeløsning. Fyll og tøm brønnene hver gang. Etter siste vask tømmer du brønnene ved å banke stripsen mot absorberende materiale.

### 10.2. Plateoppsett

#### 10.2.1. Semi-kvantitativ protokoll

Pipetter 100 µl/brønn i duplikat av kalibratoren (100 %–0 %), NC, AC og fortynnede serumprøver (P) i henhold til tabell 2. 0 %-kalibratoren skal brukes som blankprøve.

**Tabell 2:** Foreslått plateoppsett for semi-kvantitativ protokoll.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100 %	12,5 %	P1									
<b>B</b>	100 %	12,5 %	P1									
<b>C</b>	75 %	0 %	P2									
<b>D</b>	75 %	0 %	P2									
<b>E</b>	50 %	NC	etc									
<b>F</b>	50 %	NC										
<b>G</b>	25 %	AC										
<b>H</b>	25 %	AC										

#### 10.2.2. Kvalitativ protokoll

Pipetter 100 µl/brønn i duplikat av Diluent som en blankprøve, PC, NC og fortynnede serumprøver (P) i henhold til tabell 3.

**Tabell 3:** Foreslått plateoppsett for kvalitativ protokoll.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Dil CP	P2										
<b>B</b>	Dil CP	P2										
<b>C</b>	PC	etc										
<b>D</b>	PC											
<b>E</b>	NC											
<b>F</b>	NC											
<b>G</b>	P1											
<b>H</b>	P1											

### 10.3. Analyseprotokoll

Ta bare ut så mange brønner som trengs for testing, og forsegl aluminiumspakken godt. La alle løsninger nå romtemperatur (20–25 °C) før analyse.

#### 1. Inkubering av prøver

Fyll platen i henhold til avsnitt 10.2. Inkuber i 60–70 minutter ved +37 °C med lokk. Vær oppmerksom på at inkubering ikke skal gjøres i CO<sub>2</sub>-atmosfære. Hvis du bruker et CO<sub>2</sub>-skap, må du sørge for at CO<sub>2</sub>-tilførselen er frakoblet eller avslått.

#### 2. Vask

Vask platen i henhold til avsnitt 10.1: Skylleprotokoll.

#### 3. Inkubering av konjugat

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

#### 4. Vask

Vask 3 ganger som tidligere.

#### 5. Inkubering av substrat

Tilsett 100 µl substratløsning i hver brønn, og inkuber i 30 minutter ved romtemperatur (+20–25 °C).

#### 6. Les av platen

Les av absorbansen (OD) ved 405 nm på en mikroplateleser.

Valgfritt: 5 mM EDTA kan brukes som stoppløsning, 100 µl/brønn. Les av absorbansen i brønnene innen 60 minutter.

## 11. KVALITETSKONTROLL

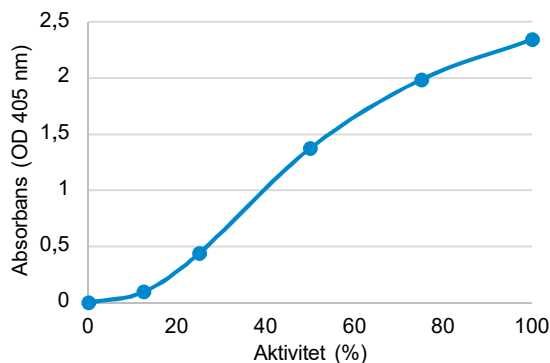
Analysesertifikatet (CoA) som er inkludert i settet, er partispesifikt og skal brukes til å verifisere resultater oppnådd ved laboratoriet vårt. Resultatene som er angitt på CoA, skal kun brukes som en veiledning. Resultatene som oppnås på laboratoriet ditt, kan variere.

OD for PC skal være >1,0, og OD for NC skal være <0,2 etter subtraksjon av blankprøven (Dil CP, 0 %). Hvis noen av kontrollene ikke er innenfor sine respektive områder, skal testen regnes som ugyldig og utføres på nytt.

## 12. TOLKNING AV RESULTATER

### 12.1. Semi-kvantitativ protokoll

Trekk 0 %-kalibratorens absorbans fra alle OD-verdiene. Kurvetilpasning med 4-parameters Marquardt anbefales. Figur 3 viser et eksempel på en standardkurve.



**Figur 3:** Eksempel på en standardkurve. Figuren ovenfor viser et eksempel på en semi-kvantitativ standardkurve og skal ikke brukes til tolkning av reelle pasientprøver.

I tilfeller der de oppnådde prøveverdiene er høyere enn den høyeste 100 %-kalibratoren, kan prøvene fortynnes 1/201 og testes på nytt. Vær oppmerksom på at den oppnådde aktivitetsverdien i dette tilfellet skal justeres i henhold til anvendt prøvefortynning.

Vi anbefaler at hvert laboratorium etablerer sitt eget referansenivå og en grenseverdi for defekter.

## 12.2. Kvalitativ protokoll

Vi anbefaler at du bruker OD-resultatene til å beregne verdier for komplementaktivitet (% av PC) for å lette tolkningen. Denne beregningen gjør det også enklere å sammenligne ulike analyser, ettersom OD er mer utsatt for endring fra kjøring til kjøring. Metoden som brukes til å beregne komplementaktivitet, er beskrevet nedenfor.

1. Trekk blankprøvens (Diluent) absorbans fra absorbansen til NC, PC og prøvene.
2. Beregn de gjennomsnittlige OD-verdiene for NC, PC og prøvene.
3. Beregn komplementaktiviteten ved hjelp av formelen nedenfor:

$$\text{Komplementaktivitet (\% av PC)} = \frac{\text{Sample} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

NC og PC er beregnet på overvåking for betydelig reagenssvikt. PC sikrer ikke presisjon ved analysens grenseverdi. Vi anbefaler at hvert laboratorium etablerer sitt eget referansenivå og en grenseverdi for defekter.

Et negativt resultat, dvs. en defekt, skal alltid verifiseres ved å teste en ny prøve for å sikre at det ikke har forekommet utilsiktet *in vitro*-komplementaktivisering før analysen ble utført.

## 13. EVALUERINGSKRITERIER

### 13.1. Forventede resultater

Når det avdekkes reduserte nivåer av komplementkomponenter eller komplementfunksjon, skal en defekt eller en pågående, immunologisk prosess som fører til økt nedbrytning av komponenter og senkning av komplementnivåer, vurderes av klinikere. Økte komplementnivåer er vanligvis et uspesifikt uttrykk for en akutfaserespons.

WIESLAB® Complement system Classical pathway kan være nyttig for å påvise komplementdefekter knyttet til den klassiske veien. En mer fullstendig og dyptgående funksjonell vurdering av alle tre komplementveier kan oppnås ved å bruke WIESLAB® Complement system Screen-settet, som vist i tabell 4.

**Tabell 4:** Kombinasjon av resultater i de ulike veiene og mulige defekter.

Klassisk vei	MBL-vei	Alternativ vei	Mulig defekt
Positivt	Positivt	Positivt	Ingen
Negativt	Positivt	Positivt	C1q, C1r, C1s
Positivt	Positivt	Negativt	Faktor B, D og P
Positivt	Negativt	Positivt	MBL, MASP-2
Negativt	Negativt	Negativt	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativt	Negativt	Positivt	C4, C2 eller en kombinasjon

### 13.2. Begrensninger

Den enkelte pasients komplementnivå kan ikke brukes som mål på sykdommens alvorlighetsgrad, da dette kan variere fra pasient til pasient. Det er derfor vanskelig å oppnå en absolutt standardisering av resultater.

Testen skal ikke brukes som det eneste grunnlaget for beslutninger om klinisk behandling, men vurderes i kombinasjon med kliniske symptomer og resultatene av andre tilgjengelige tester. Behandling skal ikke startes på grunnlag av resultatet av komplementanalyser. Oppstart eller endring i behandling skal ikke gjøres basert på endringer i komplementnivåer alene, men snarere på nøye klinisk observasjon.

## 14. YTELSE

### 14.1. Klinisk ytelse

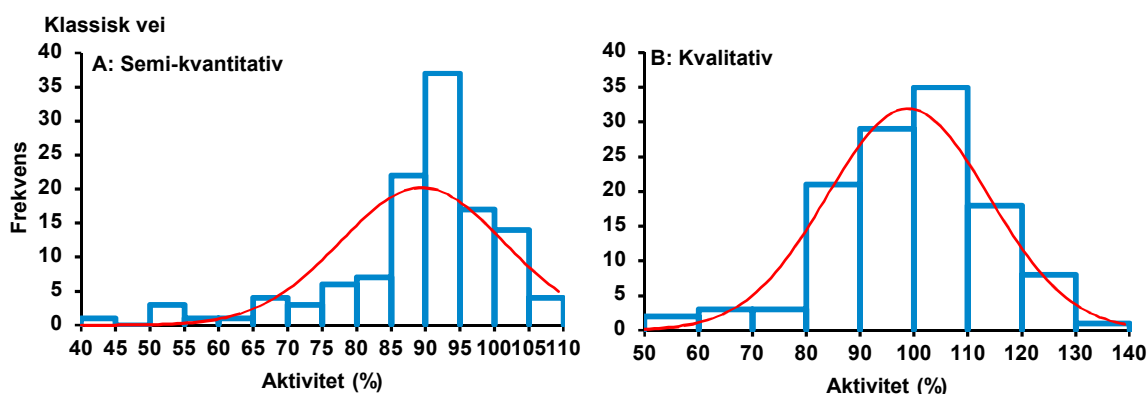
Normalfordelingen innenfor 2SD (standardavvik) er angitt i figur 4 og tabell 5. Resultater innenfor dette området indikerer normal funksjonalitet for den klassiske veien. Vi anbefaler at hvert laboratorium bekrefter eller etablerer sitt eget referanseområde for befolkningen de betjener.

En verdi under referanseområdene indikerer enten økt aktivering, noe som resulterer i forbruk av komplementkapasiteten i den klassiske veien, eller en genetisk bestemt lav aktivitet.

Verdier under 5 % tyder sterkt på en fullstendig defekt enten forårsaket av overdreven aktivering eller en arvelig defekt i den respektive veien. For å fastslå hvilke komplementfaktorer som forårsaker den reduserte aktiviteten, er det nødvendig med ytterligere analyse av komplementproteiner.

Et negativt resultat, dvs. en mistenkt defekt, skal alltid verifiseres ved å teste en ny prøve som håndteres forsiktig, for å sikre at det ikke har forekommet utilsiktet *in vitro*-komplementaktivering.

Serum fra 120 tilsynelatende friske blodgivere ble testet i den WIESLAB® Complement system Classical pathway kvalitative anvendelsen. For den semi-kvantitative anvendelsen er normalområdet basert på matematisk teoretisk beregning. Komplementaktiviteten til de 120 tilsynelatende friske blodgiverne er oppsummert i figur 4 og tabell 5. I studien lå ingen blodgivere under 40 %.



**Figur 4:** Histogram av referansepopulasjon analysert i klassisk vei, med henholdsvis semi-kvantitativ (A) og kvalitativ (B) protokoll.

**Tabell 5:** Verdier for de 120 blodgiverne analysert med henholdsvis semi-kvantitativ og kvalitativ protokoll.

Protokoll	n	Gjennomsnitt (%)	±2SD (%)	Median (%)
Semi-kvantitativ	120	89	66-113*	92
Kvalitativ	120	99	69-129*	100

\*) Dette er en statistisk beregning og garanterer ikke en sann grenseverdi. Vi anbefaler at hvert laboratorium etablerer sitt eget referansenivå og en grenseverdi for antatte defekter.

Sera med kjente komplementdefekter og sera med utarmet, spesifikk komplementfaktor ble testet i analysen (tabell 6 og 7). Alle defekte/utarmede sera var lave i analysen og ga verdier under 15 % og 5 %\*\*) med henholdsvis semi-kvantitativ og kvalitativ protokoll.

\*\*) 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 defekter testet med kvalitativ anvendelse

**Tabell 6:** Prøver med kjente defekter.

Defekt	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Antall pasienter	5	1	1	1	2	2
Antall defekte sera påvist	5	1	1	1	2	2

**Tabell 7:** Prøver med utarmede komponenter.

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

## 14.2. Presisjon

### 14.2.1. Presisjon mellom analyser

#### Semi-kvantitativ protokoll

**Tabell 8:** Presisjonen mellom analyser for den semi-kvantitative applikasjonen ble bestemt ved å teste syv prøver i åtte replikater ved tre forskjellige anledninger.

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

#### Kvalitativ protokoll

**Tabell 9:** Presisjonen mellom analyser for den kvalitative anvendelsen ble bestemt ved å teste tre prøver i duplikat. Resultater ble oppnådd for seks forskjellige kjøring.

	1	2	3
Gjennomsnittsverdi %	98	92	21
SD	4,3	3,9	1,7
CV %	4	4	8

### 14.2.2. Presisjon for enkeltanalyser

#### Semi-kvantitativ protokoll

**Tabell 10:** Presisjonen for enkeltanalyser for den semi-kvantitative applikasjonen ble bestemt ved å teste syv ulike prøver i åtte replikater ved én anledning.

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

## Kvalitativ protokoll

**Tabell 11:** Presisjonen for enkeltanalyser for den kvalitative anvendelsen ble bestemt ved å teste én prøve i 40 brønner.

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

### 14.2.3. Variasjon mellom partier

#### Semi-kvantitativ protokoll

**Tabell 12:** Variasjon mellom partier med den semi-kvantitative anvendelsen ble bestemt ved å teste syv prøver i duplikat på tre forskjellige partier av tre forskjellige personer.

	1	2	3	4	5	6	7
Gjennomsnittsverdi %	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 %

### 14.3. Linearitet

#### Semi-kvantitativ protokoll

**Tabell 13:** Fortynningseffekten ble bestemt ved å teste fem fortynningsrekker for tre forskjellige prøver.

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

### 14.4. Deteksjonsgrense

#### Semi-kvantitativ protokoll

**Kalibratorens måleområde:** 12,5 % – 100 %

**Deteksjonsgrense (LoD) = 8 %**

## 15. FEILSØKING

PROBLEM	MULIGE ÅRSAKER	LØSNING
<b>Kontrollverdier utenfor området</b>	Feil temperatur, timing eller pipettering, reagenser er ikke blandet.	Sjekk at tid og temperatur var riktig. Utfør testen på nytt.
	Krysskontaminering av kontroller.	Pipetter forsiktig.
	Den optiske veien er ikke ren.	Se etter skitt eller luftbobler i brønnene. Tørk av platebunnen, og les av på nytt.
	Kontroller (positive og/eller aktivitetskontroller) er ikke korrekt rekonstituert. Feil fortyning av kalibrator.	Sjekk kontrollene, løs opp en ny. Sjekk preparatet, og lag en ny fortyning.
<b>Alle testresultater er negative</b>	En eller flere reagenser er ikke tilføyd eller tilføyd i feil rekkefølge.	Kontroller prosedyren på nytt. Se etter ubrukte reagenser. Utfør testen på nytt.
	Antigenbelagt plate er inaktiv.	Se etter åpenbar fuktighet i ubrukte brønner. Tørk av platebunnen, og les av på nytt.
	Serum er inaktivt.	Fortynn nye prøver.
<b>Alle prøvebrønner er synlig gule</b>	Forurensede buffere eller reagenser.	Sjekk alle løsninger med tanke på uklarhet.
	Vaskeløsningen er forurenset.	Bruk en ren beholder. Kontroller kvaliteten på vannet som brukes til tilberedning av løsningen.
	Feil fortyning av serum.	Utfør testen på nytt.
<b>Dårlig presisjon</b>	CV for pipettetilførsel >5 %, eller prøvene er ikke blandet.	Kontroller kalibreringen av pipetten. Bruk reproducerbar teknikk. Unngå luftbobler i pipettespissen.
	Serum eller reagenser er ikke blandet tilstrekkelig eller har ikke nådd romtemperatur.	Bland alle reagenser forsiktig, men grundig, og la dem nå romtemperatur.
	Reagenstilsetningen tar for lang tid, inkonsekvens i tidsintervaller.	Utvikle en konsekvent, enhetlig teknikk, og bruk en enhet med flere spisser eller en auto-dispenser for å redusere tidsbruken.
	Den optiske veien er ikke ren.	Se etter luftbobler i brønnene. Tørk av platebunnen, og les av på nytt.
	Vaskingen er ikke konsekvent, innestengte bobler, vaskeløsning igjen i brønnene.	Kontroller at alle brønner er fylt og aspirert jevnt. Dispenser væske over nivået av reagens i brønnen. Etter siste vask tømmer du brønnene ved å banke stripsen mot absorberende materiale.






## 16. LITTERATURREFERANSER

- 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. J Immunol Methods. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. BESKRIVELSE AV SYMBOLER

Følgende symboler kan vises på emballasjen og etiketten:

	Partikode.
	Katalognummer.
	Utløpsdato.
	Temperaturgrense.
	Biologisk risiko.
	Se bruksanvisningen.
	In vitro-diagnostisk bruk.
	Produsent.
	Inneholder nok til 96 tester.
	Samsvar med direktiv 98/79/EF om in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr.
	Helsefare.

Ag	Antigen (belagt plate).
DIL	Fortynningsmiddel.
BUF WASH 30X	Vaskebuffer, 30x konsentrat.
CONTROL + LYO	Positiv kontroll.
CONTROL AC LYO	Lyofilisert aktivitetskontroll.
CONTROL -	Negativ kontroll.
CONJ	Konjugat.
SUBS pNPP	Substrat pNPP.
CH REP	Representant i Sveits.

## 18. DOKUMENTHISTORIKK

Versjon	Endringer
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Store redaksjonelle endringer med ny dokumentlayout. Prosedyrene for semi-kvantitativ og kvalitativ anvendelse er slått sammen, og egne underoverskrifter er lagt inn der det er aktuelt.</p> <p>Informasjon om at «Analysen skal utføres av utdannet laboratoriepersonell», er lagt til.</p> <p>Informasjon om metrologisk sporbarhet er lagt til.</p> <p>Spesifikasjon for positiv kontroll er endret fra &gt;1 til &gt;1,0 for avklaring.</p> <p>Informasjon vedrørende CO<sub>2</sub>-skap er lagt til.</p>
ETIKETT-DOC-0031 v 7.0	<p>Nærmere redegjørelse i avsnitt 14.1 om at de semi-kvantitative dataene er basert på matematisk teoretisk beregning.</p> <p>Verdiene i tabell 6 og 10 ble oppdatert for å samsvare med ytelseevalueringen publisert i versjon 5.0.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)

Instruções  
**WIESLAB<sup>®</sup> Complement system**  
Classical pathway  
Teste qualitativo e semiquantitativo

Para utilização em diagnóstico in vitro

Ensaio imunoenzimático para avaliação da  
Atividade funcional do complemento

- Tiras de microtitulação destacáveis (12 x 8) de 96 poços
- Conservar o kit a +2-8 °C
- Conservar o controlo positivo e de atividade a -20 °C



N.º do documento LABEL-DOC-0031 7.0

Data de entrada em vigor: 22-Jan-2026

## 1. UTILIZAÇÃO PREVISTA

O WIESLAB® Complement system Classical pathway (CP) kit é um imunoenensaio enzimático para a determinação qualitativa e/ou semiquantitativa da via funcional clássica do complemento no soro humano. A análise deve ser realizada por técnicos de laboratório devidamente qualificados.

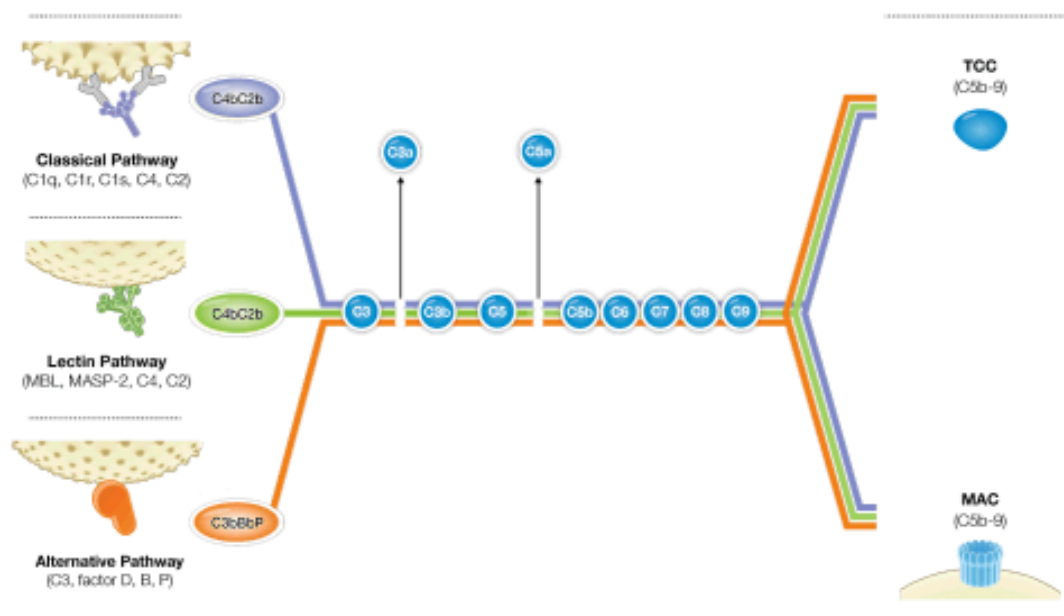
PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO.

## 2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

O sistema do complemento desempenha um papel fundamental em doenças crónicas, autoimunes e infecciosas. Existem três vias de ativação do complemento (Figura 1), nomeadamente: a clássica, a via MBL (lectina) e a via alternativa.

A atividade alterada do complemento torna os seres humanos suscetíveis a infeções fulminantes ou graves recorrentes e pode contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes. A ativação inadequada do complemento contribui para a inflamação crónica e lesões tissulares.

A ativação *in vitro* da cascata do complemento leva ao consumo de componentes do complemento, o que, por sua vez, leva a uma diminuição da sua concentração. Assim, a determinação das proteínas do complemento ou da atividade do complemento é utilizada para indicar se o sistema do complemento foi ativado por um mecanismo imunológico e/ou patogénico. Tanto as medições funcionais como as imunológicas do complemento são utilizadas para avaliar pacientes quando se suspeita de uma doença ativadora do complemento ou quando há possibilidade de uma deficiência hereditária. O nível de atividade do complemento avaliado por ensaios funcionais, como os WIESLAB Complement kits, tem em conta a taxa de síntese, a degradação e o consumo dos componentes e fornece uma medida da integridade das vias, ao contrário dos métodos imunológicos que medem especificamente a concentração de diversos componentes do complemento.



**Figura 1:** Esquema do sistema do complemento. O sistema do complemento pode ser ativado através da via clássica, MBL (lectina), ou da via alternativa por diferentes moléculas ativadoras. Depois da ativação, formam-se C3 convertases que, por sua vez, clivam a C3 permitindo a clivagem subsequente de C5. A clivagem de C5 em C5b inicia a formação do complexo MAC (também denominado complexo terminal do complemento (TCC) ou C5b-9).

### 3. PRINCÍPIO DA WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY

O ensaio WIESLAB® Complement system Classical pathway combina os princípios do ensaio hemolítico para ativação do complemento com a utilização de anticorpos marcados específicos para um neoantigénio produzido como resultado da ativação do complemento. A quantidade de neoantigénio gerado é proporcional à atividade funcional da via clássica.

No Complement system Classical pathway kit, os poços das tiras de microtitulação estão revestidos com um ativador específico da via clássica. A combinação da placa com a composição do tampão de diluição da amostra e o nível de diluição do soro do paciente assegura que apenas a via clássica é ativada. Durante a incubação do soro do paciente diluído nos poços, o complemento é ativado pelo revestimento específico.

Em seguida, os poços são lavados e a quantidade de complexo C5b-9 formado na superfície da placa é detetada por um anticorpo marcado com fosfatase alcalina específico do neoantigénio C5b-9 que se gera no processo de formação do Complexo de ataque à membrana (MAC).

Após uma nova etapa de lavagem, a deteção de anticorpos específicos é obtida por incubação com uma solução de substrato de fosfatase alcalina. A quantidade de ativação do complemento está correlacionada com a intensidade da cor e é medida em termos de absorvância (OD, optical density - densidade ótica).

#### Rastreabilidade metrológica

O valor atribuído ao controlo positivo é definido como 100% da atividade normal da via do complemento e não é rastreável até às unidades do SI. É atribuído utilizando soros humanos normais agrupados, avaliados com o procedimento de ensaio ELISA descrito, com um sistema de referência interno como o nível de hierarquia de calibração mais alto.

### 4. ADVERTÊNCIAS, CUIDADOS E PRECAUÇÕES

- PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.
- Os componentes do soro humano utilizados na preparação dos controlos contidos no kit foram testados quanto à presença de anticorpos do vírus da imunodeficiência humana 1 e 2 (VIH 1 e 2), da hepatite C (VHC), bem como antigénio de superfície da hepatite B, por métodos aprovados pela FDA e apresentaram resultados negativos. Dado que nenhum método de teste pode oferecer uma garantia total de ausência de VIH, de VHC, do vírus da hepatite B ou de outros agentes infecciosos, as amostras e os reagentes de origem humana devem ser manuseados como se pudessem transmitir agentes infecciosos.
- Os Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health recomendam que agentes potencialmente infecciosos sejam manuseados em conformidade com o Nível de biossegurança 2.
- Todas as soluções contêm ProClin 300 como conservante. Nunca pipete com a boca nem permita que os reagentes ou as amostras do paciente entrem em contacto com a pele. Os reagentes que contêm ProClin podem ser irritantes. Evite o contacto com a pele e com os olhos. Em caso de contacto, lave com água em abundância.
- A ficha de dados de segurança relativa a todos os componentes perigosos presentes neste kit está disponível mediante pedido junto da Svar Life Science.
- Não utilize os componentes após a data de validade.
- Os reagentes do kit são específicos do kit e não devem ser misturados entre lotes de kits diferentes.
- Elimine todos os componentes utilizados, amostras utilizadas/restos e controlos restantes como resíduos biológicos perigosos, de acordo com a regulamentação local. Elimine os outros componentes restantes como resíduos perigosos, de acordo com a regulamentação local.
- Qualquer incidente grave que ocorra relacionado com a este dispositivo deverá ser notificado à Svar Life Science AB e à autoridade competente do Estado-Membro da UE ou do país em que o utilizador/paciente reside.

Solução de lavagem (concentração 30x)



#### ADVERTÊNCIA

**Contém:** Massa de reação de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] e 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.  
 H412 Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.  
 P261 Evitar inalar spray.  
 P273 Evitar a libertação para o ambiente.  
 P280 Usar luvas de proteção.  
 P333 + P313 Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico/obtenha assistência médica.

Tampão CP de diluição, solução conjugada, controlo negativo, substrato pNPP

EUH208 Contém "Massa de reação de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] e 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)" Pode provocar uma reação alérgica.

EUH210 Ficha de segurança fornecida mediante pedido.

## 5. CONTEÚDO DO KIT

- 1 placa de microtitulação selada com poços destacáveis (12 x 8) revestidos com IgM humana.
- 2 frascos para injetáveis (35 ml) de diluente CP (Dil CP), com rótulo azul.
- 1 frasco para injetáveis (0,2 ml) de controlo negativo (NC) que contém soro humano (a diluir como para uma amostra de soro do paciente).
- 1 frasco para injetáveis (0,2 ml) de controlo positivo (PC) que contém soro humano liofilizado. Consulte a secção 9.3 "Reconstituição do controlo positivo" abaixo.
- 1 frasco para injetáveis (consulte o volume no CoA) de controlo de atividade (AC) para aplicação semiquantitativa, que contém soro humano liofilizado (origem diferente de PC). Consulte a secção 9.3.1 "Reconstituição do controlo de atividade" no procedimento para a aplicação semiquantitativa.
- 1 frasco para injetáveis (13 ml) de conjugado que contém anticorpos marcados com fosfatase alcalina para C5b-9 (cor azul).
- 1 frasco para injetáveis (13 ml) de solução de substrato pNPP, pronta a usar.
- 1 frasco para injetáveis (30 ml) de solução de lavagem, concentrada 30x.

**Nota:** o volume de reconstituição do AC é indicado no Certificado de análise (CoA) (XXX µl) e no rótulo do AC.

## 6. MATERIAIS OU EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Leitor de microplacas com filtro de 405 nm.
- Pipetas de precisão com pontas descartáveis.
- Lavadora de tiras, papel absorvente, tubos e um cronómetro.
- Incubadora com capacidade para manter 37 °C. Se for utilizado um compartimento de CO<sub>2</sub>, certifique-se de que o fornecimento de CO<sub>2</sub> está desconectado/desligado.

## 7. MANUSEAMENTO E ARMAZENAMENTO

- Os reagentes devem ser armazenados a 2-8 °C, exceto nos controlos positivo e de atividade.
- Todos os reagentes do kit estão prontos a usar, exceto a solução de lavagem e os controlos.
- Os controlos positivo e de atividade devem permanecer armazenados a -20 °C até à sua reconstituição.
- Os controlos positivo e de atividade reconstituídos devem ser armazenados a <-70 °C e só podem ser descongelados uma vez.

## 8. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Este teste é realizado em amostras de soro. As amostras de sangue devem ser colhidas utilizando uma técnica de venopunção asséptica e o soro deve ser obtido com procedimentos padrão. É recomendado um mínimo de 5 ml de sangue total. Deixe o sangue coagular em tubos de soro durante 60-65 minutos à temperatura ambiente (20-25 °C). Centrifugue as amostras de sangue e transfira o soro isento de células para um tubo limpo.

É necessário manusear corretamente os soros para evitar *in vitro* a ativação do complemento. Os soros devem ser congelados a -70 °C ou menos em tubos hermeticamente fechados para armazenamento prolongado ou para transporte em gelo seco. As amostras não devem ser congeladas e descongeladas mais de uma vez.

Não utilize soros ictericos, lipémicos e hemolisados. Os soros inativados pelo calor não podem ser utilizados. O plasma não pode ser utilizado. O Clinical and Laboratory Standards Institute oferece recomendações para o armazenamento de amostras de sangue (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. PREPARAÇÃO E MANUSEAMENTO DOS REAGENTES

### 9.1. Preparação da solução de lavagem

Caso sejam observados cristais de sal no frasco para injetáveis com a solução de lavagem concentrada, coloque o frasco para injetáveis a 37 °C em banho-maria até os cristais se dissolverem antes da diluição da solução de lavagem.

Dilua 30 ml da solução de lavagem concentrada 30x em 870 ml de água destilada. Quando armazenada a 2-8 °C, a solução de lavagem diluída permanece estável até à data de validade do kit.

### 9.2. Controlo negativo (NC)

ONC deve ser diluído como uma amostra de soro do paciente.

### 9.3. Reconstituição do controlo positivo (PC)

Reconstitua o PC de acordo com o seguinte procedimento:

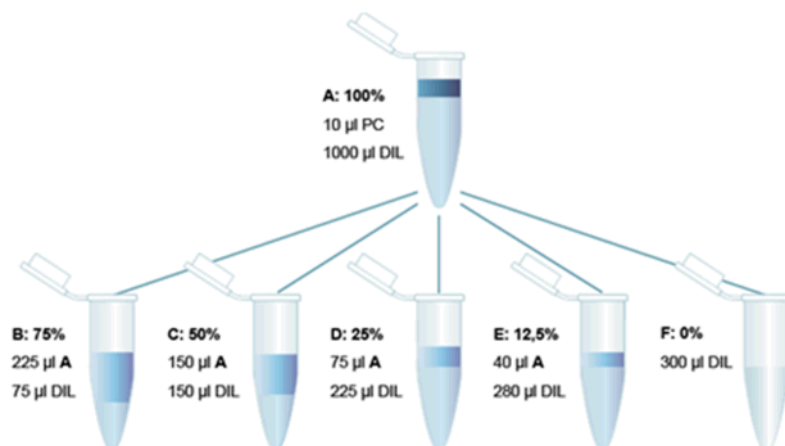
1. Bata suavemente todo o material liofilizado no fundo do frasco para injetáveis e retire a cápsula de fecho.
2. Acrescente imediatamente 200 µL de água destilada diretamente ao material liofilizado.
3. Volte a colocar a cápsula de fecho.
4. Deixe repousar o frasco para injetáveis em gelo durante 5 minutos e depois agite suavemente ou agite no vórtice ocasionalmente até se dissolver por completo.
5. Para diluição adicional, consulte a secção 9.3.1 ou 9.3.2 para o protocolo semiquantitativo e qualitativo, respetivamente.

O PC reconstituído pode permanecer armazenado durante até 4 horas antes da sua utilização se for conservado a 2-8 °C ou em gelo. Deve ser armazenado a <-70 °C e só pode ser descongelado uma vez.

### 9.3.1. Protocolo semiquantitativo

#### Preparação da curva de calibração

Para a diluição do PC reconstituído para calibradores, consulte a Figura 2 e a Tabela 1. O calibrador pode ser deixado à temperatura ambiente durante até 1 h antes da utilização. O calibrador deve ser preparado fresco e não pode ser armazenado para utilização posterior.



**Tabela 1:** Volumes para diluição da curva de calibração.

Curva do calibrador	PC (µl)	DIL (µl)
<b>A: 100%</b>	10	1000
<b>A partir de 100% (µl)</b>		
<b>B: 75%</b>	225	75
<b>C: 50%</b>	150	150
<b>D: 25%</b>	75	225
<b>E: 12,5%</b>	40	280
<b>F: 0%</b>	0	300

**Figura 2:** Esquema de diluição para a curva do calibrador. O controlo positivo reconstituído (PC) é misturado com o diluente do kit (DIL) de acordo com a tabela.

#### Reconstituição do controlo de atividade (AC)

1. Bata suavemente todo o material liofilizado no fundo do frasco para injetáveis e retire a cápsula de fecho.
2. Acrescente imediatamente o volume de água destilada indicado no rótulo do CoA/AC diretamente ao material liofilizado.
3. Volte a colocar a cápsula de fecho.
4. Deixe repousar o frasco para injetáveis em gelo durante 5 minutos e depois agite suavemente ou agite no vórtice até se dissolver por completo.
5. Dilua o controlo reconstituído do mesmo modo que uma amostra de soro do paciente.

O controlo de atividade reconstituído pode permanecer armazenado durante até 4 horas antes da sua utilização se for conservado a 2-8 °C ou em gelo. Deve ser armazenado a <-70 °C e só pode ser descongelado uma vez.

### 9.3.2. Protocolo qualitativo

Dilua o controlo positivo reconstituído de acordo com as instruções descritas na secção 9.4: Diluição das amostras.

### 9.4. Manuseamento do soro

Descongele parcialmente os soros congelados colocando-os brevemente em banho-maria a 37 °C e misturando suavemente. Após o descongelamento parcial, coloque imediatamente os tubos em gelo e deixe-os lá até descongelarem completamente. Misture brevemente numa misturadora vortex.

#### Diluição das amostras

Dilua o soro 1/101 com diluente CP, rótulo azul, (500 µl de diluente + 5 µl de soro) e misture bem, mas suavemente, num vortex. O soro diluído pode permanecer à temperatura ambiente durante um máximo de 60 minutos antes da análise.

## 10. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

### 10.1. Protocolo de enxaguamento

Esvazie os poços e lave 3 vezes com 300 µL de solução de lavagem, enchendo e esvaziando os poços de cada vez. Depois da última lavagem, esvazie os poços batendo com a tira num papel absorvente.

### 10.2. Disposição da placa

#### 10.2.1. Protocolo semiquantitativo

Pipete 100 µl/poço, em duplicado, do calibrador (100%-0%), NC, AC e amostras de soro diluídas (P) de acordo com a Tabela 2. O calibrador a 0% deve ser utilizado como branco.

**Tabela 2:** Disposição sugerida para a placa, protocolo semiquantitativo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100%	12,5%	P1									
<b>B</b>	100%	12,5%	P1									
<b>C</b>	75%	0%	P2									
<b>D</b>	75%	0%	P2									
<b>E</b>	50%	NC	etc									
<b>F</b>	50%	NC										
<b>G</b>	25%	AC										
<b>H</b>	25%	AC										

#### 10.2.2. Protocolo qualitativo

Pipete 100 µl/poço, em duplicado, de diluente como branco, PC, NC e amostras de soro diluídas (P) de acordo com a Tabela 3.

**Tabela 3:** Disposição sugerida para a placa, protocolo qualitativo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Dil CP	P2										
<b>B</b>	Dil CP	P2										
<b>C</b>	PC	etc										
<b>D</b>	PC											
<b>E</b>	NC											
<b>F</b>	NC											
<b>G</b>	P1											
<b>H</b>	P1											

### 10.3. Protocolo do ensaio

Retire apenas o número de poços necessários para o teste, fechando novamente a embalagem de alumínio com cuidado. Deixe todas as soluções atingirem a temperatura ambiente (20-25 °C) antes da análise.

#### 1. Incubação das amostras

Encha a placa de acordo com o descrito na secção 10.2. Incube-a durante 60-70 minutos a +37 °C com a tampa de pressão. Tenha em atenção que nenhuma incubação deve ser realizada numa atmosfera de CO<sub>2</sub>. Se for utilizado um compartimento de CO<sub>2</sub>, certifique-se de que o fornecimento de CO<sub>2</sub> está desconectado/desligado.

#### 2. Lavagem

Lave a placa de acordo com o descrito na secção 10.1: Protocolo de enxaguamento.

#### 3. Incubação do conjugado

Acrescente 100 µL de conjugado a cada poço. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente (+20-25 °C).

#### 4. Lavagem

Lave 3 vezes como antes.

#### 5. Incubação do substrato

Acrescente 100 µL de solução de substrato a cada poço e incube durante 30 minutos à temperatura ambiente (+20-25 °C).

#### 6. Leitura da placa

Leia a absorvância (OD) a 405 nm num leitor de microplacas.

Opcional: é possível utilizar EDTA 5 mM como solução de paragem, 100 µl/poço. Leia a absorvância dos poços no prazo de 60 minutos.

## 11. CONTROLO DE QUALIDADE

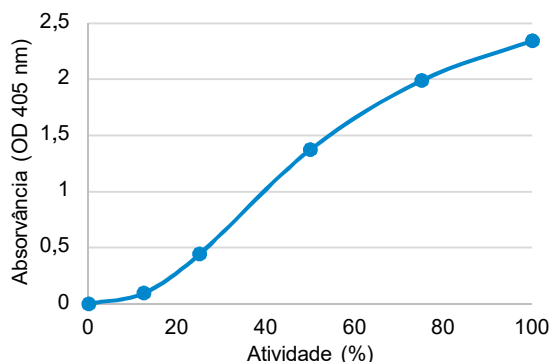
O Certificado de análise (CoA) incluído no kit é específico do lote e deve ser utilizado para verificar os resultados obtidos pelo nosso laboratório. Os resultados indicados no CoA servem apenas de orientação. Os resultados obtidos pelo seu laboratório podem ser diferentes.

O valor de OD do PC deve ser >1,0 e o valor de OD do NC deve ser <0,2 após a subtração do valor do branco (Dil CP, 0%). Se algum dos controlos não estiver dentro dos respetivos intervalos, o teste deve ser considerado inválido e posteriormente repetido.

## 12. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

### 12.1. Protocolo semiquantitativo

Subtraia a absorvância do calibrador a 0% de todos os valores de OD. Recomenda-se o ajuste com uma curva logística de 4 parâmetros (Marquardt). Consulte um exemplo de uma curva padrão na Figura 3.



**Figura 3:** Exemplo de uma curva padrão. A figura anterior apresenta um exemplo de uma curva padrão semiquantitativa e não deve ser utilizada para interpretação de amostras reais de pacientes.

Nos casos em que os valores obtidos para uma amostra sejam superiores ao calibrador mais alto a 100%, as amostras podem ser diluídas 1/201 e testadas novamente. Note que o valor da atividade obtido neste caso deve ser ajustado de acordo com a diluição da amostra aplicada.

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça o seu próprio nível de referência e valor de cut-off para as deficiências.

## 12.2. Protocolo qualitativo

Recomenda-se a utilização dos resultados de OD para calcular os valores da atividade do complemento (% do PC) para facilitar a interpretação. Este cálculo também facilita comparações entre diferentes análises, já que o valor de OD é mais propenso a mudanças entre execuções. O método utilizado para calcular a atividade do complemento é descrito abaixo.

1. Subtraia a absorvância do branco (diluente) das absorvâncias do NC, PC e das amostras.
2. Calcule os valores médios de OD para NC, PC e para as amostras.
3. Calcule a atividade do complemento utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Atividade do complemento (\% do PC)} = \frac{\text{Amostra} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

Os controlos NC e PC destinam-se a monitorizar falhas substanciais dos reagentes. O PC não assegura precisão no cut-off do ensaio. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça o seu próprio nível de referência e valor de cut-off para as deficiências.

Um resultado negativo, ou seja, uma deficiência, deve sempre ser verificado testando uma nova amostra para assegurar que não ocorreu nenhuma ativação inadvertida do complemento *in vitro* antes da execução do ensaio.

## 13. CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO

### 13.1. Resultados esperados

Quando são observados níveis diminuídos dos componentes do complemento ou da função do complemento, os médicos consideram que existe uma deficiência ou um processo imunológico em curso que dá lugar ao aumento da degradação dos componentes e à diminuição dos níveis do complemento. Em geral, os níveis elevados do complemento são uma expressão inespecífica de uma resposta de fase aguda.

A WIESLAB® Complement system Classical pathway pode ser útil para a deteção de deficiências de complemento relacionadas com a via clássica. É possível realizar uma avaliação funcional mais completa e aprofundada das três vias do complemento utilizando o WIESLAB® Complement system Screen kit, conforme é mostrado na Tabela 4.

**Tabela 4:** Combinação dos resultados nas diferentes vias e possíveis deficiências.

Via clássica	Via MBL	Via alternativa	Possível deficiência
Positivo	Positivo	Positivo	Nenhuma
Negativo	Positivo	Positivo	C1q, C1r, C1s
Positivo	Positivo	Negativo	Fatores B, D e P
Positivo	Negativo	Positivo	MBL, MASP-2
Negativo	Negativo	Negativo	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativo	Negativo	Positivo	C4, C2 ou uma combinação

## 13.2. Limitações

O nível de complemento de cada paciente não pode ser utilizado como medida da gravidade da doença, pois pode variar entre pacientes. Como tal, é difícil obter uma normalização absoluta dos resultados.

O teste não deve ser utilizado como única base para tomar decisões sobre a terapêutica clínica. Deve ser utilizado em conjunto com os sintomas clínicos e os resultados de outros testes disponíveis. A terapêutica não deve ser iniciada com base no resultado do teste do complemento. O início ou as mudanças do tratamento não devem basear-se apenas nas alterações dos níveis do complemento, mas sim numa observação clínica cuidadosa.

## 14. CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

### 14.1. Desempenho clínico

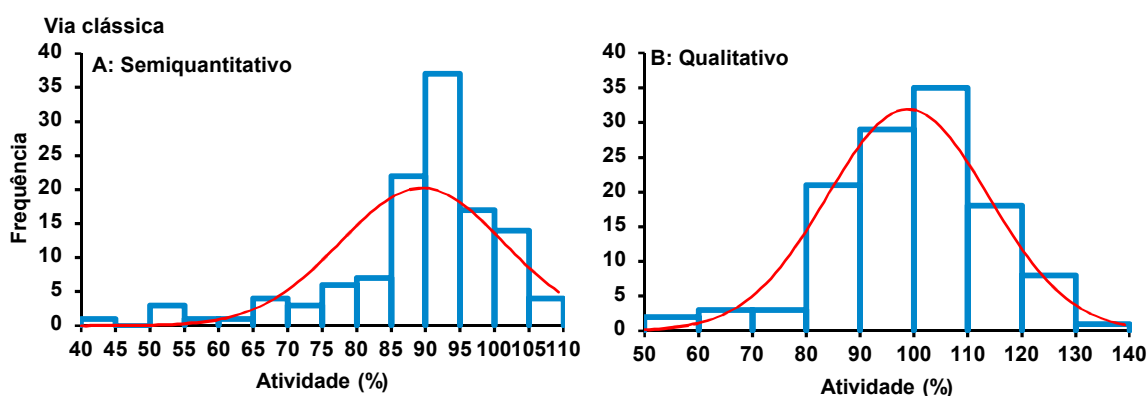
A distribuição normal dentro de 2SD (desvio padrão) é indicada na Figura 4 e na Tabela 5. Os resultados dentro deste intervalo indicam uma funcionalidade normal da via clássica. Recomenda-se que cada laboratório confirme ou defina o seu próprio intervalo de referência para a população que serve.

Um valor abaixo dos intervalos de referência indica um aumento da ativação, o que resulta no consumo da capacidade da via clássica do complemento ou numa baixa atividade determinada geneticamente.

Os valores abaixo de 5% sugerem fortemente uma deficiência completa causada por ativação excessiva ou uma deficiência hereditária na respetiva via. Para estabelecer que fatores do complemento causam a redução da atividade, é necessária uma análise mais aprofundada das proteínas do complemento.

Um resultado negativo (ou seja, uma suspeita de deficiência) deve sempre ser verificado testando uma nova amostra, cuidadosamente manuseada, para assegurar que não ocorreu *in vitro* nenhuma ativação inadvertida do complemento.

Foram testados soros provenientes de 120 dadores de sangue aparentemente saudáveis na aplicação qualitativa WIESLAB® Complement system Classical pathway. Para a aplicação semiquantitativa, o intervalo normal baseia-se num cálculo teórico matemático. A atividade do complemento dos 120 dadores de sangue aparentemente saudáveis está resumida na Figura 4 e na Tabela 5. No estudo, nenhum dador de sangue ficou abaixo de 40 %.



**Figura 4:** Histograma da população de referência para a análise da via clássica, protocolo semiquantitativo (A) e qualitativo (B), respetivamente.

**Tabela 5:** Valores para os 120 dadores de sangue analisados com o protocolo semiquantitativo e qualitativo, respetivamente.

Protocolo	n	Média (%)	±2SD (%)	Mediana (%)
Semiquantitativo	120	89	66-113*	92
Qualitativo	120	99	69-129*	100

\*) Este é um cálculo estatístico e não assegura um cut-off verdadeiro. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça o seu próprio nível de referência e valor de cut-off para as suspeitas de deficiências.

Foram testados soros com deficiências conhecidas do complemento e soros com depleção de fatores específicos do complemento no ensaio (Tabelas 6 e 7). Todos os soros deficientes/empobrecidos apresentaram valores baixos no ensaio e inferiores a 15% e 5%\*\* no protocolo semiquantitativo e qualitativo, respetivamente.

\*\*) 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 obter informações sobre os testes alargados de amostras de pacientes com deficiências analisadas com a aplicação qualitativa.

**Tabela 6:** Amostras com deficiências conhecidas.

Deficiência	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Número de pacientes	5	1	1	1	2	2
Número de soros em que se detetou deficiência	5	1	1	1	2	2

**Tabela 7:** Amostras com componentes empobrecidos.

Depleção	C1q	C3	C4	C5	C7
Número de soros empobrecidos	2	1	1	1	1
Número de depleções detetadas	2	1	1	1	1

## 14.2. Precisão

### 14.2.1. Precisão entre ensaios

#### Protocolo semiquantitativo

**Tabela 8:** A precisão entre ensaios para a aplicação semiquantitativa foi determinada testando sete amostras em oito réplicas em três ocasiões diferentes.

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

#### Protocolo qualitativo

**Tabela 9:** A precisão entre ensaios para a aplicação qualitativa foi determinada testando três amostras em duplicado. Foram obtidos resultados para seis execuções diferentes.

	1	2	3
% do valor médio	98	92	21
SD	4,3	3,9	1,7
% do CV	4	4	8

### 14.2.2. Precisão intraensaio

#### Protocolo semiquantitativo

**Tabela 10:** A precisão intraensaio para a aplicação semiquantitativa foi determinada testando sete amostras diferentes em oito réplicas numa única ocasião.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>% do valor médio</b>	79	76	72	83	24	34	30
<b>SD</b>	10	11	6	9	0	1	1
<b>% do CV</b>	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

#### Protocolo qualitativo

**Tabela 11:** A precisão intraensaio para a aplicação qualitativa foi determinada testando uma amostra em 40 poços.

Ensaio	% do valor médio	SD	% do CV
<b>CP</b>	85	2,9	3

### 14.2.3. Variação entre lotes

#### Protocolo semiquantitativo

**Tabela 12:** A variação entre lotes na aplicação semiquantitativa foi determinada testando sete amostras em duplicado em três lotes diferentes por três pessoas diferentes.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>% do valor médio</b>	8	73	85	24	37	74	78
<b>SD</b>	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
<b>% do CV</b>	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

### 14.3. Linearidade

#### Protocolo semiquantitativo

**Tabela 13:** A recuperação da diluição foi determinada testando cinco diluições em série para três amostras diferentes.

Amostra	Diluição	Atividade média medida (%)	Atividade teórica (%)	% de recuperação corrigida por diluição
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
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

#### **14.4. Limite de detecção**

##### **Protocolo semiquantitativo**

**Intervalo de medições do calibrador:** 12,5% - 100%

**Limite de detecção (LoD) = 8%**

## 15. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS









PROBLEMA	CAUSAS POSSÍVEIS	SOLUÇÃO
<b>Valores do controlo fora do intervalo.</b>	Temperatura, tempo ou pipetagem incorretos; os reagentes não estão misturados.	Verifique se o tempo e a temperatura estão corretos. Repita o teste.
	Contaminação cruzada de controlos.	Pipete cuidadosamente.
	A via ótica não está limpa.	Verifique se existe sujidade ou bolhas de ar nos poços. Limpe a parte inferior da placa e repita a leitura.
	Os controlos (controlos positivos e/ou de atividade) não estão reconstituídos corretamente. Diluição incorreta do calibrador.	Verifique os controlos e dissolva um novo. Verifique a preparação e realize uma nova diluição.
<b>Todos os resultados dos testes são negativos.</b>	Um ou mais reagentes não foram acrescentados ou foram acrescentados pela ordem errada.	Verifique novamente o procedimento. Verifique se existem reagentes não utilizados. Repita o teste.
	A placa revestida com antigénio é inativa.	Verifique se existem sinais óbvios de humidade nos poços não utilizados. Limpe a parte inferior da placa e repita a leitura.
	Soro inativo.	Dilua novas amostras.
<b>Todos os poços de amostra estão visivelmente amarelos.</b>	Tampões ou reagentes contaminados.	Verifique se existe turbidez em todas as soluções.
	A solução de lavagem está contaminada.	Utilize um recipiente limpo. Verifique a qualidade da água utilizada para preparar a solução.
	Diluição incorreta do soro.	Repita o teste.
<b>Precisão fraca.</b>	CV na pipeta >5% ou as amostras não estão misturadas.	Verifique a calibração da pipeta. Utilize uma técnica reproduzível. Evite bolhas de ar na ponta da pipeta.
	O soro ou os reagentes não estão suficientemente misturados ou não estão equilibrados à temperatura ambiente.	Misture todos os reagentes com cuidado, mas totalmente, e deixe equilibrar à temperatura ambiente.
	A adição do reagente está a demorar muito; existem inconsistências nos intervalos de tempo.	Desenvolva uma técnica uniforme e consistente e utilize um dispositivo multiponta ou um dispensador automático para diminuir o tempo.
	A via ótica não está limpa.	Verifique se existem bolhas de ar nos poços. Limpe a parte inferior da placa e repita a leitura.
	Lavagem inconsistente, bolhas presas, solução de lavagem deixada nos poços.	Verifique se todos os poços são enchidos e aspirados uniformemente. Distribua o líquido acima do nível do reagente no poço. Depois da última lavagem, esvazie os poços batendo com a tira em papel absorvente.




## 16. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. *J Immunol Methods*. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. DESCRIÇÃO DOS SÍMBOLOS

Os seguintes símbolos podem ser apresentados na embalagem e no rótulo:

	Código do lote.
	Número de catálogo.
	Data de validade.
	Limite de temperatura.
	Risco biológico.
	Consultar as instruções de utilização.
	Utilização em diagnóstico in vitro.
	Fabricante.

	<p>Contém o suficiente para 96 testes.</p>
	<p>Conformidade com a Diretiva 98/79/CE sobre Dispositivos médicos para diagnóstico in vitro.</p>
	<p>Perigo para a saúde.</p>

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Ag</div>	<p>Antigénio (placa revestida).</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DIL</div>	<p>Diluyente.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BUF</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">WASH</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">30X</div>	<p>Tampão de lavagem, concentrado 30x.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">+</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">LYO</div>	<p>Controlo positivo.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">AC</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">LYO</div>	<p>Controlo de atividade liofilizado.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">-</div>	<p>Controlo negativo.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONJ</div>	<p>Conjugado.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">SUBS</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">pNPP</div>	<p>Substrato pNPP.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CH</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">REP</div>	<p>Representante suíço.</p>

## 18. HISTÓRICO DO DOCUMENTO

Versão	Alterações
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Alterações editoriais importantes com um novo layout do documento. Os procedimentos de aplicação semiquantitativa e qualitativa foram combinados e foram introduzidos subtítulos separados quando aplicável.</p> <p>Foi acrescentada a informação "A análise deve ser realizada por técnicos de laboratório devidamente qualificado".</p> <p>Foram acrescentadas informações sobre a rastreabilidade metrológica.</p> <p>A especificação para o controlo positivo foi alterada de &gt;1 para &gt;1,0 para clarificação.</p> <p>Foram acrescentadas informações sobre o compartimento de CO<sub>2</sub>.</p>
LABEL-DOC-0031 v 7.0	<p>Aumento da transparência na secção 14.1, indicando que os dados semiquantitativos se baseiam em cálculos teóricos matemáticos.</p> <p>Os valores das Tabelas 6 e 10 foram atualizados para corresponderem à avaliação de desempenho publicada na versão 5.0.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)

Uputstva  
**WIESLAB<sup>®</sup> Complement system**  
Classical pathway  
Kvalitativni i polukvantitativni test

Za in vitro dijagnostičku upotrebu

Enzimski imunotest za procenu  
funkcionalne aktivnosti komplementa

- Razdvojite trake za mikrotitraciju (12x8) 96 bunarčića
- Čuvajte komplet na temperaturi od +2–8 °C
- Čuvajte pozitivnu kontrolu i kontrolu aktivnosti na -20 °C



Br. dok. LABEL-DOC-0031 7.0

Datum stupanja na snagu: 22-Jan-2026

## 1. PREDVIĐENA NAMENA

WIESLAB® Complement system Classical pathway (CP) kit je enzimski imunotest za kvalitativno i/ili polukvantitativno određivanje funkcionalnog klasičnog puta komplementa u humanom serumu. Analizu treba da obavljaju obučeni laboratorijski stručnjaci.

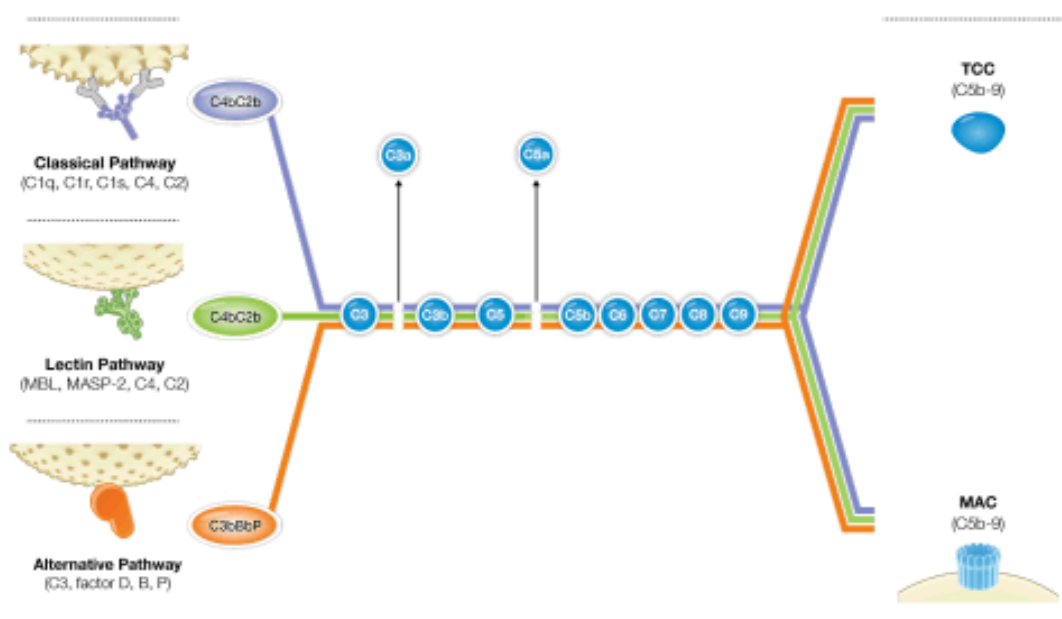
ZA IN VITRO DIJAGNOSTIČKU UPOTREBU.

## 2. REZIME I OBJAŠNENJE

Sistem komplementa igra ključnu ulogu u hroničnim, autoimunim i infektivnim bolestima. Postoje tri puta aktivacije komplementa (slika 1), a to su klasični, MBL (lektinski) i alternativni put.

Nepravilna aktivnost komplementa uzrokuje podložnost ljudi ponavljajućim fulminantnim ili teškim infekcijama i može doprineti razvoju autoimunih bolesti. Neodgovarajuća aktivacija komplementa doprinosi hroničnoj upali i povredama tkiva.

*In vitro* aktivacija kaskade komplementa dovodi do potrošnje komponenti komplementa što, zauzvrat, dovodi do smanjenja njihove koncentracije. Prema tome, određivanje proteina komplementa ili aktivnosti komplementa se koristi da bi se ukazalo na to da li je sistem komplementa aktiviran imunološkim i/ili patogenim mehanizmom. I funkcionalna i imunoheмиjska merenja komplementa koriste se za procenu pacijenata kada se sumnja na bolest koja aktivira komplement ili je moguć nasledni nedostatak. Nivo aktivnosti komplementa koji se procenjuje funkcionalnim testovima, kao što je *WIESLAB* Complement kitovi, uzimaju u obzir brzinu sinteze, degradacije i potrošnje komponenti i pružaju meru integriteta puteva, za razliku od imunoheмиjskih metoda koje posebno mere koncentraciju različitih komponenti komplementa.



**Slika 1:** Šematska slika sistema komplementa. Sistem komplementa može da se aktivira preko klasičnog, MBL (lektinskog) ili alternativnog puta različitim aktivirajućim molekulima. Nakon aktivacije formiraju se C3 konvertaze koje potom cepaju C3, a zatim je moguće cepanje molekula C5. Cepanje C5 do C5b pokreće formiranje MAC kompleksa (koji se naziva i terminalni kompleks komplementa (TCC) ili C5b-9).

### 3. PRINCIP WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY

Test WIESLAB® Complement system Classical pathway kombinuje principe hemolitičkog testa za aktivaciju komplementa uz upotrebu označenih antitela specifičnih za neoantigen proizveden kao rezultat aktivacije komplementa. Količina nastalog neoantigena je proporcionalna funkcionalnoj aktivnosti klasičnog puta.

U kompletu klasičnog puta sistema komplementa, bunarčići traka za mikrotitraciju su obloženi specifičnim aktivatorom klasičnog puta. Ploča u kombinaciji sa sastavom pufera za razblaživanje uzorka i nivoom razblaživanja seruma pacijenta osigurava aktiviranje samo klasičnog puta. Tokom inkubacije razblaženog seruma pacijenta u bunarčićima, komplement se aktivira specifičnim premazom.

Bunarčići se zatim ispiraju i količina kompleksa C5b-9 formirana na površini ploče se detektuje antitelom označenim alkalnom fosfatazom specifičnim za neoantigen C5b-9 formiran tokom formiranja membranolitičkog kompleksa (MAC).

Nakon daljeg koraka pranja, detekcija specifičnih antitela se dobija inkubacijom sa rastvorom supstrata alkalne fosfataze. Količina aktivacije komplementa u vezi je sa intenzitetom boje i meri se u smislu apsorbance (optička gustina, OD).

#### Metrološka sledljivost

Vrednost dodeljena pozitivnoj kontroli je definisana kao 100% normalne aktivnosti puta komplementa i ne može se pratiti do SI jedinica. Dodeljuje se korišćenjem objedinjenih humanih normalnih seruma procenjenih opisanom procedurom ELISA testa sa internim referentnim sistemom kao najvišim nivoom hijerarhije kalibracije.

### 4. UPOZORENJA, MERE OPREZA I MERE PREDOSTROŽNOSTI

- ZA *IN VITRO* DIJAGNOSTIČKU UPOTREBU.
- Komponente humanog seruma koje se koriste u pripremi kontrola u kompletu testirane su na prisustvo antitela na virus humane imunodeficijencije 1 i 2 (HIV 1 i 2), hepatitis C (HCV) kao i površinski antigen hepatitisa B metodama koje je odobrila uprava FDA i utvrđeno je da su negativne. Budući da nijedna metoda testiranja ne može da pruži potpunu sigurnost da su HIV, HCV, virus hepatitisa B ili drugi infektivni agensi odsutni, uzorcima i humanim reagensima treba rukovati kao da su u stanju da prenose infektivne agense.
- Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health preporučuju da se potencijalno infektivnim agensima rukuje na nivou biološke bezbednosti 2.
- Svi rastvori sadrže ProClin 300 kao konzervans. Nikada nemojte pipetirati ustima ili dozvoliti da reagensi ili uzorak pacijenta dođu u kontakt sa kožom. Reagensi koji sadrže ProClin mogu izazivati iritaciju. Izbegavajte kontakt sa kožom i očima. U slučaju kontakta, isperite sa puno vode.
- Bezbednosni list za sve opasne komponente sadržane u ovom kompletu dostupan je na zahtev od Svar Life Science.
- Nemojte koristiti komponente nakon isteka roka trajanja.
- Reagensi kompleta su specifični za komplet i ne smeju se mešati između serija kompleta.
- Odložite sve korišćene komponente, korišćene/preostale uzorke i ostatke kontrole kao biološki opasan otpad u skladu sa lokalnim propisima. Ostale preostale komponente odložite kao opasan otpad u skladu sa lokalnim propisima.
- Svaki ozbiljan incident koji se dogodio u vezi sa ovim uređajem mora se prijaviti kompaniji Svar Life Science AB i nadležnom organu države članice EU ili zemlje prebivališta korisnika/pacijenta.

Rastvor za ispiranje (30x konc.)



## UPOZORENJE

**Sadržaj:** Reakciona masa: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] i 2-methyl- 2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317 Može da izazove alergijske reakcije na koži.  
 H412 Štetno za živi svet u vodi sa dugotrajnim posledicama.  
 P261 Izbegavati udisanje spreja.  
 P273 Izbegavati ispuštanje u životnu sredinu.  
 P280 Nositi zaštitne rukavice.  
 P333 + P313 Ako dođe do iritacije kože ili osipa: Potražiti medicinski savet/mišljenje.

Pufer za razblaživanje CP, rastvor konjugata, negativna kontrola, pNPP supstrat

EUH208 Sadržaj „Reakciona masa: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] i 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)“ Može da izazove alergijske reakcije na koži.

EUH210 Bezbednosni list dostupan na zahtev.

## 5. SADRŽAJ KOMPLETA

- 1 zapečaćena ploča za mikrotitraciju sa odvojivim bunarčićima (12x8) obloženim humanim IgM-om.
- 2 bočice (35 ml) razblaživača CP (Dil CP), označene plavom bojom.
- 1 bočica (0,2 ml) negativne kontrole (NC) koja sadrži humani serum (koji se razblažuje kao za uzorak seruma pacijenta).
- 1 bočica (0,2 ml) pozitivne kontrole (PC) koja sadrži liofilizovani humani serum, pogledajte odeljak 9.3 „Rekonstitucija pozitivne kontrole“ u nastavku.
- 1 bočica (zapremina navedena u CoA) kontrole aktivnosti (AC) za polukvantitativnu primenu, koja sadrži liofilizovani humani serum (drugačijeg porekla nego PC), pogledajte odeljak 9.3.1 „Rekonstitucija kontrole aktivnosti“ u postupku za polukvantitativnu primenu.
- 1 bočica (13 ml) konjugata koji sadrži antitela na C5b-9 označena alkalnom fosfatazom (plava boja).
- 1 bočica (13 ml) rastvora supstrata pNPP, spremnog za upotrebu.
- 1 bočica (30 ml) rastvora za ispiranje, 30x koncentrisanog.

**Imajte na umu:** Zapremina za rekonstituciju AC je naznačena u sertifikatu o analizi (CoA) (XXX µl) i na etiketi AC-a.

## 6. POTREBNI MATERIJALI ILI OPREMA KOJI SE NE ISPORUČUJU

- Čitač mikroploče sa filterom od 405 nm.
- Precizne pipete sa vrhovima za jednokratnu upotrebu.
- Sredstvo za pranje traka, upijajući ubrusi, epruvete i tajmer.
- Inkubator koji može da održava temperaturu od 37 °C. Ako se koristi ormarić za CO<sub>2</sub>, postarajte se da je dovod CO<sub>2</sub> prekinut/isključen.

## 7. RUKOVANJE I SKLADIŠTENJE

- Reagense treba čuvati na temperaturi od 2–8 °C, sa izuzetkom pozitivne kontrole i kontrole aktivnosti.
- Svi reagensi u kompletu su spremni za upotrebu, osim rastvora za ispiranje i kontrola.

- Pozitivnu kontrolu i kontrolu aktivnosti treba čuvati na temperaturi od -20 °C do rekonstitucije.
- Rekonstituisanu pozitivnu kontrolu i kontrolu aktivnosti treba čuvati na temperaturi <-70 °C i smeju se jednom odmrznuti.

## 8. PRIPREMA UZORKA

Ovaj test se izvodi na uzorcima seruma. Uzorci krvi se prikupljaju korišćenjem aseptične tehnike venipunkcije, a serum se dobija standardnim procedurama. Preporučuje se uzimanje najmanje 5 ml pune krvi. Ostavite krv da se zgrušava u epruветama za serum, 60–65 minuta na sobnoj temperaturi (20–25 °C). Centrifugirajte uzorke krvi i prenesite serum bez ćelija u čistu epruветu.

Serumima se mora pravilno rukovati kako bi se sprečilo *in vitro* aktiviranje komplementa. Serume treba zamrznuti na temperaturi od -70 °C ili nižoj, u dobro zatvorenim epruветama za produženo skladištenje ili za transport na suvom ledu. Uzorci se ne smeju zamrzavati i odmrzavati više puta.

Nemojte koristiti serume koji su ikterični, lipemični i hemolizovani. Toplotno inaktivirani serumi se ne mogu koristiti. Plazma se ne može koristiti. Clinical and Laboratory Standards Institute navodi preporuke za čuvanje uzoraka krvi (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. PRIPREMA REAGENASA I RUKOVANJE NJIMA

### 9.1. Priprema rastvora za pranje

U slučaju da se kristali soli primećuju u bočici sa koncentrovanim rastvorom za pranje, stavite bočicu na temperaturu od 37 °C u vodeno kupatilo dok se kristali ne rastvore pre razblaživanja rastvora za pranje.

Razblažite 30 ml 30x koncentrovanog rastvora za pranje u 870 ml destilovane vode. Kada se čuva na temperaturi od 2–8 °C, razblaženi rastvor za pranje je stabilan do datuma isteka kompleta.

### 9.2. Negativna kontrola (NC)

NC treba razblažiti kao uzorak seruma pacijenta.

### 9.3. Rekonstitucija pozitivne kontrole (PC)

Rekonstituisati PC na sledeći način:

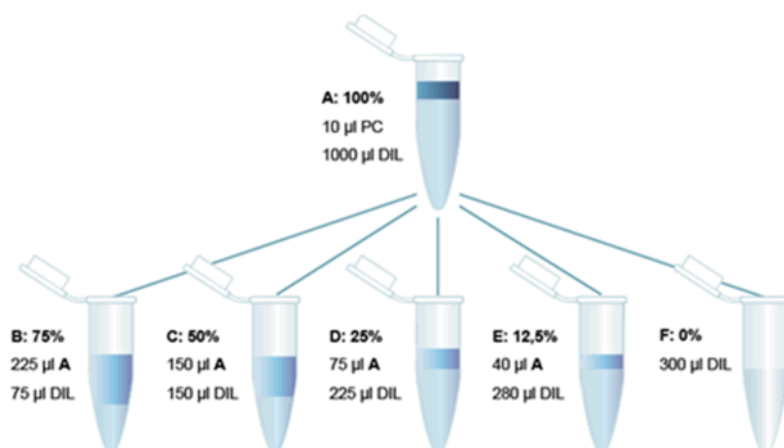
1. Nežnim tapkanjem spustite sav liofilizovani materijal na dno bočice i skinite poklopac.
2. Odmah dodajte 200 µl destilovane vode direktno u liofilizovani materijal.
3. Vratite poklopac.
4. Ostavite bočicu da stoji na ledu 5 minuta, a zatim je lagano tresite ili vrtložite povremeno dok se potpuno ne rastvori.
5. Za dalje razblaživanje, pogledajte odeljak 9.3.1 ili 9.3.2 za polukvantitativni, odnosno kvalitativni protokol.

Rekonstituisana PC se može čuvati do 4 sata pre upotrebe ako se čuva na temperaturi od 2–8 °C ili na ledu. Treba je čuvati na temperaturi od <-70 °C i sme se jednom odmrznuti.

#### 9.3.1. Polukvantitativni protokol

##### Priprema kalibracione krive

Za razblaživanje rekonstituisanih PC na kalibratore pogledajte sliku 2 i tabelu 1. Kalibrator se može ostaviti na sobnoj temperaturi do 1 č pre upotrebe. Kalibrator mora biti pripremljen svež i ne sme se skladištiti za kasniju upotrebu.



**Tabela 1:** Zapremine za razblaživanje kalibracione krive.

Kriva kalibratora	PC (µl)	DIL (µl)
A: 100%	10	1000
Od 100% (µl)		
B: 75%	225	75
C: 50%	150	150
D: 25%	75	225
E: 12.5%	40	280
F: 0%	0	300

**Slika 2:** Šema razblaživanja za kalibracionu krivu. Rekonstituisana pozitivna kontrola (PC) se meša sa razblaživačem kompleta (DIL) prema tabeli.

### Rekonstitucija kontrole aktivnosti (AC)

1. Nežnim tapkanjem spustite sav liofilizovani materijal na dno bočice i skinite poklopac.
2. Odmah dodajte zapreminu destilovane vode naznačenu na etiketi CoA/AC direktno na liofilizovani materijal.
3. Vratite poklopac.
4. Ostavite bočicu na ledu 5 minuta, a zatim je lagano protresite ili vorteksirajte do potpunog rastvaranja.
5. Razblažite rekonstituisanu kontrolu na isti način kao i uzorak seruma pacijenta.

Rekonstituisana kontrola aktivnosti se može čuvati do 4 sata pre upotrebe ako se čuva na temperaturi od 2–8 °C ili na ledu. Treba je čuvati na temperaturi od <-70 °C i sme se jednom odmrznuti.

### 9.3.2. Kvalitativni protokol

Razblažite rekonstituisanu pozitivnu kontrolu u skladu sa uputstvima u odeljku 9.4: Razblaživanje uzoraka.

### 9.4. Rukovanje serumom

Delimično odmrznite smrznute serume kratkim stavljanjem u vodeno kupatilo temperature 37 °C uz nežno mešanje. Nakon delimičnog odmrzavanja, odmah stavite epruvete na led i ostavite ih tako dok se potpuno ne odmrznu. Kratko promešajte u vortex mešalici.

### Razblaživanje uzoraka

Razblažite serum 1/101 razblaživačem CP, sa plavom etiketom, (500 µl razblaživača + 5 µl seruma) i dobro, ali nežno promešajte u vortex mešalici. Razblaženi serum se može ostaviti na sobnoj temperaturi najviše 60 minuta pre analize.

## 10. POSTUPAK ANALIZE

### 10.1. Protokol ispiranja

Ispraznite bunarčice i operite ih 3 puta sa 300  $\mu$ l rastvora za pranje, svaki put napunite i ispraznite bunarčice. Nakon poslednjeg pranja, ispraznite bunarčice tapkanjem trake o upijajući ubrus.

### 10.2. Raspored ploča

#### 10.2.1. Polukvantitativni protokol

Pipetirajte 100  $\mu$ l/bunarčić u duplikatu kalibratora (100%–0%), NC, AC i razblažene uzorke seruma (P) prema tabeli 2. Kalibrator 0% treba koristiti kao slepu probu.

**Tabela 2:** Predloženi raspored ploča, polukvantitativni protokol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100%	12,5%	P1									
<b>B</b>	100%	12,5%	P1									
<b>C</b>	75%	0%	P2									
<b>D</b>	75%	0%	P2									
<b>E</b>	50%	NC	etc									
<b>F</b>	50%	NC										
<b>G</b>	25%	AC										
<b>H</b>	25%	AC										

#### 10.2.2. Kvalitativni protokol

Pipetirajte 100  $\mu$ l/bunarčić u duplikatu razblaživača kao slepu probu, PC, NC i razblažene uzorke seruma (P) prema tabeli 3.

**Tabela 3:** Predloženi raspored ploča, kvalitativni protokol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Dil CP	P2										
<b>B</b>	Dil CP	P2										
<b>C</b>	PC	etc										
<b>D</b>	PC											
<b>E</b>	NC											
<b>F</b>	NC											
<b>G</b>	P1											
<b>H</b>	P1											

### 10.3. Protokol testa

Uklonite samo onoliko bunarčića koliko je potrebno za testiranje, pažljivo zatvarajući aluminijumsku ambalažu. Sačekajte da svi rastvori dostignu sobnu temperaturu (20–25 °C) pre analize.

#### 1. Inkubacija uzoraka

Napunite ploču u skladu sa odeljkom 10.2. Inkubirajte 60–70 minuta na +37 °C sa poklopcem. Imajte na umu da ne treba vršiti inkubaciju pod atmosferom CO<sub>2</sub>. Ako se koristi ormarić za CO<sub>2</sub>, postarajte se da je dovod CO<sub>2</sub> prekinut/isključen.

#### 2. Pranje

Operite ploču u skladu sa odeljkom 10.1: Protokol ispiranja.

#### 3. Inkubacija konjugata

Dodajte 100 µl konjugata u svaki bunarčić. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi (+20–25 °C).

#### 4. Pranje

Operite 3 puta kao i ranije.

#### 5. Inkubacija supstrata

U svaki bunarčić dodajte 100 µl rastvora supstrata i inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi (+20–25 °C).

#### 6. Čitanje ploče

Pročitajte apsorbancu (OD) na 405 nm na čitaču mikroploča.

Opcionalno: 5 mM EDTA može da se koristi kao rastvor za zaustavljanje, 100 µl/bunarčić. Pročitajte apsorbancu bunarčića u roku od 60 minuta.

## 11. KONTROLA KVALITETA

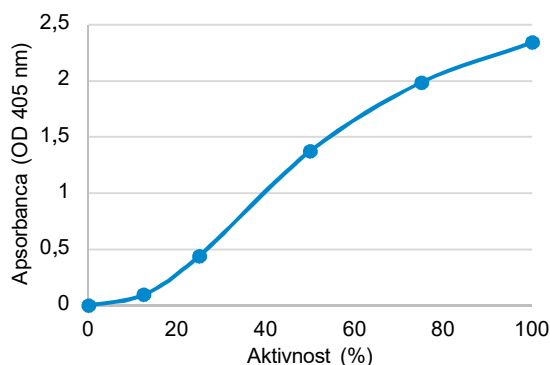
Sertifikat o analizi (CoA) koji se nalazi u kompletu je specifičan za seriju i treba da se koristi za verifikaciju rezultata dobijenih od strane naše laboratorije. Rezultati navedeni na CoA treba da se koriste samo kao smernica. Rezultati dobijeni od strane vaše laboratorije mogu se razlikovati.

OD PC -a bi trebalo da bude >1,0 a OD NC -a <0,2 nakon oduzimanja slepe probe (Dil CP, 0%). Ako bilo koja od kontrola nije u okviru odgovarajućih opsega, test treba smatrati nevažećim i zatim ga ponoviti.

## 12. TUMAČENJE REZULTATA

### 12.1. Polukvantitativni protokol

Oduzmite apsorbancu kalibratora od 0% od svih OD vrednosti. Preporučuje se logistička krivulja 4-parametara (Marquardt). Pogledajte primer standardne krivulje na slici 3.



**Slika 3:** Primer standardne krive. Na slici gore prikazan je primer polukvantitativne standardne krive i ne treba da se koristi za tumačenje stvarnog uzorka pacijenta.

U slučajevima kada su dobijene vrednosti uzorka veće od najvišeg kalibratora 100%, uzorci se mogu razblažiti 1/201 i ponovo testirati. Imajte na umu da dobijenu vrednost aktivnosti u ovom slučaju treba prilagoditi primenjenim razblaživanjima uzorka.

Preporučuje se da svaka laboratorija uspostavi svoj referentni nivo i graničnu vrednost za nedostatke.

## 12.2. Kvalitativni protokol

Preporučuje se da se rezultati koriste OD za izračunavanje vrednosti aktivnosti komplementa (% PC) vrednosti radi lakšeg tumačenja. Ovo izračunavanje takođe olakšava poređenje između različitih analiza jer je OD sklonija promenama između analiza. Metoda koja se koristi za izračunavanje aktivnosti komplementa je opisana u nastavku.

1. Oduzmite apsorbancu slepe probe (razblaživač) od apsorbanci NC, PC i uzoraka.
2. Izračunajte srednje vrednosti OD za NC PC i uzorke.
3. Izračunajte aktivnost komplementa koristeći formulu u nastavku:

$$\text{Aktivnost komplementa (\% PC - a)} = \frac{\text{Uzorak} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

NC i PC namenjeni su za praćenje značajne greške reagensa. PC neće osigurati preciznost na graničnoj vrednosti testa. Preporučuje se da svaka laboratorija uspostavi svoj referentni nivo i graničnu vrednost za nedostatke.

Negativan rezultat, tj. nedostatak, uvek treba proveriti testiranjem novog uzorka kako bi se osiguralo da nije došlo do nenamerne *in vitro* aktivacije komplementa pre izvršenja testa.

## 13. KRITERIJUMI VREDNOVANJA

### 13.1. Očekivani rezultati

Kada se pronađu smanjeni nivoi komponenti komplementa ili funkcije komplementa, kliničari razmatraju nedostatak ili tekući, imunološki proces, koji dovodi do povećanog razlaganja komponenti i smanjenja nivoa komplementa. Povećani nivoi komplementa su obično nespecifični izraz akutne faze odgovora.

WIESLAB® Complement system Classical pathway može doprineti otkrivanju nedostataka komplementa koji se odnose na klasični put. Potpunija i detaljnija funkcionalna procena sva tri puta komplementa može se postići koristeći WIESLAB® Complement system Screen kit, kao što je prikazano u tabeli 4.

**Tabela 4:** Kombinacija rezultata u različitim putevima i mogućih nedostataka.

Klasični put	MBL put	Alternativni put	Mogući nedostatak
Pozitivno	Pozitivno	Pozitivno	Nema
Negativno	Pozitivno	Pozitivno	C1q, C1r, C1s
Pozitivno	Pozitivno	Negativno	Faktor B, D i P
Pozitivno	Negativno	Pozitivno	MBL, MASP-2
Negativno	Negativno	Negativno	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativno	Negativno	Pozitivno	C4, C2 ili kombinacija

## 13.2. Ograničenja

Nivo komplementa pojedinačnog pacijenta ne može se koristiti kao mera težine bolesti, jer može varirati od pacijenta do pacijenta. Stoga je teško postići apsolutnu standardizaciju rezultata.

Ne treba se oslanjati na test kao jedinu osnovu za donošenje odluka o kliničkoj terapiji, već ga treba koristiti u kombinaciji sa kliničkim simptomima i rezultatima drugih dostupnih testova. Terapiju ne bi trebalo započinjati na osnovu rezultata testa komplementa. Početak ili promene terapije ne bi trebalo zasnivati samo na promenama u nivoima komplementa, već na pažljivom kliničkom posmatranju.

## 14. KARAKTERISTIKE PERFORMANSI

### 14.1. Kliničke performanse

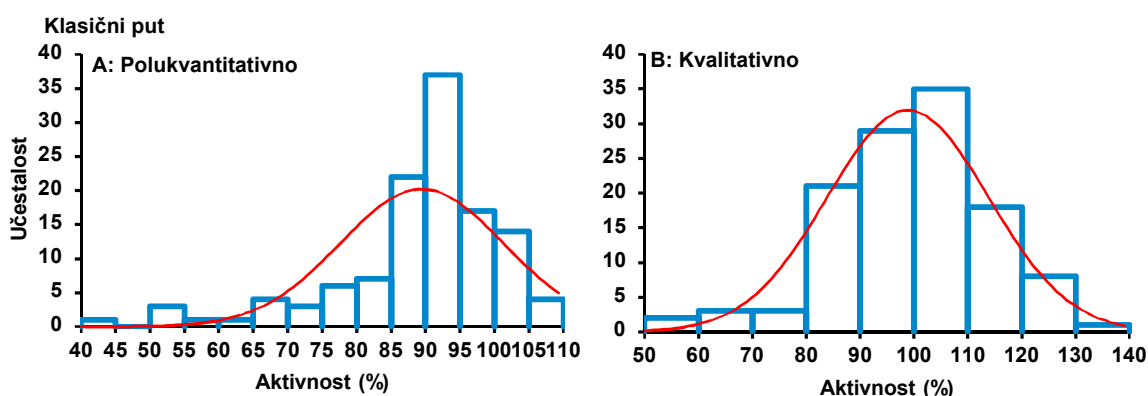
Normalna distribucija unutar 2SD (standardna devijacija) je prikazana na slici 4 i u tabeli 5. Rezultati unutar ovog opsega ukazuju na normalnu funkcionalnost klasičnog puta. Preporučuje se da svaka laboratorija potvrdi ili uspostavi sopstveni referentni opseg za populaciju sa kojom radi.

Vrednost ispod referentnih opsega ukazuje na povećanu aktivaciju, što dovodi do potrošnje kapaciteta klasičnog puta komplementa ili genetski određenu nisku aktivnost.

Vrednosti ispod 5% jasno ukazuju na potpuni nedostatak uzrokovan prekomernom aktivacijom ili naslednim nedostatkom u odgovarajućem putu. Da bi se utvrdilo koji faktori komplementa uzrokuju smanjenu aktivnost, potrebna je dalja analiza proteina komplementa.

Negativan rezultat, tj. suspekti nedostatak, uvek treba proveriti testiranjem novog uzorka kojim se pažljivo rukovalo, kako bi se osiguralo da nije došlo do *in vitro* aktivacije komplementa.

Serum od 120 naizgled zdravih davalaca krvi testiran je u WIESLAB® Complement system Classical pathway, kvalitativnom primenom. Za polukvantitativnu primenu, normalni opseg se zasniva na matematičkom teorijskom proračunu. Aktivnost komplementa 120 naizgled zdravih davalaca krvi je sažeta u slici 4 i tabeli 5. U studiji nijedan davalac krvi nije imao vrednost ispod 40%.



**Slika 4:** Histogram referentne populacije analizirane u pogledu klasičnog puta, polukvantitativnim (A), odnosno kvalitativnim (B) protokolom.

**Tabela 5:** Vrednosti za 120 davalaca krvi analiziranih polukvantitativnim, odnosno kvalitativnim protokolom.

Protokol	n	Srednja vrednost (%)	±2SD (%)	Medijana (%)
<b>Polukvantitativno</b>	120	89	66-113*	92
<b>Kvalitativno</b>	120	99	69-129*	100

\*) Ovo je statistički proračun i neće garantovati tačnu graničnu vrednost. Preporučuje se da svaka laboratorija uspostavi svoj referentni nivo i graničnu vrednost za suspektne nedostatke.

Ovim testom su testirani serumi sa poznatim nedostacima komplementa i serumom sa deplecijom specifičnog faktora komplementa (tabela 6 i 7). Svi serumi sa nedostatkom/deplecijom imali su niske vrednosti na testu, nižu od 15% i 5%\*\*)

\*\*) Pogledajte „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

**Tabela 6:** Uzorci sa poznatim nedostacima.

Nedostatak	C2	C3	C4	C5	C7	C8
<b>Broj pacijenata</b>	5	1	1	1	2	2
<b>Broj otkrivenih seruma sa nedostatkom</b>	5	1	1	1	2	2

**Tabela 7:** Uzorci sa deplecijom komponenti.

Deplecija	C1q	C3	C4	C5	C7
<b>Broj seruma sa deplecijom</b>	2	1	1	1	1
<b>Broj otkrivenih deplecija</b>	2	1	1	1	1

## 14.2. Preciznost

### 14.2.1. Inter-testna preciznost

#### Polukvantitativni protokol

**Tabela 8:** Inter-testna preciznost za polukvantitativnu primenu je određena testiranjem sedam uzoraka u osam replikata u tri različita navrata.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Srednja vrednost %</b>	71	73	69	72	25	35	31
<b>SD</b>	9	9	6	11	1	2	2
<b>CV %</b>	13%	13%	9%	15%	4%	5%	5%

#### Kvalitativni protokol

**Tabela 9:** Inter-testna preciznost za kvalitativnu primenu utvrđena je testiranjem tri uzorka u duplikatu. Rezultati su dobijeni za šest različitih ciklusa.

	1	2	3
<b>Srednja vrednost %</b>	98	92	21
<b>SD</b>	4,3	3,9	1,7
<b>CV %</b>	4	4	8

### 14.2.2. Intra-testna preciznost

#### Polukvantitativni protokol

**Tabela 10:** Inter-testna preciznost za polukvantitativnu primenu je utvrđena testiranjem sedam različitih uzoraka u osam replikata u jednom navratu.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Srednja vrednost %</b>	79	76	72	83	24	34	30
<b>SD</b>	10	11	6	9	0	1	1
<b>CV %</b>	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

#### Kvalitativni protokol

**Tabela 11:** Intra-testna preciznost za kvalitativnu primenu utvrđena je testiranjem jednog uzorka u 40 bunarčića.

Test	Srednja vrednost %	SD	CV %
<b>CP</b>	85	2,9	3

### 14.2.3. Varijacija između serija

#### Polukvantitativni protokol

**Tabela 12:** Varijacija između serija u polukvantitativnoj primeni utvrđena je testiranjem sedam uzoraka u duplikatu na tri različite serije od strane tri različite osobe.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Srednja vrednost %</b>	8	73	85	24	37	74	78
<b>SD</b>	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
<b>CV %</b>	10%	20%	15%	5%	5%	10%	8%

### 14.3. Linearnost

#### Polukvantitativni protokol

**Tabela 13:** Oporavak razblaživanja utvrđen je testiranjem pet serijskih razblaživanja za tri različita uzorka.

Uzorak	Razblaživanje	Srednja izmerena aktivnost (%)	Teorijska aktivnost (%)	Oporavak % korigovanog razblaživanja
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
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

### 14.4. Granica detekcije

#### Polukvantitativni protokol

**Opseg merenja kalibratora:** 12,5%–100%

**Granica detekcije (LoD) = 8%**

## 15. REŠAVANJA PROBLEMA

PROBLEM	MOGUĆI UZROCI	REŠENJE
<b>Kontrolne vrednosti su van opsega</b>	Pogrešna temperatura, vreme ili pipetiranje, reagensi se ne mešaju.	Proverite da li su vreme i temperatura tačni. Ponovite test.
	Unakrsna kontaminacija kontrola.	Pažljivo pipetirajte.
	Optički put nije čist.	Proverite da li ima zaprljanja ili mehurića vazduha u bunarčićima. Obrišite dno ploče i ponovo pročitajte.
	Kontrole (pozitivne i/ili kontrole aktivnosti) nisu pravilno rekonstituisane. Nepravilno razblaživanje kalibratora.	Proverite kontrole, rastvorite novu. Proverite pripremu i napravite novo razblaživanje.
<b>Svi rezultati testa negativni</b>	Nije dodat jedan reagens ili više njih, ili su dodati pogrešnim redosledom.	Ponovo proverite proceduru. Proverite da li postoje neiskorišćeni reagensi. Ponovite test.
	Ploča obložena antigenom je neaktivna.	Proverite da li ima primetne vlage u neiskorišćenim bunarčićima. Obrišite dno ploče i ponovo pročitajte.
	Serum je neaktivan.	Razblažite nove uzorke.
<b>Svi bunarčići za uzorke su vidljivo žuti</b>	Kontaminirani puferi ili reagensi.	Proverite zamućenost svih rastvora.
	Rastvor za pranje je kontaminiran.	Koristite čistu posudu. Proverite kvalitet vode koja se koristi za pripremu rastvora.
	Nepravilno razblaživanje seruma.	Ponovite test.
<b>Loša preciznost</b>	Prenos pipetom CV >5% ili uzorci nisu pomešani.	Proverite kalibraciju pipete. Koristite ponovljivu tehniku. Izbegavajte mehuriće vazduha u vrhu pipete.
	Serum ili reagensi nisu dovoljno pomešani ili nisu ujednačeni na sobnoj temperaturi.	Nežno i temeljno promešajte sve reagense i sačekajte da se ujednače na sobnoj temperaturi.
	Dodavanje reagensa traje predugo, nedoslednost u vremenskim intervalima.	Razvijte doslednu ujednačenu tehniku i koristite uređaj sa više vrhova ili automatski dozator da biste skratili vreme.
	Optički put nije čist.	Proverite da li ima mehurića vazduha u bunarčićima. Obrišite dno ploče i ponovo pročitajte.
	Pranje nije konzistentno, zarobljeni mehurići, zaostao rastvor za pranje u bunarčićima.	Proverite da li su svi ravnomerno napunjeni i aspirirani. Raspršite tečnost iznad nivoa reagensu u bunarčiću. Nakon poslednjeg pranja, ispraznite bunarčiće tapkanjem trake o upijajući ubrus.












## 16. REFERENCE IZ LITERATURE

- 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. J Immunol Methods. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. OPIS SIMBOLA

Na ambalaži i etiketi mogu se nalaziti sledeći simboli:

	Šifra serije.
	Kataloški broj.
	Rok upotrebe.
	Ograničenje temperature.
	Biološki rizik.
	Pročitajte uputstva za upotrebu.
	In vitro dijagnostička upotreba.
	Proizvođač.
	Sadrži dovoljnu količinu za 96 testova.
	Usaglašenost sa direktivnom 98/79/EZ o in vitro dijagnostičkim medicinskim uređajima.
	Opasnost po zdravlje.

Ag	Antigen (obložena ploča).
DIL	Razblaživač.
BUF WASH 30X	Pufer za pranje, 30x koncentrat.
CONTROL + LYO	Pozitivna kontrola.
CONTROL AC LYO	Liofilizovana kontrola aktivnosti.
CONTROL -	Negativna kontrola.
CONJ	Konjugat.
SUBS pNPP	Supstrat pNPP.
CH REP	Predstavnik za Švajcarsku.

## 18. ISTORIJA DOKUMENTA

Verzija	Promene
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Velike uređivačke promene sa novim izgledom dokumenta. Procedure za polukvantitativnu i kvalitativnu primenu su objedinjene i uvedeni su posebni podnaslovi tamo gde je to bilo potrebno.</p> <p>Dodata je informacija „Analizu treba da obavljaju obučeni laboratorijski stručnjaci“.</p> <p>Dodate su informacije o metrološkoj sledljivosti.</p> <p>Specifikacija za pozitivnu kontrolu je promenjena sa &gt;1 na &gt;1,0 radi pojašnjenja.</p> <p>Dodate su informacije o ormariću sa CO<sub>2</sub>.</p>
LABEL-DOC-0031 v 7.0	<p>Povećana je transparentnost u odeljku 14.1 da su polukvantitativni podaci zasnovani na matematičkom teorijskom proračunu.</p> <p>Vrednosti u tabeli 6 i 10 su ažurirane kako bi odgovarale evaluaciji učinka objavljenoj u verziji 5.0.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)

Instrucciones  
**WIESLAB<sup>®</sup> Complement system**  
Classical pathway  
Prueba cualitativa y semicuantitativa

Para uso diagnóstico in vitro

Inmunoensayo enzimático para evaluar la actividad funcional del complemento

- Tiras de microtitulación separables (12x8) 96 pocillos
- Conservar el kit a entre +2 °C y +8 °C de temperatura
- Conservar el control positivo y el control de actividad a -20 °C



N.º de documento LABEL-DOC-0031 7.0

Fecha de entrada en vigor: 22-Jan-2026



### 3. PRINCIPIO DE WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY

El ensayo del Wieslab® Complement system Classical pathway combina los principios del ensayo hemolítico de la activación del complemento con el uso de anticuerpos marcados específicos de un neoantígeno que se produce como resultado de la activación del complemento. La cantidad de neoantígeno generado es proporcional a la actividad funcional de la vía clásica.

En el Complement system Classical pathway kit, los pocillos de las tiras de microtitulación están recubiertos con un activador específico de la vía clásica. La combinación de la placa con la composición del tampón de dilución de la muestra y el nivel de dilución en el suero del paciente garantizan que solo se active la vía clásica. Durante la incubación del suero del paciente diluido en los pocillos, el recubrimiento específico activa el complemento.

A continuación, se lavan los pocillos y se detecta la cantidad de complejo C5b-9 formado en la superficie de la placa con un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina específico del neoantígeno C5b-9 que se genera en el proceso de formación del complejo de ataque a la membrana (MAC).

Después de un paso de lavado adicional, se realiza la detección de anticuerpos específicos mediante incubación con una solución de sustrato de fosfatasa alcalina. La cantidad de activación del complemento está relacionada con la intensidad del color y se mide en términos de absorbancia (densidad óptica o OD).

#### Trazabilidad metrológica

El valor obtenido con el control positivo se define como el 100 % de la actividad normal de la vía del complemento y no se puede hacer corresponder con unidades del SI. Se asigna utilizando una mezcla de sueros humanos normales evaluados mediante el procedimiento de ensayo ELISA descrito con un sistema de referencia interno como el nivel superior en la jerarquía de calibración.

### 4. ADVERTENCIAS, PRECAUCIONES Y NOTAS

- PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.
- Los componentes del suero humano que se utilizan para preparar los controles del kit se han analizado para detectar la presencia de anticuerpos contra los virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH 1 y 2), la hepatitis C (VHC), así como del antígeno de superficie de la hepatitis B, mediante métodos aprobados por la FDA y han dado resultados negativos. Puesto que ningún método de análisis puede ofrecer la garantía completa de la ausencia de VIH, VHC, virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos, es necesario manipular las muestras y los reactivos de origen humano como si pudiesen transmitir agentes infecciosos.
- Los Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health recomiendan manipular los agentes potencialmente infecciosos en el nivel 2 de bioseguridad.
- Todas las soluciones contienen ProClin 300 como conservante. No pipetee nunca con la boca ni permita que los reactivos o la muestra del paciente entren en contacto con la piel. Los reactivos que contienen ProClin pueden ser irritantes. Evite el contacto con la piel y los ojos. En caso de contacto, lave con agua abundante.
- La hoja de datos de seguridad de todos los componentes peligrosos presentes en este kit está disponible bajo petición a Svar Life Science.
- No utilice los componentes después de la fecha de caducidad.
- Los reactivos del kit son específicos del kit y no se deben mezclar entre kits de lotes distintos.
- Deseche todos los componentes usados, las muestras usadas o sobrantes y los controles sobrantes como residuos biológicos peligrosos conforme a las normas locales. Deseche los demás componentes sobrantes como residuos peligrosos conforme a las normas locales.
- Cualquier incidente grave que se produzca en relación con este dispositivo se debe notificar a Svar Life Science AB y a las autoridades competentes del Estado Miembro de la UE o del país donde esté establecido el usuario/paciente.

Solución de lavado (concentración 30x)



#### ADVERTENCIA

**Contiene:** Masa de reacción de 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] y 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 Evitar respirar el aerosol.  
 P273 Evitar su liberación al medio ambiente.  
 P280 Utilizar guantes de protección.  
 P333 + P313 En caso de irritación o erupción cutánea: consultar a un médico.

Tampón de dilución para CP, solución conjugada, control negativo, sustrato pNPP

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

## 5. CONTENIDO DEL KIT

- 1 placa de microtitulación sellada con pocillos separables (12x8) recubiertos con IgM humana.
- 2 viales (35 ml) de diluyente para CP (Dil CP), etiquetados en color azul.
- 1 vial (0,2 ml) de control negativo (NC) que contiene suero humano (para diluirlo como para una muestra de suero de paciente).
- 1 vial (0,2 ml) de control positivo (PC) que contiene suero humano liofilizado. Consulte la sección 9.3 "Reconstitución del control positivo", más adelante.
- 1 vial (ver volumen en CoA) de control de actividad (AC) para la aplicación semicuantitativa, que contiene suero humano liofilizado (origen distinto al de PC). Consulte la sección 9.3.1 "Reconstitución del control de actividad" en el procedimiento para la aplicación semicuantitativa.
- 1 vial (13 ml) de conjugado que contiene anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina contra C5b-9 (color azul).
- 1 vial (13 ml) de solución de sustrato pNPP, lista para usar.
- 1 vial (30 ml) de solución de lavado, concentrada 30x.

**Tenga en cuenta lo siguiente:** El volumen de reconstitución de AC se indica en el Certificado de análisis (CoA) (XXX µl) y en la etiqueta de AC.

## 6. MATERIALES O EQUIPOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Lector de microplacas con filtro a 405 nm.
- Pipetas de precisión con puntas desechables.
- Lavadora para tiras, tejido absorbente, tubos y cronómetro.
- Incubadora apta para mantener 37 °C. Si se utiliza una cabina de CO<sub>2</sub>, asegúrese de que el suministro de CO<sub>2</sub> esté desconectado/apagado.

## 7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

- Los reactivos deben permanecer almacenados a 2 °C-8 °C excepto los controles positivo y de actividad.
- Todos los reactivos del kit están listos para usar, excepto la solución de lavado y los controles.
- Los controles positivo y de actividad deben permanecer almacenados a -20 °C hasta su reconstitución.
- El control positivo reconstituido y el control de actividad deben permanecer almacenados a una temperatura inferior a -70 °C y solo se pueden descongelar una vez.

## 8. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Esta prueba se realiza con muestras de suero. Las muestras de sangre se deben obtener mediante una técnica de venopunción aséptica y el suero, mediante procedimientos estándar. Se recomienda utilizar 5 ml de sangre completa como mínimo. Deje que la sangre se coagule en tubos de suero de 60 a 65 minutos a temperatura ambiente (20 °C-25 °C). Centrifugue las muestras de sangre y transfiera suero libre de células a un tubo limpio.

Es necesario manipular los sueros correctamente para evitar la activación del complemento *in vitro*. Los sueros se deben congelar a -70 °C o menos en tubos sellados firmemente para su almacenamiento prolongado o para su transporte en hielo seco. Las muestras no se deben congelar y descongelar más de una vez.

No utilice sueros ictericos, lipémicos ni hemolizados. No se pueden utilizar sueros inactivados por calor. No se puede utilizar plasma. El Clinical and Laboratory Standards Institute proporciona recomendaciones para almacenar muestras de sangre (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. PREPARACIÓN Y MANIPULACIÓN DE REACTIVOS

### 9.1. Preparación de la solución de lavado

Si se observan cristales de sal en el vial con solución de lavado concentrada, introduzca el vial en un baño de agua a 37 °C hasta que los cristales se hayan disuelto antes de diluir la solución de lavado.

Diluya 30 ml de solución de lavado concentrada 30x en 870 ml de agua destilada. Almacenada a 2 °C-8 °C, la solución de lavado diluida se mantiene estable hasta la fecha de caducidad del kit.

### 9.2. Control negativo (NC)

NC se debe diluir como una muestra de suero del paciente.

### 9.3. Reconstitución del control positivo (PC)

Reconstituya el PC según el procedimiento siguiente:

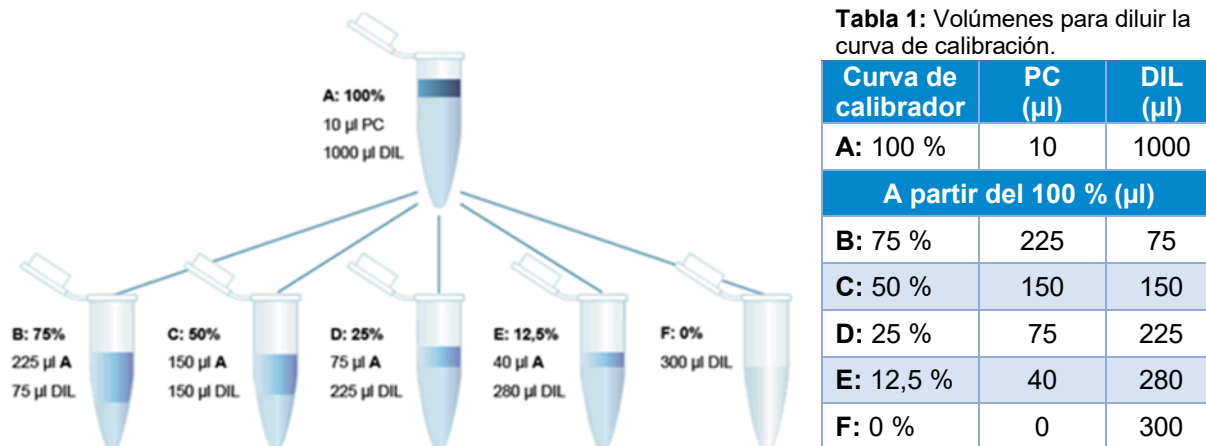
1. Golpee suavemente para que todo el material liofilizado quede en el fondo del vial y quite la cápsula de cierre.
2. Añada inmediatamente 200 µL de agua destilada directamente sobre el material liofilizado.
3. Vuelva a colocar la cápsula de cierre.
4. Deje reposar el vial en hielo durante 5 minutos y, a continuación, agítelo suavemente o en vórtex de vez en cuando hasta que se haya disuelto por completo.
5. Para una mayor dilución, consulte las secciones 9.3.1 o 9.3.2 relativas al protocolo semicuantitativo y cualitativo respectivamente.

El PC reconstituido se puede almacenar hasta 4 horas antes de su uso si se mantiene a 2 °C-8 °C o en hielo. Se debe conservar a <-70 °C y se puede descongelar una sola vez.

### 9.3.1. Protocolo semicuantitativo

#### Elaboración de la curva de calibración

Para diluir el PC reconstituido para calibrar, consulte la Figura 2 y la Tabla 1. El calibrador se puede dejar a temperatura ambiente hasta 1 hora antes de su uso. Es necesario preparar el calibrador nuevo y no se puede almacenar para un uso posterior.



**Figura 2:** Esquema de dilución para la curva con calibradores. El control positivo reconstituido (PC) se mezcla con el diluyente del kit (DIL) conforme a la tabla.

#### Reconstitución del control de actividad (AC)

1. Golpee suavemente para que todo el material liofilizado quede en el fondo del vial y quite la cápsula de cierre.
2. Añada inmediatamente el volumen de agua destilada que se indica en el CoA/la etiqueta del AC directamente sobre el material liofilizado.
3. Vuelva a colocar la cápsula de cierre.
4. Deje reposar el vial sobre hielo durante 5 minutos y, a continuación, agítelo suavemente o en vórtex hasta que se haya disuelto por completo.
5. Diluya el control reconstituido igual que se diluye una muestra de suero de paciente.

El control de actividad reconstituido se puede almacenar hasta 4 horas antes de su uso si se mantiene a 2 °C-8 °C o en hielo. Se debe conservar a <-70 °C y se puede descongelar una sola vez.

### 9.3.2. Protocolo cualitativo

Diluya el control positivo reconstituido según las instrucciones de la sección 9.4: Dilución de muestras.

### 9.4. Manipulación del suero

Descongele parcialmente los sueros congelados colocándolos brevemente en un baño de agua a 37 °C mientras mezcla suavemente. Después de descongelarlos parcialmente, coloque inmediatamente los tubos en hielo y déjelos allí hasta que estén completamente descongelados. Mézclelos brevemente en una mezcladora vortex.

#### Dilución de muestras

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

## 10. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

### 10.1. Protocolo de enjuague

Vacíe los pocillos y lave 3 veces con 300 µL de solución de lavado, llenando y vaciando los pocillos cada vez. Después del último lavado, vacíe los pocillos golpeando suavemente la tira sobre un paño absorbente.

### 10.2. Disposición de la placa

#### 10.2.1. Protocolo semicuantitativo

Pipetee 100 µL/pocillo por duplicado de calibrador (100 %-0 %), NC, AC y muestras de suero diluidas (P) de acuerdo con la Tabla 2. El calibrador al 0 % se debe usar como blanco.

**Tabla 2:** Disposición sugerida para la placa, protocolo semicuantitativo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100 %	12,5 %	P1									
<b>B</b>	100 %	12,5 %	P1									
<b>C</b>	75 %	0 %	P2									
<b>D</b>	75 %	0 %	P2									
<b>E</b>	50 %	NC	etc									
<b>F</b>	50 %	NC										
<b>G</b>	25 %	AC										
<b>H</b>	25 %	AC										

#### 10.2.2. Protocolo cualitativo

Pipetee 100 µL/pocillo por duplicado de diluyente como blanco, PC, NC y muestras de suero diluidas (P) conforme a la Tabla 3.

**Tabla 3:** Disposición sugerida para la placa, protocolo cualitativo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Dil CP	P2										
<b>B</b>	Dil CP	P2										
<b>C</b>	PC	etc										
<b>D</b>	PC											
<b>E</b>	NC											
<b>F</b>	NC											
<b>G</b>	P1											
<b>H</b>	P1											

### 10.3. Protocolo del ensayo

Extraiga solo la cantidad necesaria de pocillos para la prueba y vuelva a sellar el envase de aluminio con cuidado. Deje que todas las soluciones se templen a temperatura ambiente (20 °C-25 °C) antes de realizar el análisis.

#### 1. Incubación de las muestras

Llene la placa según se describe en la sección 10.2. Incúbela de 60 a 70 minutos a +37 °C con tapa. Tenga en cuenta que no se debe realizar ninguna incubación en atmósfera de CO<sub>2</sub>. Si se utiliza una cabina de CO<sub>2</sub>, asegúrese de que el suministro de CO<sub>2</sub> esté desconectado/apagado.

#### 2. Lavado

Lave la placa según se describe en la sección 10.1: Protocolo de enjuague.

#### 3. Incubación del conjugado

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

#### 4. Lavado

Lave 3 veces como antes.

#### 5. Incubación del sustrato

Añada 100 µL de solución de sustrato a cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (+20 °C-25 °C).

#### 6. Lectura de la placa

Lea la absorbancia (OD) a 405 nm en un lector de microplacas.

Opcional: se puede utilizar EDTA 5 mM como solución de parada, a razón de 100 µl/pocillo. Lea la absorbancia de los pocillos dentro del plazo de 60 minutos siguientes.

## 11. CONTROL DE CALIDAD

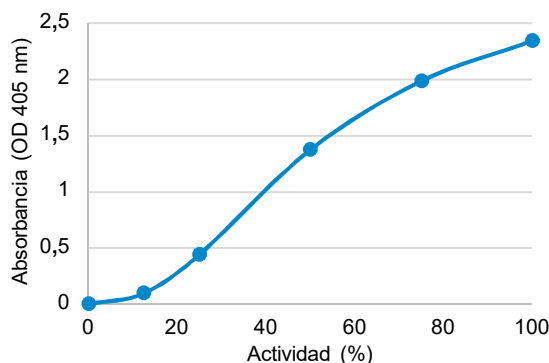
El certificado de análisis (CoA) incluido en el kit es específico del lote y se debe utilizar para verificar los resultados obtenidos por nuestro laboratorio. Los resultados indicados en el CoA solo sirven como guía. Los resultados obtenidos por su laboratorio pueden diferir.

El valor de OD del PC debe ser >1,0 y el valor de OD del NC debe ser <0,2 después de restar el valor de blanco (Dil CP, 0 %). Si alguno de los controles está fuera del intervalo que le corresponde, se debe considerar que la prueba no es válida y es necesario repetirla.

## 12. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 12.1. Protocolo semicuantitativo

Reste la absorbancia del calibrador al 0 % de todos los valores de OD. Se recomienda el ajuste con una curva logística de 4 parámetros (Marquardt). La Figura 3 muestra un ejemplo de una curva estándar.



**Figura 3:** Ejemplo de una curva estándar. La figura anterior muestra un ejemplo de curva estándar semicuantitativa y no se debe utilizar para interpretar muestras de pacientes reales.

En los casos donde los valores obtenidos para una muestra sean superiores al calibrador más alto al 100 %, es posible diluir las muestras 1/201 y volver a analizarlas. En este caso, es necesario ajustar el valor de actividad obtenido según la dilución aplicada a la muestra.

Se recomienda a cada laboratorio establecer su propio nivel de referencia y valor de corte para las deficiencias.

## 12.2. Protocolo cualitativo

Se recomienda utilizar los resultados de OD para calcular los valores de actividad del complemento (% de PC) para facilitar la interpretación. Este cálculo también facilita la comparación entre distintos análisis, ya que el valor de OD es más propenso a cambiar de una ejecución a otra. A continuación se describe el método que se utiliza para calcular la actividad del complemento.

1. Reste la absorbancia del blanco (diluyente) de las absorbancias de NC, PC y de las muestras.
2. Calcule los valores medios de OD correspondientes a NC, PC y las muestras.
3. Calcule la actividad del complemento utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{Actividad del complemento (\% de PC)} = \frac{\text{Muestra} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

Los controles NC y PC están destinados a monitorizar fallos sustanciales en los reactivos. El PC no garantiza la precisión en el punto de corte del ensayo. Se recomienda a cada laboratorio establecer su propio nivel de referencia y valor de corte para las deficiencias.

Siempre se deben verificar los resultados negativos, es decir, las deficiencias, analizando una nueva muestra para garantizar que no se haya producido ninguna activación involuntaria del complemento *in vitro* antes de realizar el ensayo.

## 13. CRITERIOS DE EVALUACIÓN

### 13.1. Resultados esperados

Cuando se encuentran niveles disminuidos de los componentes del complemento o de la función del complemento, los médicos consideran que existe una deficiencia o un proceso inmunológico en curso que da lugar a un aumento de la disgregación de los componentes y la reducción de los niveles del complemento. Por lo general, niveles elevados del complemento suelen ser una expresión inespecífica de una respuesta en fase aguda.

Wieslab® Complement system Classical pathway puede ser útil para detectar deficiencias del complemento relacionadas con la vía clásica. Se puede lograr una evaluación funcional más completa y en profundidad de las tres vías del complemento utilizando el Wieslab® Complement system Screen kit, como se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Combinación de los resultados de las diferentes vías y posibles deficiencias.

Vía clásica	Vía MBL (MP)	Vía alternativa	Posible deficiencia
Positivo	Positivo	Positivo	Ninguno
Negativo	Positivo	Positivo	C1q, C1r, C1s
Positivo	Positivo	Negativo	Factores B, D y P
Positivo	Negativo	Positivo	MBL, MASP-2
Negativo	Negativo	Negativo	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativo	Negativo	Positivo	C4, C2 o combinación

## 13.2. Limitaciones

No se puede utilizar el nivel de complemento de cada paciente individual como medida de la gravedad de una enfermedad, ya que puede variar de un paciente a otro. Por lo tanto, es difícil obtener una normalización absoluta de los resultados.

No se debe utilizar la prueba como única base para tomar decisiones sobre el tratamiento clínico, sino que se debe utilizar junto a los síntomas clínicos y los resultados de otras pruebas disponibles. No debe iniciarse un tratamiento basándose en el resultado del análisis del complemento. El inicio o los cambios en el tratamiento no deben basarse únicamente en los cambios en los niveles de complemento, sino en una observación clínica exhaustiva.

## 14. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

### 14.1. Funcionamiento clínico

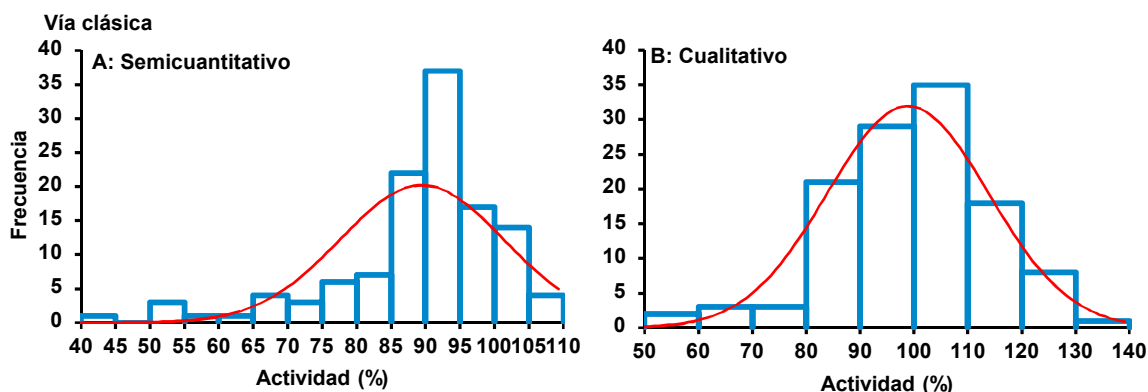
La Figura 4 y la Tabla 5 indican la distribución normal dentro de 2SD (desviación estándar). Los resultados dentro de este intervalo indican una funcionalidad normal de la vía clásica. Se recomienda a cada laboratorio confirmar o establecer su propio intervalo de referencia para la población a la que atiende.

Un valor por debajo de los intervalos de referencia indica una mayor activación, lo que resulta en el consumo de la capacidad de la vía clásica del complemento, o una actividad baja determinada genéticamente.

Los valores inferiores al 5 % sugieren decididamente una deficiencia completa por una activación excesiva o por una deficiencia hereditaria en la vía correspondiente. Para establecer qué factor(es) del complemento causa(n) la actividad reducida, es necesario realizar más análisis de las proteínas presentes en el complemento.

Siempre se deben verificar los resultados negativos, es decir, las sospechas de deficiencias, analizando una nueva muestra manipulada con cuidado para garantizar que no se haya producido ninguna activación del complemento *in vitro*.

Se analizaron muestras de suero de 120 donantes de sangre aparentemente sanos en WIESLAB® Complement system Classical pathway, con la aplicación cualitativa. En el caso de la aplicación semicuantitativa, el intervalo normal se basa en un cálculo matemático teórico. La actividad del complemento de los 120 donantes de sangre aparentemente sanos se resume en la Figura 4 y la Tabla 5. En el estudio, ningún donante de sangre estuvo por debajo del 40 %.



**Figura 4:** Histograma del análisis de la vía clásica en la población de referencia, mediante el protocolo semicuantitativo (A) y el cualitativo (B) respectivamente.

**Tabla 5:** Valores de los 120 donantes de sangre analizados mediante el protocolo semicuantitativo y el cualitativo respectivamente.

Protocolo	n	Media (%)	±2SD (%)	Mediana (%)
Semicuantitativo	120	89	66-113*	92
Cualitativo	120	99	69-129*	100

\*) Este es un cálculo estadístico y no garantiza un valor de corte real. Se recomienda a cada laboratorio establecer su propio nivel de referencia y valor de corte para la sospecha de deficiencia.

En el ensayo se analizaron sueros con deficiencias conocidas del complemento y sueros con depleción de factores específicos del complemento (Tablas 6 y 7). Todos los sueros deficientes/agotados dieron resultados bajos en el ensayo con valores inferiores al 15 % y al 5 %\*\* en los protocolos semicuantitativo y cualitativo, respectivamente.

\*\*) Véase "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 información sobre las pruebas ampliadas en muestras de pacientes con deficiencias analizadas conforme a la aplicación cualitativa.

**Tabla 6:** Muestras con deficiencias conocidas.

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

**Tabla 7:** Muestras con componentes agotados.

Agotamiento	C1q	C3	C4	C5	C7
Número de sueros con agotamiento	2	1	1	1	1
Número de agotamientos detectados	2	1	1	1	1

## 14.2. Precisión

### 14.2.1. Precisión entre ensayos

#### Protocolo semicuantitativo

**Tabla 8:** Para determinar la precisión de la aplicación semicuantitativa entre ensayos, se analizaron ocho réplicas de siete muestras en tres ocasiones distintas.

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

#### Protocolo cualitativo

**Tabla 9:** Para determinar la precisión de la aplicación cualitativa entre ensayos se analizaron tres muestras por duplicado. Se obtuvieron resultados de seis ejecuciones diferentes.

	1	2	3
Valor medio %	98	92	21
SD	4,3	3,9	1,7
CV en %	4	4	8

### 14.2.2 Precisión dentro del ensayo

#### Protocolo semicuantitativo

**Tabla 10:** Para determinar la precisión de la aplicación semicuantitativa dentro del ensayo, se analizaron ocho réplicas de siete muestras distintas en una sola ocasión.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Valor medio %</b>	79	76	72	83	24	34	30
<b>SD</b>	10	11	6	9	0	1	1
<b>CV en %</b>	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

#### Protocolo cualitativo

**Tabla 11:** Para determinar la precisión de la aplicación cualitativa dentro del ensayo se analizó una sola muestra en 40 pocillos.

Ensayo	Valor medio %	SD	CV en %
<b>CP</b>	85	2,9	3

### 14.2.3 Variación entre lotes

#### Protocolo semicuantitativo

**Tabla 12:** Para determinar la variación de la aplicación semicuantitativa entre lotes se analizaron siete muestras por duplicado en tres lotes distintos por parte de tres personas distintas.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Valor medio %</b>	8	73	85	24	37	74	78
<b>SD</b>	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
<b>CV en %</b>	10 %	20 %	15 %	5 %	5 %	10 %	8 %

### 14.3. Linealidad

#### Protocolo semicuantitativo

**Tabla 13:** Para determinar la recuperación de la dilución se analizaron cinco diluciones seriadas de tres muestras distintas.

Muestra	Dilución	Actividad media medida (%)	Actividad teórica (%)	% de recuperación corregido por dilución
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
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

#### **14.4. Límite de detección**

##### **Protocolo semicuantitativo**

**Intervalo de medición del calibrador:** 12,5 % - 100 %

**Límite de detección (LoD) = 8 %**

## 15. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS









PROBLEMA	POSIBLES CAUSAS	SOLUCIÓN
<b>Valores de control fuera del intervalo correcto.</b>	Temperatura, tiempo o pipeteo incorrectos; los reactivos no están mezclados.	Compruebe que el tiempo y la temperatura sean correctos. Repita la prueba.
	Contaminación cruzada de controles.	Pipetee con cuidado.
	La vía óptica no está limpia.	Compruebe si hay suciedad o burbujas de aire en los pocillos. Limpie la parte inferior de la placa y repita la lectura.
	Los controles (control positivo o control de actividad) no están bien reconstituidos. Dilución incorrecta del calibrador.	Compruebe los controles; disuelva controles nuevos. Compruebe la preparación y prepare una dilución nueva.
<b>Todos los resultados de las pruebas son negativos.</b>	No se ha añadido alguno de los reactivos, o se han añadido en orden incorrecto.	Vuelva a comprobar el procedimiento. Compruebe si hay reactivos no utilizados. Repita la prueba.
	La placa recubierta de antígeno está inactiva.	Compruebe si hay humedad evidente en los pocillos no utilizados. Limpie la parte inferior de la placa y repita la lectura.
	Suero inactivo.	Diluya muestras nuevas.
<b>Todos los pocillos de muestra están visiblemente amarillos.</b>	Tampones o reactivos contaminados.	Compruebe la turbidez de todas las soluciones.
	La solución de lavado está contaminada.	Utilice un recipiente limpio. Compruebe la calidad del agua que se utiliza para preparar la solución.
	Dilución incorrecta del suero.	Repita la prueba.
<b>Precisión deficiente.</b>	CV en pipeteo >5 % o las muestras no están mezcladas.	Compruebe la calibración de la pipeta. Utilice una técnica reproducible. Evite la presencia de burbujas de aire en la punta de la pipeta.
	El suero o los reactivos no están lo suficientemente mezclados o no se han templado a temperatura ambiente.	Mezcle todos los reactivos a conciencia pero con suavidad y deje que se templen a temperatura ambiente.
	Añadir los reactivos está llevando demasiado tiempo; hay incoherencias en los intervalos de tiempo.	Desarrolle una técnica uniforme y utilice un dispositivo de múltiples puntas o un dispensador automático para reducir el tiempo.
	La vía óptica no está limpia.	Compruebe si hay burbujas de aire en los pocillos. Limpie la parte inferior de la placa y repita la lectura.
	Lavado no uniforme, burbujas atrapadas, queda solución de lavado en los pocillos.	Compruebe que todos los pocillos se llenen y aspiren uniformemente. Dispense líquido por encima del nivel del reactivo en el pocillo. Después del último lavado, vacíe los pocillos golpeando suavemente la tira sobre un paño absorbente.




## 16. REFERENCIAS

- 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. J Immunol Methods. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. DESCRIPCIÓN DE LOS SÍMBOLOS

El envase y la etiqueta pueden presentar los símbolos siguientes:

	Código de lote.
	Número de catálogo.
	Fecha de caducidad.
	Límite de temperatura.
	Riesgo biológico.
	Consulte las instrucciones de uso.
	Para uso diagnóstico in vitro.
	Fabricante.

	<p>Contiene cantidad suficiente para 96 pruebas.</p>
	<p>Conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro.</p>
	<p>Peligro para la salud.</p>

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Ag</div>	<p>Antígeno (placa recubierta).</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DIL</div>	<p>Diluyente.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BUF</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">WASH</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">30X</div>	<p>Tampón de lavado, concentrado 30x.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">+</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">LYO</div>	<p>Control positivo.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">AC</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">LYO</div>	<p>Control de actividad liofilizado.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">-</div>	<p>Control negativo.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONJ</div>	<p>Conjugado.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">SUBS</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">pNPP</div>	<p>Sustrato pNPP.</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CH</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">REP</div>	<p>Representante suizo.</p>

## 18. HISTORIAL DEL DOCUMENTO

Versión	Cambios
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Cambios editoriales importantes con nuevo diseño del documento. Se han combinado los procedimientos de aplicación semicuantitativa y cualitativa y se han introducido subsecciones separadas cuando corresponde.</p> <p>Se ha añadido la información de que “El análisis debe ser realizado por profesionales de laboratorio con formación cabal”.</p> <p>Se ha añadido información sobre trazabilidad metrológica.</p> <p>Se ha cambiado la especificación sobre el control positivo de &gt;1 a &gt;1,0 como aclaración.</p> <p>Se ha añadido información sobre la cabina de CO<sub>2</sub>.</p>
LABEL-DOC-0031 v 7.0	<p>Más transparencia en la sección 14.1 respecto a que los datos semicuantitativos se basan en cálculos matemáticos teóricos.</p> <p>Se han actualizado los valores de las Tablas 6 y 10 para corresponder a la evaluación del funcionamiento publicada en la versión 5.0.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)

Instruktion  
**WIESLAB<sup>®</sup> Complement system**  
Classical pathway  
Kvalitativt och semikvantitativt test

För in vitro-diagnostisk användning

Enzymimmunanalys för bedömning av  
den funktionella aktiviteten i komplementsystemet

- Isärbrytbara mikrotitreringsstrips (12 × 8), 96 brunnar
- Förvara kitet vid +2–8 °C
- Förvara den positiva kontrollen och aktivitetskontrollen vid -20 °C



Dok.nr LABEL-DOC-0031 7.0

Gällande datum: 22-Jan-2026

## 1. AVSEDD ANVÄNDNING

Kitet med WIESLAB® Complement system Classical pathway (CP) är en enzymimmunanalys för kvalitativ och/eller semikvantitativ bestämning av den funktionella klassiska komplementvägen i humant serum. Analysen ska utföras av utbildad laboratoriepersonal.

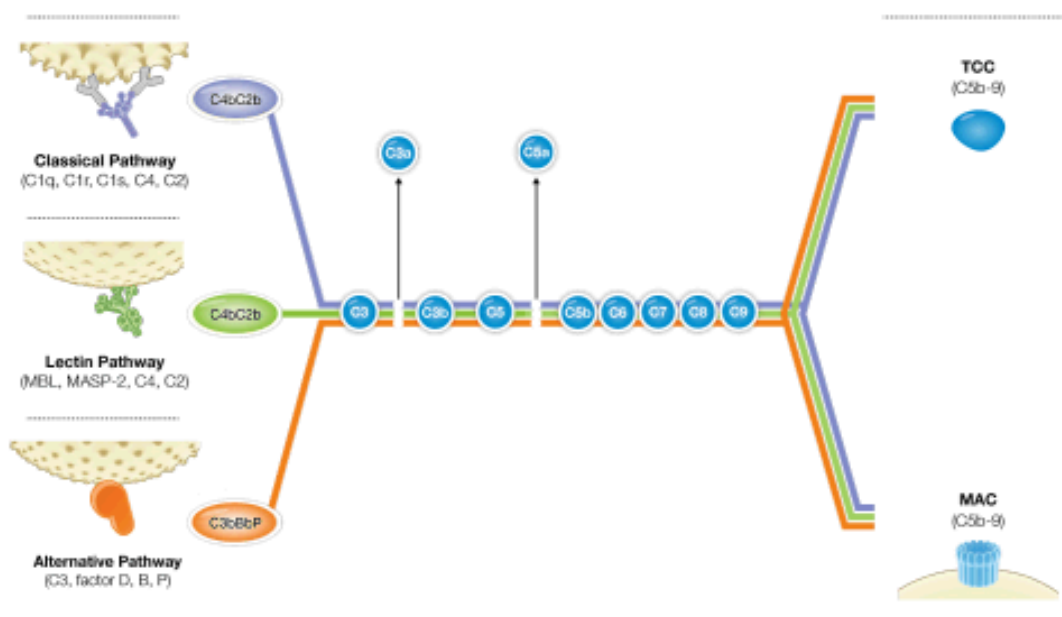
FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISK ANVÄNDNING.

## 2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Komplementsystemet spelar en viktig roll vid kroniska sjukdomar, autoimmuna sjukdomar och infektionssjukdomar. Komplementaktiveringen kan ske via tre olika aktiveringsvägar (figur 1): den klassiska vägen, MBL-vägen (lektin) och den alternativa vägen.

Nedsatt komplementaktivitet gör att människor blir mottagliga för upprepade fulminanta eller allvarliga infektioner och kan bidra till att autoimmuna sjukdomar utvecklas. Felaktig komplementaktivering bidrar till kronisk inflammation och vävnadsskada.

Aktivering av komplementkaskaden *in vitro* leder till att komplementkomponenterna förbrukas, vilket i sin tur leder till att deras koncentration minskar. Bestämning av komplementproteiner eller komplementaktivitet används således för att indikera om komplementsystemet har aktiverats genom en immunologisk och/eller patogen mekanism. Både funktionella och immunokemiska komplementmätningar används för att utvärdera patienter vid misstanke om en komplementaktiverande sjukdom eller om en nedärvd brist är möjlig. Nivån på komplementaktiviteten som utvärderas med funktionella analyser som WIESLAB Complement-kit tar hänsyn till den hastighet med vilken syntes, nedbrytning och förbrukning av komponenterna sker och ger ett mått på vägarnas integritet, i motsats till immunokemiska metoder som specifikt mäter koncentrationen av olika komplementkomponenter.



**Figur 1:** Schematisk bild av komplementsystemet. Komplementsystemet kan aktiveras via den klassiska vägen, MBL-vägen (lektin) eller den alternativa vägen genom olika aktiverande molekyler. Vid aktivering bildas C3-konvertas som i sin tur klyver C3 och därefter kan C5 klyvas. Klyvning av C5 till C5b initierar bildandet av MAC-komplex (även kallad terminala komplementkomplex (TCC) eller C5b-9).

### 3. PRINCIP FÖR WIESLAB® COMPLEMENT SYSTEM CLASSICAL PATHWAY

Analysen WIESLAB® Complement system Classical pathway kombinerar principerna för den hemolytiska analysen av komplementaktivering med användningen av märkta antikroppar specifika för ett neoantigen som produceras vid komplementaktivering. Mängden neoantigen som skapas är proportionerlig till den funktionella aktiviteten hos den klassiska vägen.

I Complement system Classical pathway kit är brunnarna på mikrotiterstripsen belagda med en specifik aktivator för den klassiska vägen. Plattan i kombination med provspädningsvätskans buffertsammansättning och patientserumets spädningsnivå säkerställer att endast den klassiska vägen aktiveras. Komplementet aktiveras av den specifika beläggningen under inkubationen av det utspädda patientserumet i brunnarna.

Brunnarna tvättas sedan och mängden C5b-9-komplex som bildas på plattans yta detekteras med en specifik antikropp, märkt med alkaliskt fosfat, mot C5b-9-neoantigenet som bildas under bildning av Membrane Attack Complex (membranattackkomplex) (MAC).

Efter ytterligare ett tvättsteg erhålls detektion av specifika antikroppar genom inkubation med en alkalisk fosfat substratlösning. Mängden komplementaktivering korrelerar med färgintensiteten och mäts genom absorbans (optisk densitet, OD).

#### Metrologisk spårbarhet

Värdet som tilldelas den positiva kontrollen definieras som 100 % av en normal komplementvägaktivitet och kan inte spåras till SI-enheter. Det tilldelas med hjälp av poolade normala humanserum som är bedömda enligt den beskrivna ELISA-analysproceduren med ett internt referenssystem som högsta kalibreringshierarkinivå.

### 4. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- FÖR *IN VITRO*-DIAGNOSTISK ANVÄNDNING.
- De humana serumkomponenter som används vid beredningen av kontrollerna i kitet har testats med avseende på närvaro av antikroppar mot humant immunbristvirus 1 och 2 (HIV 1 och 2), hepatit C (HCV) samt hepatit B-yntigen med metoder som godkänts av FDA, och resultatet av dessa tester var negativt. Eftersom inga testmetoder kan visa med fullständig säkerhet att HIV-, HCV- eller hepatit B-virus eller andra smittämnen saknas ska prover och humanbaserade reagens hanteras som om de kan överföra smittämnen.
- Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health rekommenderar att potentiellt smittsamma ämnen hanteras enligt biosäkerhetsnivå 2.
- Alla lösningar innehåller ProClin 300 som konserveringsmedel. Pipettera aldrig genom munnen och låt aldrig reagens eller patientprov komma i kontakt med huden. Reagens som innehåller ProClin kan orsaka irritation. Undvik kontakt med hud och ögon. Spola med mycket vatten om ämnet kommer i kontakt med hud eller ögon.
- Säkerhetsdatablad för alla farliga komponenter i detta kit finns tillgängligt på begäran från Svar Life Science.
- Använd inte komponenter efter sista förbrukningsdag.
- Kitreagens är kitspecifika och ska inte blandas mellan olika loter av samma kit.
- Kassera alla använda komponenter, använda/överblivna prover och överblivna kontroller som biologiskt farligt avfall enligt lokala bestämmelser. Kassera andra överblivna komponenter som farligt avfall enligt lokala bestämmelser.
- Alla allvarliga incidenter som har uppstått i samband med denna produkt ska rapporteras till Svar Life Science AB och den behöriga tillsynsmyndigheten i EU-medlemsstaten eller det land där användaren/patienten har sin hemvist.

Tvättlösning (konc. 30x)



## VARNING

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

H317 Kan orsaka en allergisk hudreaktion.  
 H412 Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer.  
 P261 Undvik att inandas sprej.  
 P273 Undvik utsläpp till miljön.  
 P280 Använd skyddshandskar.  
 P333 + P313 Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp.

Spädningsbuffert CP, konjugatlösning, negativ kontroll, pNPP-substrat

**EUH208** Innehåller "Reaktionsmassa av: 5-chloro-2-metyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] och 2-metyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)" Kan orsaka en allergisk reaktion.

**EUH210** Säkerhetsdatablad finns att rekvirera.

## 5. KITETS INNEHÅLL

- 1 förseglad mikrotiterplatta med isärbrytbara brunnar (12 × 8) belagda med humant IgM.
- 2 flaskor (35 ml) spädningsvätska CP (Dil CP), blå etikett.
- 1 flaska (0,2 ml) negativ kontroll (NC) som innehåller humant serum (som ska spädas som för ett patientserumprov).
- 1 flaska (0,2 ml) positiv kontroll (PC) som innehåller frystorkat humant serum, se avsnitt 9.3 "Rekonstitution av positiv kontroll" nedan.
- 1 flaska (för volym se CoA) aktivitetskontroll (AC) för semikvantitativ tillämpning, som innehåller frystorkat humant serum (annat ursprung än PC), se avsnitt 9.3.1 "Rekonstitution av aktivitetskontroll" under procedur för semikvantitativ tillämpning.
- 1 flaska (13 ml) konjugat som innehåller antikroppar, märkta med alkaliskt fosfat, mot C5b-9 (blå färg).
- 1 flaska (13 ml) pNPP-substratlösning, färdig att använda.
- 1 flaska (30 ml) tvättlösning, koncentrerad 30x.

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

## 6. MATERIAL ELLER UTRUSTNING SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

- Mikroplattläsare med filter 405 nm.
- Precisionspipetter med engångspetsar.
- Tvättmaskin för strips, absorberande material, rör och timer.
- Inkubator som kan hålla 37 °C. Om ett CO<sub>2</sub>-skåp används ska du säkerställa att CO<sub>2</sub>-försörjningen är fränkopplad/avstängd.

## 7. HANTERING OCH FÖRVARING

- Reagens ska förvaras vid 2–8 °C, förutom den positiva kontrollen och aktivitetskontrollen.
- Alla reagens i kitet är färdiga att använda utom tvättlösning och kontroller.

- Den positiva kontrollen och aktivitetskontrollen ska förvaras vid -20 °C fram till rekonstitution.
- Rekonstituerad positiv kontroll och aktivitetskontroll ska förvaras vid < -70 °C och kan tinas en gång.

## 8. PROVBBEREDNING

Detta test utförs på serumprover. Blodprover ska tas med aseptisk venpunktionsteknik och serum ska erhållas med standardförfaranden. Minst 5 ml helblod rekommenderas. Låt blodet koagulera i serumrör i 60–65 minuter vid rumstemperatur (20–25 °C). Centrifugera blodprover och överför cellfritt serum till ett rent rör.

Serum måste hanteras korrekt för att förhindra komplementaktivering *in vitro*. Serum ska frysas vid -70 °C eller lägre i tätt förslutna rör för längre förvaring eller för transport på torris. Prover ska inte frysas och tinas mer än en gång.

Använd inte serum som är ikteriska, lipemiska och hemolyserade. Värmeinaktiverade serum kan inte användas. Plasma kan inte användas. Clinical and Laboratory Standards Institute ger rekommendationer för förvaring av blodprover (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## 9. BEREDNING OCH HANTERING AV REAGENSER

### 9.1. Beredning av tvättlösning

Om saltkristaller observeras i flaskan med koncentrerad tvättlösning ska flaskan placeras i ett vattenbad som håller 37 °C tills kristallerna har lösts upp innan tvättlösningen spädes.

Späd 30 ml av den koncentrerade tvättlösningen (30x) i 870 ml destillerat vatten. När den spädda tvättlösningen förvaras vid 2–8 °C är den stabil fram till kitets sista förbrukningsdag.

### 9.2. Negativ kontroll (NC)

NC ska spädas som ett patientserumprov.

### 9.3. Rekonstitution av positiv kontroll (PC)

Rekonstituera PC enligt följande procedur:

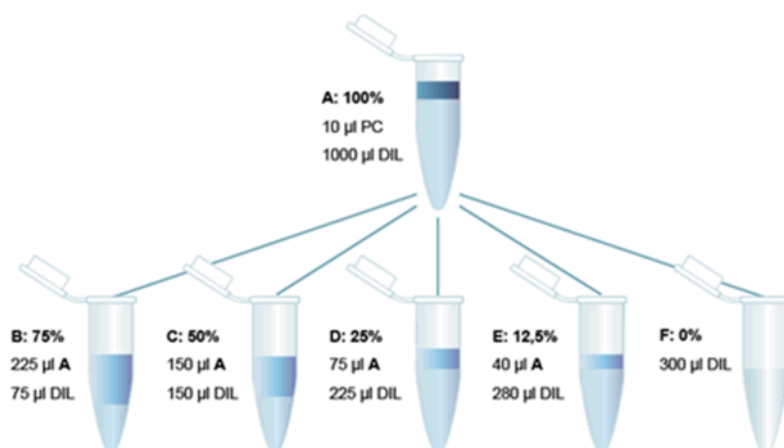
1. Knacka försiktigt på flaskan så att allt frystorkat material hamnar på botten och ta av locket.
2. Tillsätt omedelbart 200 µl destillerat vatten direkt till det frystorkade materialet.
3. Sätt tillbaka locket.
4. Låt flaskan stå på is i 5 minuter och skaka eller vortexblanda sedan flaskan försiktigt några gånger till fullständig upplösning.
5. För ytterligare utspädning finns information i avsnitt 9.3.1 och 9.3.2 gällande semikvantitativt respektive kvalitativt protokoll.

Rekonstituerad PC kan förvaras i upp till 4 timmar före användning om den förvaras vid 2–8 °C eller på is. Den ska förvaras vid < -70 °C och kan tinas en gång.

#### 9.3.1. Semikvantitativt protokoll

##### Förberedelse av kalibreringskurva

För spädning av rekonstituerade PC till kalibratorer, se figur 2 och tabell 1. Kalibratoren kan lämnas i rumstemperatur upp till 1 timme före användning. Kalibratoren måste förberedas i direkt anslutning till användningen och kan inte förvaras för senare användning.



**Tabell 1:** Volymen för utspädning av kalibreringskurvan.

Kalibratorkurva	PC (µl)	DIL (µl)
A: 100 %	10	1000
Från 100 % (µl)		
B: 75 %	225	75
C: 50 %	150	150
D: 25 %	75	225
E: 12,5 %	40	280
F: 0 %	0	300

**Figur 2:** Spädningsschema för kalibratorkurva. Rekonstituerad positiv kontroll (PC) blandas med spädningssmedlet i kitet (DIL) enligt tabellen.

### Rekonstitution av aktivitetskontroll (AC)

1. Knacka försiktigt på flaskan så att allt frystorkat material hamnar på botten och ta av locket.
2. Tillsätt omedelbart volymen destillerat vatten som anges på CoA/AC-etiketten direkt till det frystorkade materialet.
3. Sätt tillbaka locket.
4. Låt flaskan stå på is i 5 minuter och skaka eller vortexblanda sedan flaskan försiktigt till fullständig upplösning.
5. Späd den rekonstituerade kontrollen på samma sätt som ett patientserumprov.

Den rekonstituerade aktivitetskontrollen kan förvaras i upp till 4 timmar i 2–8 °C eller på is före användning. Den ska förvaras vid < -70 °C och kan tinas en gång.

### 9.3.2. Kvalitativt protokoll

Späd den rekonstituerade positiva kontrollen enligt instruktionerna i avsnitt 9.4: Spädning av prover.

### 9.4. Hantering av serum

Tina delvis upp fryst serum genom att kort placera det i ett vattenbad vid 37 °C och blanda försiktigt. Efter delvis upptining ska rören omedelbart placeras på is och stå där tills de är helt tinade. Blanda kort med en vortexblandare.

### Spädning av prover

Späd serumet 1/101 med spädningssväska CP, blå etikett (500 µl spädningssväska + 5 µl serum) och blanda noggrant men försiktigt med en vortexblandare. Spätt serum kan lämnas i rumstemperatur i högst 60 minuter före analys.

## 10. ANALYSPROCEDUR

### 10.1. Tvättprotokoll

Töm brunnarna och tvätta 3 gånger med 300 µl tvättlösning. Fyll och töm brunnarna varje gång. Efter den sista tvätten tömmer du brunnarna genom att knacka stripsen mot absorberande material.

### 10.2. Plattlayout

#### 10.2.1. Semikvantitativt protokoll

Pipettera 100 µl/brunn i duplikat av kalibrator (100 %–0 %), NC, AC och utspädda serumprover (P) enligt tabell 2. 0 %-kalibratoren ska användas som blank.

**Tabell 2:** Förslag på plattlayout, semikvantitativt protokoll.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100 %	12,5 %	P1									
<b>B</b>	100 %	12,5 %	P1									
<b>C</b>	75 %	0 %	P2									
<b>D</b>	75 %	0 %	P2									
<b>E</b>	50 %	NC	etc.									
<b>F</b>	50 %	NC										
<b>G</b>	25 %	AC										
<b>H</b>	25 %	AC										

#### 10.2.2. Kvalitativt protokoll

Pipettera 100 µl/brunn i duplikat av spädningsvätskan som blank, PC, NC och utspädda serumprover (P) enligt tabell 3.

**Tabell 3:** Förslag på plattlayout, kvalitativt protokoll.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Dil CP	P2										
<b>B</b>	Dil CP	P2										
<b>C</b>	PC	etc.										
<b>D</b>	PC											
<b>E</b>	NC											
<b>F</b>	NC											
<b>G</b>	P1											
<b>H</b>	P1											

### 10.3. Analysprotokoll

Ta endast bort det antal brunnar som behövs för testning. Återförslut aluminiumförpackningen noga. Låt alla lösningar bli rumstempererade (20–25 °C) före analys.

#### 1. Inkubation av prover

Fyll plattan enligt avsnitt 10.2. Inkubera i 60–70 minuter vid +37 °C med lock. Observera att inkubation inte ska utföras i CO<sub>2</sub>-atmosfär. Om ett CO<sub>2</sub>-skåp används ska du säkerställa att CO<sub>2</sub>-försörjningen är frånkopplad/avstängd.

#### 2. Tvätta

Tvätta plattan enligt avsnitt 10.1: Tvättprotokoll.

#### 3. Inkubation av konjugat

Tillsätt 100 µl konjugat till varje brunn. Inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur (+20–25 °C).

#### 4. Tvätta

Tvätta 3 gånger som tidigare.

#### 5. Inkubation av substrat

Tillsätt 100 µl substratlösning till varje brunn och inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur (+20–25 °C).

#### 6. Läsa av plattan

Läs av absorbansen (OD) vid 405 nm med en mikroplattläsare.

Ej obligatoriskt: 5 mM EDTA kan användas som stopplösning, 100 µl/brunn. Läs av brunnarnas absorbans inom 60 minuter.

## 11. KVALITETSKONTROLL

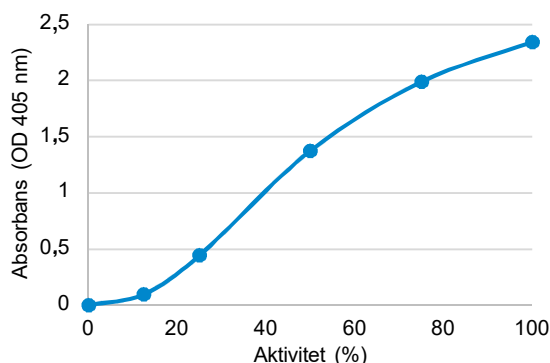
Analyscertifikatet (CoA) som ingår i kitet är specifikt för varje lot och ska användas för att verifiera resultat som erhållits av vårt laboratorium. Resultaten som anges på analyscertifikatet ska endast användas som riktlinje. Resultaten från ditt laboratorium kan skilja sig åt.

OD av PC ska vara > 1,0 och OD av NC < 0,2 efter subtraktion av blank (Dil CP, 0 %). Om någon av kontrollerna inte ligger inom sina respektive intervall ska testet anses ogiltigt och upprepas.

## 12. TOLKNING AV RESULTAT

### 12.1. Semikvantitativt protokoll

Subtrahera absorbansen för 0 %-kalibratoren från alla OD-värden. Logistikmodellen "Curve fit 4-parameter" (Marquardt) rekommenderas. I figur 3 visas ett exempel på en standardkurva.



**Figur 3:** Exempel på en standardkurva. Figuren ovan visar ett exempel på en semikvantitativ standardkurva och ska inte användas för faktisk tolkning av patientprov.

I de fall de erhållna provvärdena är högre än den högsta kalibratorn 100 %, kan proverna spädas 1/201 och testas igen. Observera att det erhållna aktivitetsvärdet i detta fall bör justeras enligt provspädningen.

Det rekommenderas att varje laboratorium fastställer sin egen referensnivå och sitt eget gränsvärde för brister.

## 12.2. Kvalitativt protokoll

Vi rekommenderar att OD-resultaten används för att beräkna komplementaktivitetsvärden (% av PC) för att underlätta tolkningen. Denna beräkning underlättar även jämförelser mellan olika analyser då OD är mer benäget att ändras mellan körningarna. Metoden som används för att beräkna komplementaktivitet beskrivs nedan.

1. Subtrahera absorbansen för blank (spädningsmedlet) från absorbanserna för NC, PC och proverna.
2. Beräkna OD-medelvärdena för NC, PC och proverna.
3. Beräkna komplementaktiviteten med hjälp av formeln nedan:

$$\text{Komplementaktivitet (\% av PC)} = \frac{\text{Prov} - \text{NC}}{\text{PC} - \text{NC}} \times 100$$

NC och PC är avsedda att upptäcka betydande reagensfel. PC säkerställer inte precision vid analysens gränsvärde (cut-off). Det rekommenderas att varje laboratorium fastställer sin egen referensnivå och sitt eget gränsvärde för brister.

Ett negativt resultat, dvs. brist, ska alltid verifieras genom att testa ett nytt prov för att säkerställa att ingen oavsiktlig komplementaktivering har ägt rum *in vitro* innan analysen genomfördes.

## 13. UTVÄRDERINGSKRITERIER

### 13.1. Förväntade resultat

När minskade nivåer av komplementkomponenter eller komplementfunktion upptäcks överväger läkare om det rör sig om en brist eller en pågående immunologisk process som leder till ökad nedbrytning av komponenter och sänkning av komplementnivåerna. Ökade komplementnivåer är vanligtvis ett icke-specifikt uttryck av ett akutfassvar.

WIESLAB® Complement system Classical pathway kan vara till hjälp för att upptäcka komplementbrister relaterade till den klassiska vägen. En mer fullständig och djupgående bedömning av funktionen hos alla tre komplementvägarna kan uppnås med WIESLAB® Complement system Screen kit som visas i tabell 4.

**Tabell 4:** Kombination av resultat i de olika vägarna och eventuella brister.

Klassiska vägen	MBL-vägen	Alternativa vägen	Möjlig brist
Positiv	Positiv	Positiv	Ingen
Negativ	Positiv	Positiv	C1q, C1r, C1s
Positiv	Positiv	Negativ	Faktor B, D och P
Positiv	Negativ	Positiv	MBL, MASP-2
Negativ	Negativ	Negativ	C3, C5, C6, C7, C8, C9
Negativ	Negativ	Positiv	C4, C2 eller kombination

## 13.2. Begränsningar

Den enskilda patientens komplementnivå kan inte användas som ett mått på sjukdomens svårighetsgrad eftersom denna kan variera från patient till patient. Det är därför svårt att uppnå en fullständig standardisering av resultaten.

Testet ska inte användas som den enda grunden till beslut om klinisk behandling, utan ska användas i kombination med kliniska symtom och resultaten av andra tillgängliga tester. Behandling ska inte sättas in baserat på resultatet av komplementanalysen. Insättning eller förändringar av behandling ska inte baseras endast på förändringar av komplementnivåerna utan på noggrann klinisk observation.

## 14. PRESTANDAEGENSKAPER

### 14.1. Klinisk prestanda

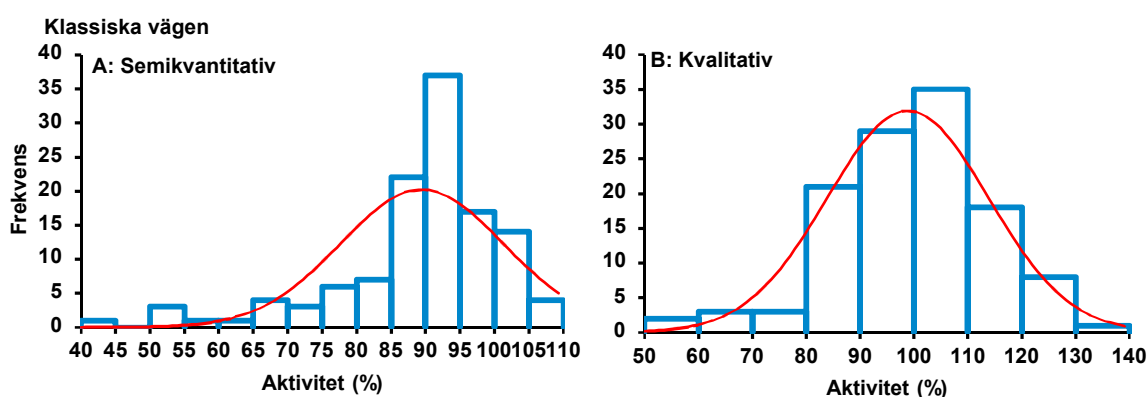
Normalfördelningen inom 2 SD (standardavvikelser) anges i figur 4 och tabell 5. Resultat inom detta intervall indikerar att den klassiska vägen fungerar normalt. Varje laboratorium bör bekräfta eller fastställa sitt eget referensintervall för aktuell population.

Ett värde under referensintervallen indikerar antingen ökad aktivering, vilket leder till förbrukning av den klassiska komplementvägens kapacitet, eller en genetiskt betingad låg aktivitet.

Värden under 5 % tyder starkt på en fullständig brist som antingen orsakas av överdriven aktivering eller en nedärvd brist i respektive väg. Ytterligare analys av komplementproteiner behövs för att kunna fastställa vilken/vilka komplementfaktor(er) som orsakar den sänkta aktiviteten.

Ett negativt resultat, dvs. misstänkt brist, ska alltid verifieras genom att testa ett nytt prov som hanteras med försiktighet för att säkerställa att ingen oavsiktlig komplementaktivering har ägt rum *in vitro* innan analysen genomfördes.

Serum från 120 till synes friska blodgivare testades i den WIESLAB® Complement system Classical pathway kvalitativa tillämpningen. För den semikvantitativa tillämpningen baseras normalintervallet på matematisk teoretisk beräkning. Komplementaktiviteten hos de 120 till synes friska blodgivarna sammanfattas i figur 4 och tabell 5. I studien låg ingen blodgivare under 40 %.



**Figur 4:** Histogram av referenspopulationen analyserad i protokoll för klassiska vägen, semikvantitativt (A) respektive kvalitativt (B).

**Tabell 5:** Värderna för de 120 blodgivarna som analyserats med semikvantitativt respektive kvalitativt protokoll.

Protokoll	n	Medelvärde (%)	± 2 SD (%)	Median (%)
Semikvantitativ	120	89	66–113*	92
Kvalitativ	120	99	69–129*	100

\*) Detta är en statistisk beräkning och garanterar inte ett faktiskt gränsvärde (cut-off). Det rekommenderas att varje laboratorium fastställer sin egen referensnivå och sitt eget gränsvärde för misstänkta brister.

Serum med känd komplementbrist och serum med deplektion på specifik komplementfaktor testades i analysen (tabell 6 och 7). Alla serum med brist/deplektion var låga i analysen och gav värden under 15 % och 5 %\*\* i det semikvantitativa respektive kvalitativa protokollet.

\*\*\*) 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" för information om utökade tester av patientprover med brister som testats med kvalitativ tillämpning

**Tabell 6:** Prover med kända brister.

Brist	C2	C3	C4	C5	C7	C8
Antal patienter	5	1	1	1	2	2
Antal serum med brist som detekterades	5	1	1	1	2	2

**Tabell 7:** Prover med deplektion av komponenter.

Deplektion	C1q	C3	C4	C5	C7
Antal serum med deplektion	2	1	1	1	1
Antal upptäckta depletioner	2	1	1	1	1

## 14.2. Precision

### 14.2.1. Precision mellan analyser

#### Semikvantitativt protokoll

**Tabell 8:** Precision mellan analyserna för den semikvantitativa tillämpningen bestämdes genom att testa sju prover i åtta replikat vid tre olika tillfällen.

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

#### Kvalitativt protokoll

**Tabell 9:** Precision mellan analyserna för den kvalitativa tillämpningen bestämdes genom att testa tre prover i duplikat. Resultat erhöles för sex olika körningar.

	1	2	3
Medelvärde %	98	92	21
SD	4,3	3,9	1,7
CV %	4	4	8

### 14.2.2. Precision inom analys

#### Semikvantitativt protokoll

**Tabell 10:** Precision inom analysen för den semikvantitativa tillämpningen bestämdes genom att testa sju olika prover i åtta replikat vid ett tillfälle.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Medelvärde %</b>	79	76	72	83	24	34	30
<b>SD</b>	10	11	6	9	0	1	1
<b>CV %</b>	13%	15%	8%	10%	2%	4%	2%

#### Kvalitativt protokoll

**Tabell 11:** Precision inom analysen för den kvalitativa tillämpningen bestämdes genom att testa ett prov i 40 brunnar.

Analys	Medelvärde %	SD	CV %
<b>CP</b>	85	2,9	3

### 14.2.3. Variation mellan batchar

#### Semikvantitativt protokoll

**Tabell 12:** Variation mellan batchar i den semikvantitativa tillämpningen bestämdes genom att testa sju prover i duplikat på tre olika batchar av tre olika personer.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Medelvärde %</b>	8	73	85	24	37	74	78
<b>SD</b>	0,80	14,55	12,50	1,32	1,91	7,46	6,08
<b>CV %</b>	10 %	20 %	15 %	5 %	5 %	10 %	8 %

### 14.3. Linjäritet

#### Semikvantitativt protokoll

**Tabell 13:** Spädningsutbyte bestämdes genom att testa fem serieutspädningar för tre olika prover.

Prov	Spädning	Genomsnittlig uppmätt aktivitet (%)	Teoretisk aktivitet (%)	% utbyte med spädningskorrigering
1	1/200	55	55	100
	1/400	32	28	114
	1/800	17	14	121
	1/1600	0	7	0
2	1/200	46	46	100
	1/400	25	23	109
	1/800	13	12	108
	1/1600	6	6	100
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

#### **14.4. Detektionsgräns**

##### **Semikvantitativt protokoll**

**Kalibrators mätområde:** 12,5 %–100 %

**Detektionsgräns (LoD) = 8 %**

## 15. FELSÖKNING









PROBLEM	MÖJLIGA ORSAKER	ÅTGÄRD
<b>Kontrollvärden utanför intervallet.</b>	Felaktig temperatur, tid eller pipettering, bristfällig blandning av reagens.	Kontrollera att tiden och temperaturen stämde. Upprepa testet.
	Korskontaminering av kontroller.	Pipettera försiktigt.
	Den optiska banan är inte ren.	Kontrollera om det finns smuts eller luftbubblor i brunnarna. Torka av plattans botten och läs av igen.
	Kontroller (positiva kontroller och/eller aktivitetskontroller) är inte korrekt rekonstituerade. Felaktig spädning av kalibrator.	Kontrollera kontrollerna och lös upp en ny. Kontrollera beredningen och gör en ny spädning.
<b>Alla testresultat är negativa.</b>	Ett eller flera reagens har inte tillsatts eller har tillsatts i fel ordning.	Kontrollera proceduren igen. Kontrollera om det finns oanvända reagens. Upprepa testet.
	Antigenbelagd platta är inaktiv.	Kontrollera om det finns synlig fukt i oanvända brunnar. Torka av plattans botten och läs av igen.
	Serum inaktivt.	Späd nya prover.
<b>Alla provbrunnar är synligt gula.</b>	Kontaminerade buffertar eller reagens.	Kontrollera alla lösningar beträffande grumlighet.
	Tvättlösningen är kontaminerad.	Använd en ren behållare. Kontrollera kvaliteten på vattnet som används för att bereda lösningen.
	Felaktig spädning av serum.	Upprepa testet.
<b>Dålig precision.</b>	Pipettleverans CV > 5 % eller prover ej blandade.	Kontrollera pipettens kalibrering. Använd reproducerbar teknik. Undvik luftbubblor i pipettspetsen.
	Serum eller reagens blandas inte tillräckligt eller har inte antagit rumstemperatur.	Blanda alla reagens försiktigt men noggrant och låt dem anta rumstemperatur.
	Reagenstillsetsen tar för lång tid, inkonsekvens i tidsintervall.	Utveckla en konsekvent, enhetlig teknik och använd en enhet med flera spetsar eller en automatisk dispenseringsenhet om proceduren behöver ta kortare tid.
	Den optiska banan är inte ren.	Kontrollera om det finns luftbubblor i brunnarna. Torka av plattans botten och läs av igen.
	Tvättningen är inte konsekvent, det finns bubblor eller tvättlösning kvar i brunnarna.	Kontrollera att alla brunnar är fyllda och aspireras jämnt. Dispensera vätska över reagensnivån i brunnen. Efter den sista tvätten tömmer du brunnarna genom att knacka stripsen mot absorberande material.




## 16. LITTERATURREFERENSER

- 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.
- Fredrikson GN *et al.* New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. J Immunol Methods. 1993 Dec 3;166(2):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.

## 17. BESKRIVNING AV SYMBOLER

Följande symboler kan förekomma på förpackningen och etiketten:

	Batchkod.
	Katalognummer.
	Sista användningsdatum.
	Temperaturgräns.
	Biologisk risk.
	Se bruksanvisningen.
	In vitro-diagnostisk användning.
	Tillverkare.

	Innehåller tillräckligt material för 96 tester.
	Överensstämmer med direktivet 98/79/EG om medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik.
	Hälsorisk.

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Ag</div>	Antigen (belagd platta).
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DIL</div>	Spädningsvätska.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BUF</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">WASH</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">30X</div>	Tvättbuffert, koncentrat 30x.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">+</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">LYO</div>	Positiv kontroll.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">AC</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">LYO</div>	Frystorkad aktivitetskontroll.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">-</div>	Negativ kontroll.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONJ</div>	Konjugat.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">SUBS</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">pNPP</div>	pNPP-substrat.
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CH</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 5px;">REP</div>	Representant i Schweiz.

**18. DOKUMENTHISTORIK**

Version	Ändringar
LABEL-DOC-0031 v 6.0	<p>Större förändringar av texten samt ny dokumentlayout. Proceduren för semikvantitativ och kvalitativ tillämpning har slagits samman och separata underrubriker har införts i förekommande fall.</p> <p>Information om att "Analysen ska utföras av utbildad laboratoriepersonal" har lagts till.</p> <p>Information om metrologisk spårbarhet har lagts till.</p> <p>Specifikationen för den positiva kontrollen förtydligas från &gt; 1 till &gt; 1,0.</p> <p>Information angående CO<sub>2</sub>-skåp har lagts till.</p>
LABEL-DOC-0031 v 7.0	<p>Ökad transparens i avsnitt 14.1 om att de semikvantitativa uppgifterna är baserade på matematisk teoretisk beräkning.</p> <p>Värdena i tabell 6 och 10 uppdaterades för att motsvara prestandautvärderingen som publicerades i version 5.0.</p>



**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  
E-mail: [info@svarlifescience.com](mailto:info@svarlifescience.com)  
[www.svarlifescience.com](http://www.svarlifescience.com)