

### En enzymimmunoanalys för kvantitering av C3a-fragment av komplementproteinet C3 i humant plasma, sera, och andra forskningsprover

#### C3a Enzymimmunoanalys Summariskt

##### Förberedande av Reagens

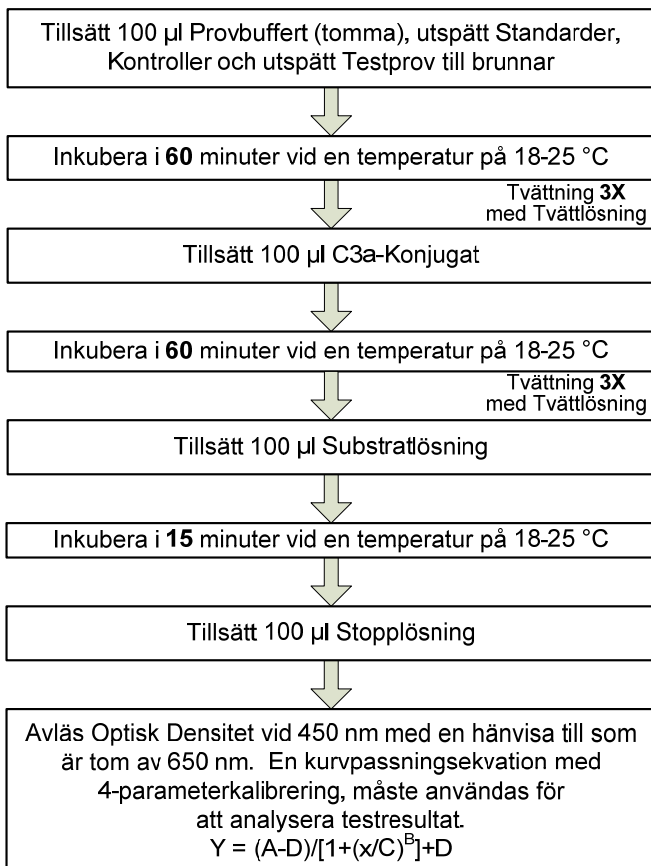
- Späd Tvättbuffertkoncentratet i förhållandet 1:20 med destillerat vatten
- Späd Provbuffertkoncentratet i förhållandet 1:10 med destillerat vatten
- Lös upp C3a-Standarden och Kontrollerna i 1 ml av Provbuffert (*Inkubera i högst 5 minuter*)
- Späd Proverna 1:100 med Provbuffert (10 µl + 990 µl)

##### Förberedande av Standarder (Använd inom 30 minuter)

	Std	Std/2	Std/4	Std/8
Std	500 µl →	500 µl →	500 µl →	500 µl
Provbuffert	0	500 µl	500 µl	500 µl

**OBS: Blanda omsorgsfullt genom långsam pipettering i flaskan; virvelblanda inte.**

##### Analysförfarande



#### SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

MicroVue C3a-enzymimmunoanalys mäter mängden C3a-desArg i humant serum, EDTA-plasma och andra forskningsprover.

C3a genereras vid aktivering av komplementsystemet via den klassiska, lectin, eller alternativa banan. Anafylatoxin C3a är i sig själv kortlivat och klyvs i serum snabbt till den mer stabila formen C3a-desArg. Därför medger kvantitering av C3a-desArg tillförlitliga slutsatser om omfattningen av komplementaktiveringen i testproverna. Av praktiska skäl kallas bägge formerna för C3a i denna text. Komplementaktivering har dokumenterats vid sådana tillstånd som myokardinfarkt, sepsis och flera olika autoimmunsjukdomar, samt vid ogynnsamma reaktioner på biomaterial.

#### PROCEDURENS PRINCIP

De mikrotitreringsröror som ingår i kitet är belagda med en monoklonal antikropp som är specifik för en neo-isotop som förekommer på C3a.

Proven späds i förhållandet 1:100. 100 µl/brunn av spädda prover, kontroller och standarder inkuberas i en timme vid 18–25 °C. Under denna inkubering binder C3a i provet till den monoklonala antikroppen som bildar beläggning på plattan.

Efter bortsköljning av ospecifikt bundet material används peroxidaskonjugerat kaninanti-C3a för detektering av det bundna C3a.

Överskottskonjugat avlägsnas med ett tvättsteg, varefter mängden C3a i provet kvantifieras med hjälp av peroxidreaktionen och en standardkurva.

#### MEDFÖLJANDE REAGENSER OCH MATERIAL

##### 96 analyser för C3a

##### MicroVue C3a-EIA-kit innehåller följande:

- S** C3a-standard **Art. A5579** **4 x 1 ml**  
(Frystorkat) Innehåller human plasma med 1100 ng/ml C3a
- L** Låg kontroll **Art. A5580** **2 x 1 ml**  
(Frystorkat) Innehåller human plasma med en C3a-halt på mindre än 200 ng/ml
- H** Hög kontroll **Art. A5581** **2 x 1 ml**  
(Frystorkat) Innehåller human plasma med en hög C3a-halt
- 1** Rensor med beläggning **Art. A5577** **12 st.**  
12 8-brunnars rensor belagda med monoklonalt, antihumant mus-C3a

- |          |   |                   |                  |
|----------|---|-------------------|------------------|
| <b>2</b> | <b>Stopplösning</b>   | <b>Art. A5586</b> | <b>15 ml</b>     |
|          | Innehåller 1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                          |                   |                  |
| <b>3</b> | <b>20 X-tvättlösningsskoncentrat</b>                                  | <b>Art. A5576</b> | <b>2 x 20 ml</b> |
|          | Efter spädning, innehåller 0,001 % ProClin® 300                       |                   |                  |
| <b>4</b> | <b>Provbuffertkoncentrat</b>  | <b>Art. A5584</b> | <b>2 x 20 ml</b> |
|          | Efter spädning, innehåller 0,002 % ProClin® 300                       |                   |                  |
| <b>5</b> | <b>C3a-konjugat</b>   | <b>Art. A5578</b> | <b>10 ml</b>     |
|          | Innehåller peroxidaskonjugerat kaninanti-C3a i PBS, och stabiliserare |                   |                  |
| <b>6</b> | <b>Substratlösning</b>  | <b>Art. A5585</b> | <b>11 ml</b>     |
|          | TMB-lösning, klar för användning                                      |                   |                  |

ProClin® är ett varumärke som tillhör Rohm and Haas Company.

## MATERIAL SOM BEHÖVS MEN SOM INTE MEDFÖLJER

- Timer (60 minuters omfång)
- Räknare eller annan beräkningsmöjlighet för validering av analysen
- Rena, obegagnade mikroanalysplattor och/eller provrör och rack
- Behållare för tvättbuffertlösning
- Tvättflaska eller annat immunoanalystavsystem
- Ställbar multikanalpipett (8 eller 12 kanaler), eller repeterande mikropipetter (tillval)
- Rena pipetter, 1 ml, 5 ml och 10 ml
- Mikropipetter och sterila engångsplast- pipettspetsar
- Plattläsare med kapacitet för optiska densiteter på mellan 0,0 och 2,0
- Avjoniserat eller destillerat vatten
- Även om det inte krävs, rekommenderas en plattläsare med automatisk blandningskapacitet.

## VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSANVISNINGAR

1. Endast för forskningsbruk (Endast i USA). Inte för användning vid diagnostikförfaranden.
2. Behandla alla prover som biologiskt riskmaterial. Hantera satsens innehåll och patientprover med försiktighet.
3. Kassera behållare och oanvänt innehåll i enlighet med gällande lagar och bestämmelser.
4. Medföljande reagenser används som en enhet fram till det utgångsdatum som anges på förpackningen.
5. Förvara analysreagenser enligt anvisningen.
6. Använd inte remsor med beläggning om det finns hål på förpackningen.
7. Bär lämpliga skyddskläder, handskar och ögon/ansiktsskydd vid hantering av detta kit.
8. ProClin 300 används som konserveringsmedel. Tillfällig kontakt med eller förtäring av buffertlösningar eller reagenser med ProClin kan orsaka irritation på hud, ögon och mun. Tillämpa god laboratoriepraxis för att reducera exponeringen. Sök läkarhjälp i händelse av symptom.
9. Stopplösningen innehåller 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Använd skyddsglasögon vid hantering. Undvik kontakt med ögon, hud och kläder. Vid kontakt med lösningen måste det utsatta området omedelbart sköljas med vatten.

10. Varje givarenhet som testats vid beredningen av denna produkts standarder och kontrollera har testats med en av FDA godkänd metod med avseende på förekomsten av antikroppar för humant immunbristvirus (HIV1 och HIV2) och hepatit C-virus, liksom även för hepatit B-antigen och syfilis och befunnits vara negativ (ej upprepat reaktiv). Eftersom ingen testmetod helt kan säkerställa att infektiösa agenser inte förekommer, så ska dessa reagenser hanteras på biosäkerhetsnivå 2, enligt rekommendationerna för potentiellt infektiösa humana serum- eller blodprov i Centers for Disease Controls/National Institutes of Healths handbok "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 2007.
11. Korrekt provtagning och förvaring av testprover är av avgörande betydelse för korrekta resultat (se *PROVTAGNING OCH PROV FÖRVARING*).
12. Undvik mikrobiell kontaminering eller korskontaminering av prover eller reagenser.
13. Använd inte en mikroanalysbrunn för mer än ett test.
14. Dekontaminera alla prover, reagenser och material genom att blötlägga i minst 30 minuter i en lösning i förhållandet 1:10 med kommersiellt blekmedel (natriumhypoklorit), eller autoklavera vid en temperatur på 121 °C i 30 minuter vid 15 psi.
15. Tillämpning av andra inkubationstider och temperaturer än dem som anges i avsnittet *Förfarande* kan leda till felaktiga resultat.
16. **TMB-substratet måste skyddas mot ljus vid förvaring och inkubation.** Undvik kontakt med ögon hud och kläder. Vid kontakt med lösningen måste det utsatta området omedelbart sköljas med vatten.
17. Låt inte brunnarna torka ut under testförfarandet.
18. Undvik att skrapa eller beröra brunnarnas botten vid uttagning av vätskor ur mikroanalysbrunnarna.
19. Värmeinaktiverade prover kan ge upphov till felaktiga resultat.
20. Hyperlipemiska eller kontaminerade prover kan leda till felaktiga resultat.
21. Undvik aerosolbildning vid tvätt genom att använda en apparat som aspirerar tvättvätskan till en flaska innehållande ett kommersiellt blekmedel.
22. Ett tvättflaska eller automatisk fyllningsanordning ska användas för att tvätta plattan (*ANALYSFÖRFARANDE*, steg 4). För bästa möjliga resultat ska en flöskanalpipett inte användas för tvättningen av mikroanalysplattan.

## FÖRBEREDANDE AV REAGENS

**Alla reagenser och material ska ha en temperatur på 18–25 °C innan de används.**

När de reagenser och det material som behövs tagits till vara ska oanvända reagenser och oanvänt material återföras till sina respektive förvaringstemperaturer (se *FÖRVARING*).

## Provbuffert

För att bereda användningsklar probbuffert späder man probbuffertkoncentratet i förhållandet 1:10 med destillerat vatten. **Exempel:** töm innehållet i en flaska (20 ml) i en mätcylinder, fyll på destillerat vatten till 200 ml och blanda ordentligt genom omrörning.

## Tvättbuffert

Bered användningsklar tvättbuffert genom att späda tvättbuffertkoncentratet i förhållandet 1:20 med destillerat vatten. **Exempel:** töm innehållet i en flaska (20 ml) i en mätcylinder, fyll på destillerat vatten till 400 ml och blanda ordentligt.

## Standarder

Var ytterst noggrann vid beredning av standarderna.

**Förvara inte rekonstituerade eller spädda prover.**

**OBS: Använda polypropylene rören för standaren spä ut stammen.**

1. Lös upp C3a-standarderna i 1 ml av den användningssklara probbufferten. Blanda omsorgsfullt (genom långsam pipettering tre gånger upp och ner i flaskan – virvelblanda inte).
2. Inkubera i högst fem minuter vid en temperatur på 18–25 °C.
3. Bered seriella utspädningar av C3a-standarderna på följande sätt. Sätt till 500 µl av C3a-standarderna till 500 µl probbuffert och blanda omsorgsfullt (det ger den ½-koncentrerade standarderna, som kallas för Std/2.) Sätt till 500 µl av Std/2-lösningen till 500 µl probbuffert och blanda ordentligt (det ger Std/4-lösningen). Sätt till 500 µl av Std/4-lösningen till 500 µl probbuffert och blanda ordentligt (det ger Std/8-lösningen).
4. Förvara utspädda standarder på is tills de ska användas. **Använd inom 30 minuter efter beredningen. Kassera efter användning.**

## Kontroller

Lös upp kontrollerna i 1 ml användningsklar probbuffert. Blanda försiktigt och inkubera i högst 5 minuter. Kontrollerna är nu klara för användning.

**OBS: Efter rekonstituering av kontrollerna ska alikvoter beredas och frysas vid en temperatur av -20 °C eller därunder för kommande analyskörningar. Felaktig hantering av kontrollerna kan göra senare analyskörningar ogiltiga.**

## FÖRVARING

Förvara det öppnade kitet vid en temperatur på 2–8 °C. De valda reagenserna, och de material som ska användas, måste uppnå en temperatur på 18–25 °C före användning. Lagg tillbaka de remsor som inte använts i förvaringspåsen, återförslut den och förvara den vid en temperatur på 2–8 °C.

## REAGENSERNAS STABILITET

De öppnade reagenserna är stabila fram till det angivna sista användningsdatumet.

### Stabilit efter öppning

**6 månader efter öppning vid en temperatur på 2–8 °C:**

- ① C3a-EIA-mikroanalysplatta
- ③ C3a-EIA-tvättlösningsskoncentrat (20x)
- ④ C3a-EIA-provbuffertkoncentrat
- ⑥ C3a-EIA-substrat

### Stabilitet efter spädning/rekonstituering

**4 veckor vid en temperatur på 2–8 °C:**

- ③ utspädd C3a-EIA-tvättlösningsskoncentrat
- ④ utspädd C3a-EIA-provbuffertkoncentrat

**30 minuter vid en temperatur på 2–8 °C eller i 4 veckor vid en temperatur på -20 °C:**

- L** rekonstituerad låg kontroll
- H** rekonstituerad hög kontroll

## INDIKATIONER PÅ INSTABILITET ELLER FÖRSÄMRING HOS REAGENSER

Om  $A_{450/650}$  för den högsta standarderna ligger under 0,5 kan eventuellt en eller flera kitkomponenter ha försämrats. Om ett lågt  $A_{450/650}$ -värde erhålls ska Quidels tekniska support eller den lokala distributören kontaktas.

## PROVTAGNING OCH FÖRVARING

**Hantera och kassera alla prover med försiktighet.**

**Provtagningen är av avgörande betydelse. Var noga med att undvika C3a-generering i provet.**

**All provhantering ska utföras vid en temperatur på 2–8 °C för plasma (direkt efter koagulering).**

För plasma ska blodprover tas med dinatrium-EDTA som antikoagulant, samt centrifugeras omedelbart i 15 minuter med 2000x g vid en temperatur på 2–8 °C. Hela denna process måste genomföras omedelbart. Proven ska antingen beredas och analyseras omedelbart, eller förvaras på is i upp till 4 timmar före analys. Plasmaaliquoter kan också förvaras vid en temperatur på -70 °C. Quidel rekommenderar användning av **Provstabiliseringslösning (Quidel art. nr. A9576)** för långvarig förvaring av plasmaprover, eller för förvaring av prover vid varmare temperaturer än -70 °C. Korrekt användning av denna produkt – som endast kan erhållas från Quidel – kräver att provet späds i förhållandet 1:1 med lösningen före frysning. Kontakta Quidels tekniska support för information om provstabiliseringslösningen.

Korrekt provtagning är viktig för bestämningen av C3a. Serumprover är känsliga för komplementaktivering *in vitro* och måste hanteras med varsamhet. EDTA-plasma som antingen är nytagen eller som förvarats vid en temperatur på -70 °C. Prov som förvarats vid andra temperaturer, utan provstabiliseringslösning, kan ge upphov till felaktiga resultat till följd av komplementaktivering.

Tina snabbt frysta prover vid 37 °C tills de precis är upptinade. Lägg omedelbart upptinade prover på is (i högst fyra timmar) för att undvika komplementaktivering före utspädningen. Låt inte proverna ligga i en temperatur på 37 °C, eftersom komplementaktivering då kan inträffa a. **Tina inte proverna långsamt i rumstemperatur eller på is, eftersom detta kan leda till C3-aktivering och ökade C3a-nivåer.** Proverna ska testas så snart som möjligt efter upptining. Upprepad infrysning och upptining rekommenderas inte. Om proverna måste frysas igen, för vidare analys, föreslår Quidel att proverna delas upp i fl era delar, för att undvika fl era frysnings- och upptiningscykler.

## ANALYSFÖRFARANDE

Läs hela produktbladet innan analysen påbörjas.

### Se REAGENSBEREDNING och VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER.

1. Registrera mikroanalysbrunnenspositionerna för den eller de tomma brunnarna, samtliga testprover, standarder och kontroller, samt de indikerade satsnumren från flasketiketterna. Märk ut ett av hörnen på mikroanalysplattan för orientering. En rekommenderad layout för mikroanalysplattan är denna:

	1	2	3	4
<b>A</b>	Provbuffert	Provbuffert	Prov 2	Prov 2
<b>B</b>	Std/8	Std/8	Prov 3	Prov 3
<b>C</b>	Std/4	Std/4	Prov 4	Prov 4
<b>D</b>	Std/2	Std/2	Prov 5	Prov 5
<b>E</b>	C3a Std (ospädd)	C3a Std (ospädd)	Prov 6	Prov 6
<b>F</b>	Låg kontroll	Låg kontroll	Prov 7	Prov 7
<b>G</b>	Hög kontroll	Hög kontroll	Prov 8	Prov 8
<b>H</b>	Prov 1	Prov 1	Prov 9	Prov 9

2. Späd proverna i förhållandet 1:100 genom att tillsätta 10 µl prov till 990 µl provbuffert. **Noggrann pipettering är viktig för reproducerbara resultat.** En "replikplatteteknik" med användning av flerkanalpipetter rekommenderas för plattladdningen. (**OBS:** en del prover kan kräva spädning i ett högre förhållande än 1:100 för att säkerställa resultat som faller på standardkurvan.)
3. **Provinkubering:** Följ pipetteringslayouten ovan och pipettera 100 µl vardera av provbuffert (blank), standarder, kontroller och utspätt testprov (1:100) i de enskilda brunnarna, och inkubera i 1 timme vid en temperatur på 18–25 °C.
4. **Tvätt:** Töm mikroanalysremsorna och fyll varje brunn med minst 200 µl användningsklar tvättbuffert. Töm brunnarna på nytt efter 1 minut och upprepa sedan detta tvättsteg ytterligare två gånger. Avlägsna överskottsvätska genom att knacka remsorna mot absorberande papper.
5. **Konjugatinkubering:** Pipettera 100 µl av C3a-konjugatet i varje brunn och inkubera i 1 timme vid en temperatur på 18–25 °C.

6. **Tvätt:** Töm mikroanalysremsorna och genomför tvättstegen enligt steg 4 ovan.
7. **Substratinkubering:** Pipettera 100 µl substratlösning i varje brunn och inkubera i 15 minuter.
8. **Stoppa reaktionen:** Pipettera 100 µl stopplösning i varje brunn med samma metod som vid tillsatsen av substratet.
9. **Mätningar:** Mät absorbansen med en mikroanalysplattläsare vid våglängden 450 nm och en referensvåglängd på 650 nm (enkelstrålutrustning kan också användas). Brunnarna A1 och A2 fungerar som BLANK.  
**OBS: Om ett enskilt provtest har en absorbans över den för den utspädda C3a-standardens ska provet spädas ytterligare och sedan testas på nytt.**
10. Kassera återstående utspädda prover och kontroller och begagnade mikroanalysremsor (se **VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER**).

## KVALITETSKONTROLL

Genomför duplikatbestämningar för buffertblanken (för bakgrundsbestämning), standarder och låg kontroll för varje analyskörning. Om bakgrunden ligger vid mindre än 0,2 A<sub>450/650</sub>-enheter, och om den mest koncentrerade standarden ger ett A<sub>450/650</sub>-värde på över 0,5, så fungerar C3a-enzymimmunoanalysen som den ska. Om ettdera av dessa kvalitetskontrollkrav inte uppfylls kan testresultatet vara ogiltigt. Upprepa i så fall antingen testet eller kontakta Quidels tekniska assistans. Utnaför Nordamerika kontaktas i stället den lokala distributören.

## RESULTATTOLKNING

### Resultatberäkning

**Användning av standardkurvan:** Subtrahera den genomsnittliga provbuffertabsorbansen från samtliga övriga absorbansvärden. Provbuffertvärdet är noll ng/ml C3a.

Bered en standardkurva genom att plotta nettoabsorbansvärdet längs y-axeln, för varje C3a-koncentration som indikeras på x-axeln. Ett exempel på en typisk standardkurva återges i figur 1.

C3a-koncentration i varje okänt prov kan sedan fastställas genom avläsning av den koncentration på x-axeln som motsvarar absorbansen (y-axelvärdet) för varje okänt prov. Vi rekommenderar användning av en 4-parameterkalibrering (se nedan) för beräkning av provvärdena.

$$Y = (A-D) / [1+(x/C)^B] + D$$

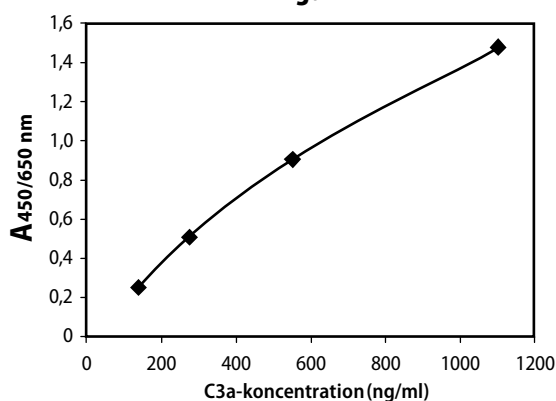
Alternativt kan berörda data manuellt läggas in i ett diagram och värdena (ng/ml) för testproverna läsas av direkt från den standardkurvlinje som passar bäst. Ett exempel på en typisk standardkurva återges i figur 1.

**Justering av spädningsfaktorn:** Värde tilldelningen för standarden återspeglar den antagna provspädningen på 1:100. Standarden innehåller därför motsvarigheten till 1100 ng/ml vid körning utan spädning (1100 ng Eq/ml).

**Prov som analyserats vid den antagna spädningen (1:100) behöver inte justeras med denna spädningsfaktor.** För prover med högre koncentrationer C3a des-Arg kan det emellertid bli nödvändigt att späda i ett högre förhållande än 1:100 för att få värden som ligger på standardkurvan. I så fall måste beräkningen justeras för den ytterligare spädningen. Om provet exempelvis späddes i förhållandet 1:500 ska det värde som läses av i standardkurvan för provet ifråga multipliceras med 5 för att få korrekt resultat.

### Representativ standardkurva

Figur 1



### EXEMPELVÄRDEN

EDTA-plasmaproverna från 37 provgivare analyserades i duplikat i MicroVue C3a-enzymimmunoanalys. Följande värden observerades:

medel 450 ng/ml  
intervall 123 till 2228 ng/ml

## TESTPRESTANDA

### Gränser

**LLOQ:** Den undre kvantifieringsgränsen (LLOQ) för C3a-analysen är 34 ng/ml. Värdet har fastställts genom seriell dubbleringsspädning av ett prov från 1100 ng/ml. Fyra upprepningar kördes för varje spädning.

### Precision

#### Precision inom körning:

C3a optisk densitet 450/650 nm	CV Inom körning <sup>1</sup> %
0,195	2,8
0,835	1,5
1,262	2,0

<sup>1</sup>n = 26 upprepningar per prov

#### Precision mellan körningar:

C3a (ng/ml)	CV mellan körningar <sup>2</sup> %
156	23
614	11
Medel:	17

<sup>2</sup>n = 4 körningar

#### Precision mellan operatörer:

C3a (ng/ml)	CV mellan operatörer <sup>3</sup> (%)
172	3,1
242	7,6
387	7,6
449	2,6
466	8,3
638	1,6
Medel	5,1

<sup>3</sup>n = 3 operatörer, 4 upprepningar per prov

## SUPPORT

Utanför USA: kontakta en lokal distributör för Quidelprodukter. Ytterligare information om Quidel, våra produkter eller distributörer finns på vår hemsida [www.quidel.com](http://www.quidel.com).

## REFERENSER

1. Burger, R.; Zilow, G.; Bader, A.; Friedlein, A.; and Naser, W.: The C terminus of the anaphylatoxin C3a generated upon complement activation represents a neoantigenic determinant with diagnostic potential. *The J. Immunol.*, 141: 553-558 (1988).
2. Mollnes, T.E.; Garred, P., and Bergseth G.: Effect of time, temperature and anticoagulants on *in vitro* complement activation: Consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clin. Exp. Immunology* 73, 484-488 (1988).
3. Hugli, T.E., and Chenoweth, D.E.: Biologically active peptides of complement. Techniques and significance of C3a and C5a measurements. *Laboratory and Research Methods in Biology and Medicine*. R.M. Nakamura, W.R. Dito, and E.S. Tucher, eds. Alan R. Liss, New York, p 443 (1980).
4. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.

---

## ORDLISTA



Läs bruksanvisningen på CDROM



Avsett Användningsområde

---

**REF** A015 – **MICROVUE** C3a EIA Kit  
Complement



Quidel Corporation  
Worldwide Headquarters  
10165 McKellar Court  
San Diego, CA 92121 USA  
www.quidel.com



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover, Germany