

En enzymimmunoanalys för kvantitering av C4d-innehållande fragment av aktiverat C4 i den klassiska komplementbanan

För *in vitro*-diagnostik. För export endast. Inte för försäljning eller användning i USA eller Kanada.

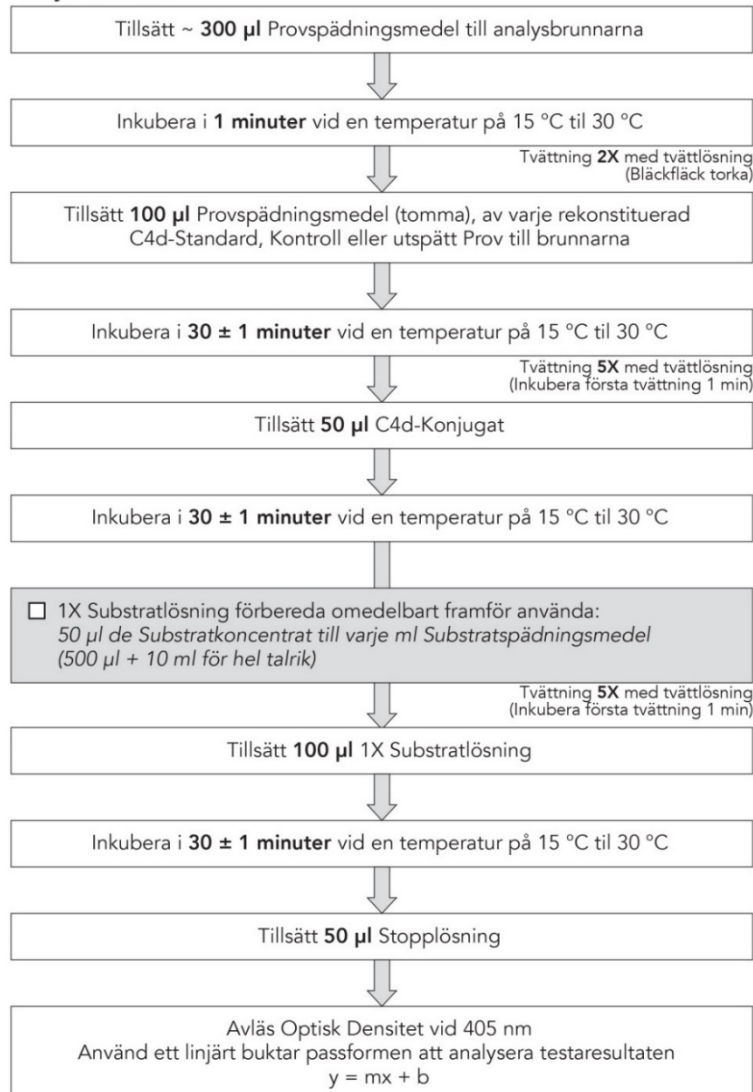
En symbolförklaring finns på quidel.com/glossary.

SAMMANDRAG

Reagent, Kontroll och Prov Förberedelse

- Späd tvättlösningkoncentrat 1:20 med avjoniserat vatten
- Rekonstruera var Standard och Kontroll med 2,0 ml Hydreringsreagens (äggkläckningsmaskin för 15 minuter, och blanda försiktigt)
Späd prover 1:70 med Komplementprovspädningsmedel
- (e.g. 10 µl + 690 µl) (tillsätt till analysbrunnarna inom 30 minuter)

Analysförfarande



SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

MicroVues enzymimmunoanalyskit för C4d-fragment mäter mängden C4d-innehållande aktiveringsfragment av C4 (C4b, iC4b och C4d) i humant serum, EDTA-plasma och andra biologiska eller experimentella prover.

Den fjärde komponenten av komplement är en av de plasmaproteiner som är unik för aktiveringen av den klassiska komplementbanan.¹ Aktiveringen av den klassiska banan utlöses vid bindning av C1q-subkomponenten i C1 till IgG- eller IgM-innehållande immunkomplex. C1 binds och aktiveras dessutom av ett stort antal andra ämnen såsom retrovirus, vissa bakterier, parasiter, transformerade celler, subcellulära membran, polyanjoner (DNA) och C-reaktivt protein i komplex med fosforylkolin.² Bindningen av C1 till dessa aktivatörer för den klassiska banan resulterar i omvandling av zymogenet C1:s subkomponent till ett aktivt proteolytiskt enzym (C1s). C1s spjälkar C4 α -kedjan vid peptidbindning 77, vilket resulterar i produktion av C4a- och C4b-fragment med molekylvikter på 9 000 respektive 191 000. C4a-fragmentet är en av komplementanafylatoxinerna.³ C4b-fragmentet har många viktiga biologiska aktiviteter.^{1,4} Några av dessa är förmedling av förstärkt fagocytos för komplementaktiverande mål av vita blodkroppar (opsonisering) och medverkan i den klassiska banans C3- och C5-konvertasansamling, som leder till terminal komponentaktivering och därpå följande komplementförmedlad upplösning av målmikroorganismer och andra celler.

Uttrycket av de biologiska C4b-aktiviteterna är strikt reglerat. C4b:s förmåga att medverka i aktiveringen av den klassiska banan, och i opsoniseringsreaktionerna, inhiberas således av enpunktsspjälkningen av C4b α -kedjan av faktor I.⁵ Denna reaktion kräver antingen C4-bindande protein (C4bp)⁶ eller komplementreceptor CR1 som en kofaktor.^{7,8} C4bp är ett komplementkontrollprotein⁹ och CR1 är den C3b/C4b-receptor som påträffas på erythrocyter, granulocyter, monocyter och makrofager.⁸ Faktor I-spjälkning av C4b ger inaktiverad C4b, som kallas för iC4b.⁷⁻¹⁰ iC4b kan brytas ner ytterligare av faktor I, i samarbete med C4bp eller CR1, till C4c- och C4d-fragment.⁶⁻¹⁰ C4c- och C4d-fragmenten, som kan produceras såväl i vätskefasen som på målytor, tycks utgöra de slutgiltiga fysiologiska nedbrytningsprodukterna av C4b.^{1,6-10}

C4d har kvantiterats i humana serum- och plasmaprover. C4d-halterna, efter normalisering för närvaron av endogent C4, kan vara betydligt förhöjda i plasmaprover från vissa patienter med reumatoid artrit, ärftligt angioödem, systemisk lupus erythematosus eller kroniska nässelutslag med hypokomplementemi.^{11,12} C4d-halterna kan också vara förhöjda i kroppsvätskor¹³ och plasmaprover från andra patienter, i vilka man vet att aktivering av klassiska komplementbanor sker, exempelvis patienter med olika humoral autoimmunsjukdomar,¹⁴ sepsis, värmeskador, flerorgantrauma, myokardisk infarkt, ärftligt angioödem, glomerulonefrit och akut andnöd. Korrelationen mellan C4d-aktiveringsfragmenthalter och det kliniska statuset, eller prognosen, för patienter med dessa och andra sjukdomar återstår att fastställa.

MicroVues enzymimmunoanalys för C4d-fragment erbjuder ett snabbt, icke-radioaktivt, ytterst specifikt och kvantitativt förfarande för mätning av C4-aktivering. Detta test är därför avsett för undersökningar som studerar rollen eller statusen för aktivering av klassiska komplementbanor i olika forskningssammanhang och kliniska sammanhang, samt för övervakning av genereringen av C4d-innehållande fragment *in vitro* eller *in vivo*.

ANALYSPROCEDURENS PRINCIP

MicroVue enzymimmunoanalys för C4d-fragment, för kvantitering av C4d i humant serum eller plasma, eller i experimentprover, utgör ett trestegsförfarande som använder sig av (1) en mikroanalysplatta belagd med en monoklonal musantikropp som binder specifikt till C4d-innehållande aktiveringsfragment av humant C4, (2) en HRP-konjugerad getantihuman-C4d, samt (3) ett kromogent substrat.

I det första steget tillsätts standarder, kontroller och testprover till mikroanalysbrunnar som förbelagts med en anti-C4d-specifik monoklonal antikropp. C4d i standarderna, kontrollerna eller proven binder till det immobiliserade anti-C4d:et. Efter inkuberingen avlägsnas en tvättcykel obundet material.

Under det andra skedet tillsätter man pepparrotsperoxidaskonjugerad (HRP) getanti-C4d-antikropp till varje testbrunn. Det enzymkonjugerade anti-C4d:et binder till C4d som fångades in av det monoklonala anti-C4d som bundits till ytan på mikroanalysbrunnarna. Efter inkuberingen avlägsnar en tvättcykel obundet överskottskonjugat.

Under det tredje steget tillsätts ett kromatogent enzymsubstrat till varje mikroanalysbrunn. Det bundna HRP-konjugatet reagerar med substratet så att en grön färg bildas. Efter inkubering avbryts enzymreaktionen kemiskt varefter färgintensiteten mäts spektrofotometriskt vid 405 nm. Reaktionsblandningens färgintensitet är proportionell mot koncentrationen funktionellt C4d i testproverna, standarderna och kontrollerna.

MEDFÖLJANDE REAGENSER OCH MATERIAL

96 analyser för C4d-fragment

MicroVues EIA-sats för C4d-fragment innehåller följande:

A C4d-standarder	Art. A4638 – A4642	5 x 2 ml
(lyofiliserat) Innehåller humant serum som innehåller kända kvantiteter C4d-innehållande fragment i		
E PBS och proteinstabiliserare		
H Höga kontroller	Art. A9572	2 x 2 ml
(lyofiliserat) Innehåller humant serum med C4d-innehållande fragment utspädda i PBS och proteinstabiliserare		
L Låga kontroller	Art. A9573	2 x 2 ml
(lyofiliserat) Innehåller humant serum med C4d-innehållande fragment utspädda i PBS och proteinstabiliserare		
① Remsor med beläggning	Art. A9567	12 av vardera
12 8-brunnsremсор belagda med monoklonala musantikroppar som är specifika för humant C4d i återförslutbar foliepåse		
② Stopplösning	Art. A3673	6 ml
Innehåller 250 mM oxalsyra		
③ 20X-tvättlösningskoncentrat	Art. A9957	2 x 50 ml
Innehåller fosfatbuffrad saltlösning, 1,0-procentig Tween-20® och 0,035 % ProClin® 300		
④ Provspädningsmedel	Art. A3670	50 ml
Innehåller PBS, 0,05 % stabiliserare, 0,035 % ProClin 300		
⑤ Substratspänningsmedel	Art. A3672	25 ml
Innehåller 0,1 M citratbuffert och 0,05 % H ₂ O ₂		
⑥ Substratkoncentrat	Art. A3671	1,5 ml
Innehåller 0,7 % 2-2'-azino-bis(3-etylbenziazolinsvavelsyra), diammoniumsalt		
⑦ C4d-konjugat	Art. A9945	2 x 3 ml
Innehåller peroxidaskonjugerat (get)anti-humant C4d löst i HRP-stabiliseringsbuffert med konserveringsmedel		
⑧ Hydreringsreagens	Art. A3675	25 ml
Innehåller 0,035 % ProClin 300		

Tween-20® är ett varumärke som tillhör ICI Americas Inc.

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 immunoanalystavvättningssystem
- Ställbar multikanalpipett (8 eller 12 kanaler), eller repeterande mikropipetter (tillval)
- Rena pipetter, 1 ml, 5 ml och 10 ml
- Mikropipetter och pipettspetsar
- Plattläsare med kapacitet för optiska densiteter på mellan 0,0 och 2,0
- Avjoniserat eller destillerat vatten

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSANVISNINGAR

- Endast för forskningsbruk i USA. Inte för användning i diagnostikförfaranden (endast USA).
- Behandla alla prover som biologiskt riskmaterial. Hantera satsens innehåll och patientprover med försiktighet.
- Kassera behållare och oanvänt innehåll i enlighet med gällande lagar och bestämmelser.
- Medföljande reagenser används som en enhet fram till det utgångsdatum som anges på förpackningen.
- Hantera satsens innehåll bär lämpliga skyddskläder, handskar och ögon/ansiktsskydd.
- Förvara analysreagenser enligt anvisningen.
- Använd inte remsor med beläggning om det finns hål på förpackningen.
- Dubbeltesta varje prov.
- 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.
- Varje givarenhet som testats vid beredningen av 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-ytantigen. 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.
- Vi rekommenderar användning av multikanal- eller repeterpipetter vid uppmätning av reagenser.
- För korrekt provmätning ska exakta mängder prover och standarder tillsättas. Pipettera omsorgsfullt med kalibrerad utrustning.
- Korrekt provtagning och förvaring av testprover är av avgörande betydelse för korrekta resultat (se *PROVTAGNING OCH PROVFÖRVARING*).
- Undvik mikrobiell kontaminering eller korskontaminering av prover eller reagenser.
- Använd inte en mikroanalysbrunn för mer än ett test.
- 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.
- Tillämpning av andra inkubationstider och temperaturer än dem som anges i avsnittet Förfarande kan leda till felaktiga resultat.
- Substratkoncentratet måste skyddas mot starkt ljus och direkt ljus.
- Låt inte mikroanalysbrunnarna torka när analysen har påbörjats.
- Undvik att skrapa eller beröra brunnarnas botten vid uttagning av vätskor ur mikroanalysbrunnarna.
- Värmeinaktiverade prover kan ge upphov till felaktiga resultat.
- Hyperlipemiska eller kontaminerade prover kan leda till felaktiga resultat.
- Undvik aerosolbildning vid tvätt genom att använda en apparat som aspirerar tvättvätskan till en flaskor innehållande ett kommersiellt blekmedel.

- Ett tvättflaska eller automatisk fyllningsanordning ska användas för att tvätta plattan (*ANALYSFÖRFARANDE*, steg 6). För bästa möjliga resultat ska en flerkanalspipett inte användas för tvättningen av mikroanalysplattan.
- Testning ska utföras i utrymmen med tillräcklig ventilation.
- Tvätta händerna grundligt efter hantering.
- För ytterligare information om farosymboler, säkerhet, hantering och bortskaffande av delarna som ingår i denna sats, hänvisas till säkerhetsdatabladet (SDS) på quidel.com.

FÖRVARING

Förvara det öppnade kitet vid en temperatur på 2 °C til 8 °C. Se till att alla reagenser och material fått en temperatur på 15 °C til 30 °C innan de används. Lägg tillbaka de remsor som inte använts i förvaringspåsen, återförslut den och förvara den vid en temperatur på 2 °C til 8 °C.

INDIKATIONER PÅ REAGENSINSTABILITET ELLER FÖRSÄMRING

Substratkoncentratets färg varierar mellan färglös och ljus- eller mörkgrönt. Den nyberedda substratlösningen ska emellertid vara färglös till ljusgrön. En mörkgrön färg indikerar att reagensen har försämrats och måste kasseras, och att ny substratlösning ska beredas i rent glasmaterial.

Grumlighet hos tvättlösningen indikerar försämring av denna reagens. När så är fallet ska lösningen kasseras.

PROVTAGNING OCH FÖRVARING

Hantera och kassera alla prover med försiktighet.

Det är nödvändigt med korrekt provtagning, provbehandling och provförvaring eftersom C4d är känsligt för proteolys i felaktigt tagna eller förvarade prover.

Normalvärdena för serumprover är något högre än dem som erhålls med matchade EDTA-plasmaprover. C4d-halterna i EDTA-plasma kan därför bättre representera *in vivo*-koncentrationerna.

Serum- eller EDTA-plasmaprover ska tas med ett aseptiskt förfarande enligt normal praxis. Proven ska antingen testas direkt eller förvaras vid en temperatur på 4 °C, eller på is, tills de analyseras. Denna korttidsförvaring på is ska emellertid inte vara i mer än högst fyra timmar.

För förvaring under längre tid ska serum eller plasma frysas vid en temperatur på –70 °C eller lägre inom två timmar efter provtagningen. Frysta prover ska testas så snart som möjligt efter upptining, eller förvaras på is (i högst fyra timmar) tills dess att de analyseras.

En **Provstabiliseringslösning** (prod. nr. A9576) kan även användas för att bereda humana serum- och plasmaprover för förvaring. Korrekt användning av denna produkt – som endast kan erhållas från Quidel – kräver att provet späds i förhållandet 1:1 med lösningen före frysning. Ytterligare teknisk information om lösningen kan erhållas på begäran.

Frysta prover ska testas så snart som möjligt efter upptining, eller förvaras på is (i högst fyra timmar) tills dess att de analyseras. Upprepad infrysning och upptining rekommenderas inte.

FÖRBEREDANDE AV REAGENS

Se till att alla reagenser och material fått en temperatur på 15 °C til 30 °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*).

Se tabell 1 för information om hur mycket reagenser och material som behövs för olika antal tester.

Tvättlösning

Blanda 20 X-tvättlösningskoncentratet genom att vända flaskan uppochned flera gånger. Om 20 X-tvättlösningskoncentratet har förvarats vid en temperatur på 2 °C til 8 °C kan kristaller ha bildats. För att lösa upp kristallerna värmer man flaskan i ett vattenbad på 37 °C til 50 °C tills alla är upplösta och blandar därefter om omsorgsfullt. Bered tvättlösningen genom att späda ut hela innehållet i en av flaskorna med 20 X-tvättlösningskoncentrat till en liter med destillerat eller avjoniserat vatten. Blanda omsorgsfullt. Tvättlösningen är stabil i 30 dagar vid förvaring i en ren behållare vid en temperatur på 2 °C til 8 °C. Vid missfärgning eller grumling ska reagensen kasseras.

Välja mikroanalysremсор

Beräkna hur många brunnar som behövs för analysen. Vi rekommenderar att de tomma brunnarna, kontrollerna och standarderna testas i duplikat. Ta bort remsfästet från den monterade plattan. Ta bort de remsor som inte behövs och placera dem i förvaringspåsen, återförslut påsen och återför den till förvaring vid en temperatur på 2 °C til 8 °C. Säkra de remsor som ska användas i analysen.

Rekonstituering av C4d-standard och –kontroll

Tillsätt 2,0 ml hydreringsreagens till varje standard (A-E), samt till den låga och den höga kontrollen. Låt de rekonstituerade flaskorna rehydrera i minst 15 minuter vid en temperatur på 15 °C til 30 °C. Blanda om omsorgsfullt. Undvik skum- eller bubbelbildning under omrörningen. Rekonstituerade standarder och kontroller är stabila i 30 dagar vid förvaring vid en temperatur på 2 °C til 8 °C.

Provspädning

Försiktighet: Behandla alla prover i enlighet med de gällande generella försiktighetsanvisningarna. Använd inte värmeinaktiverade, kontaminerade prover eller prover som har förvarats på felaktigt sätt.

Bered en lämplig spädning av varje prov med komplementprovspädningsmedelet (se Resultatberäkning). En spädning i förhållandet 1:70 rekommenderas för normala prover. Blanda om ordentligt men undvik skum- eller bubbelbildning. Förvara eller återanvänd inte spädda prover.

Tillsätta utspädda prover till mikrotitrerbrunnarna

Endera av två metoder kan användas vid tillsättning av de utspädda proverna, standarderna, kontrollerna och bufferten till brunnarna (se steg 4 i *ANALYSFÖRFARANDE*). För små analyskörningar, då endast ett fåtal prover testas, kan de utspädda proven och de övriga reagenserna tillsättas direkt till respektive brunn med en mikropipett (100 µL/brunn). För små eller stora körningar, men i synnerhet stora körningar, rekommenderar vi användning av en multikanalpipett för tillsättning av proverna, enligt nedan. (En multikanalpipett kan även användas för att på ett praktiskt sätt tillsätta konjugat, substrat och stopplösning.)

För att ladda standarderna, kontrollerna och de utspädda proverna i mikroanalysbrunnarna så snabbt som möjligt kan man använda sig av en "replikplatteteknik". I stället för att tillsätta 100 µL av varje standard, kontroll eller utspädd prov till de antikroppsbelagda brunnarna individuellt kan 120–130 µL av varje lösning tillsättas till de individuella brunnarna på en tom platta (ingår inte) som motsvarar det önskade slutliga EIA-mönstret. När alla lösningar som ska testas har tillsatts till mikroanalysbrunnarna i den tomma plattan överför man sedan snabbt 100 µL från varje brunn till de antikroppsbelagda brunnarna med en multikanal-mikropipett. För att eliminera risken för korskontaminering måste pipettspetsarna bytas varje gång sammansättningen på de prover som ska överföras ändras.

Beredning av substratlösning

Bered omedelbart före användning. Bestäm erforderlig volym substratlösning med hjälp av tabell 1. (Det går åt 1 ml substratlösning per remsa, eller 125 µL per brunn.) Bered substratlösningen genom att tillsätta 50 µL substratkoncentrat till varje ml substratspädningsmedel. Blanda omsorgsfullt. Bered inte substratlösningen förrän vid steg 8 av analysförfarandet. Om substratlösningen blir mörkgrön före användningen ska man kassera den och bereda ny lösning i en ren behållare.

Tabell 1. Reagenskrav

Brunnar ¹	8-brunnarsremсор	Substratlösningsvolym (ml)	Substratkonsentrat (µL)
16	2	2,0	100
24	3	3,0	150
32	4	4,0	200
40	5	5,0	250
48	6	5,0	250
56	7	6,0	300
64	8	7,0	350
72	9	8,0	400
80	10	9,0	450
88	11	9,0	450
96	12	10,0	500

¹ Beräkna hur många prover som ska testas och lägg till femton (15) brunnar för de fem standarder och låga och höga kontroller som ska testas (i duplikat), samt en tom brunn. Vi rekommenderar att duplikatstandarderna och –kontrollerna testas på separata mikroanalysremсор om så är möjligt.

ANALYSPROCEDUR

Läs hela produktbladet innan analysen påbörjas.

Se *REAGENSBEREDNING* och *VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER*.

1. Registrera mikroanalysbrunnpositionerna 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.
2. Bered mikroanalysbrunnarna så här:
 - a. Rehydrera mikroanalysbrunnarna genom att tillsätta ungefär 250-300 µL tvättlösning till varje brunn med hjälp av en tvättflaska eller annan automatiserad fyllningsanordning.
 - b. Inkubera vid en temperatur på 15 °C til 30 °C i en minut.
 - c. Avlägsna vätskan ur varje brunn.
 - d. Tillsätt ungefär 250-300 µL tvättlösning till varje brunn.
 - e. Aspirera innehållet i varje brunn.
 - f. Upprepa stegen d-e ytterligare en gång.**
 - g. Vänd plattan uppochned och knacka kraftigt över det absorberande papperet två gånger för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska.
3. Välj en eller flera brunnar som ska utgöra blank. Tillsätt 100 µL provspädningsmedel till den eller de brunnar som ska användas för blankning av plattläsaren.
4. Tillsätt 100 µL av varje rekonstituerad C4d-standard (A, B, C, D, E), kontroll eller utspätt prov till de tilldelade brunnarna.
5. Inkubera vid en temperatur på 15 °C til 30 °C i 30 ± 1 minut.
6. Tvätta mikroanalysbrunnarna så här:
 - a. Avlägsna vätskan ur varje brunn efter inkubationen i steg 5 (eller i steg 8 nedan).
 - b. Tillsätt ungefär 300 µL tvättlösning till varje brunn med hjälp av en tvättflaska eller en automatiserad fyllningsanordning.
 - c. Inkubera brunnarna i 1 minut vid en temperatur på 15 °C til 30 °C.
 - d. Avlägsna vätskan ur varje brunn.
 - e. Tillsätt ungefär 300 µL tvättlösning till varje brunn.
 - f. Avlägsna vätskan ur varje brunn.
 - g. Upprepa stegen e-f ytterligare tre gånger.**
 - h. Vänd på plattan efter den femte tvättcykeln och knacka kraftigt två gånger över absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska

7. Dispensera med hjälp av en multikanalpipett eller repeterande pipett 50 µL C4d-konjugat i varje tvättad testbrunn, inklusive blankbrunnen/brunnarna.
8. Inkubera mikroanalysremsorna i 30 ± 1 minuter vid en temperatur på 15 °C till 30 °C. Bered substratlösningen under denna inkubation (se *REAGENSBEREDNING*).
9. Tvätta mikroanalysbrunnarna efter den 30 minuter långa inkubationen (steg 8), enligt anvisningarna i avsnittet *ANALYSFÖRFARANDE*, steg 6.
10. Dispensera direkt efter tvättförfarandet 100 µL av den nyberedda substratlösningen i varje brunn, inklusive blankningsbrunnen/brunnarna.
11. Inkubera mikroanalysremsorna i 30 ± 1 minuter vid en temperatur på 15 °C till 30 °C.
12. Tillsätt 50 µL stopplösning till varje brunn för att stoppa den enzymatiska reaktionen. Stopplösningen ska tillsättas till brunnarna i samma ordningsföljd och med samma tempo som vid tillsättningen av substratlösningen. Knacka lätt på plattan för att sprida färgutvecklingen jämnt.
13. Läs av absorbansen vid 405 nm (A_{405} -värde) för varje testbrunn inom en timme efter tillsatsen av stopplösningen (steg 12), och genomför nödvändig blankkorrigering.
14. Avgör koncentrationen i prover och kontroller från standardkurvan.
15. Kassera återstående utspädda prover och kontroller och de begagnade mikroanalysremsorna (se *VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER*).

KVALITETSKONTROLL

God laboratoriepraxis rekommenderar användning av kontroller för att säkerställa att analysen fungerar som den ska. Varje C4d-kit innehåller höga och låga kontroller som kan användas för detta. Dessa kontroller ska testas minst en gång för varje kit. Dessutom måste enligt produktbladet den standardkurva som genereras med kitets standarder uppfylla stränga valideringskrav. Om analysen inte uppfyller dessa krav ska man upprepa analysen eller kontakta Quidels tekniska support.

Det analyscertifikat som medföljer produkten är partispecifikt och ska användas för att intyga att laboratoriets resultat motsvarar dem som erhöles hos Quidel. De optiska densitetsvärdena är givna och ska endast användas som riktlinjer. Resultatet i ert laboratorium kan avvika.

Kvalitetskontrollområden medföljer. Kontrollvärdena är avsedda att bekräfta kurvans och testresultatets giltighet. Varje laboratorium ska upprätta egna parametrar för vad som är acceptabla analysvärden. Om kontrollvärdena INTE ligger inom laboratoriets acceptansgränser, ska analysresultaten ifrågasättas och proverna upprepas.

RESULTATTOLKNING

Resultatberäkning

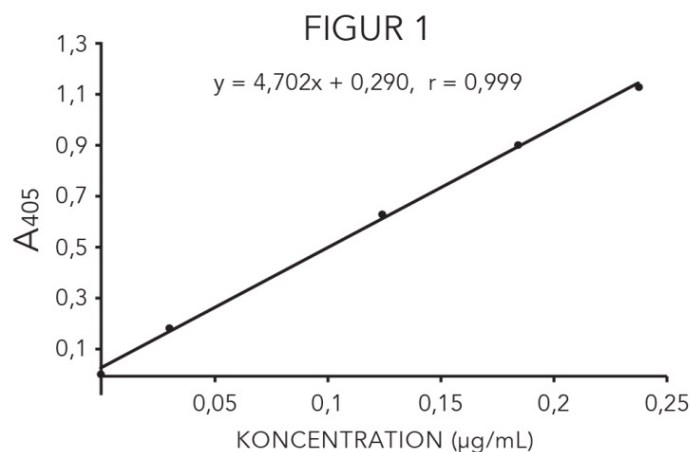
Vanligen fungerar en normal human plasma eller serum som späts i förhållandet 1:70 optimalt i EIA-kit C4d. Hela plasma- eller serumprover kan spädas i ett förhållande på från 1:40 till 1:100 med full och noggrann kvantitering av C4d-analyten. Normala plasma- eller serumprover som späts i ett förhållande på över 1:100 kan ge upphov till A_{405} -värden på under 0,1, vilket kan leda till felaktiga resultat.

Beroende på provkoncentrationen och på experimentets uppläggning kan prov ibland behöva spädas ytterligare (dvs. till högre spädningsförhållanden) för att ge A_{405} -värden inom kitstandardernas intervall, för att C4d-analytkoncentrationen ska kunna beräknas. Alternativt kan C4d-halten rapporteras som större än eller lika med det högsta beräkningsbara värden för den specifika spädning som testas.

Användning av standardkurvan: Standardkurvan för C4d EIA genereras med användning av de blanksubtraherade A_{405} -värdena för varje standard (på y-axeln) och den tilldelade koncentrationen för varje standard (på x-axeln). Efter linjär regression måste den genererade standardkurvan uppfylla valideringskraven (se nedan). De flesta datorer och räknare går att använda för dessa beräkningar.

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

Representativ standardkurva



Validering

Bestäm lutningen, avskärningen och korrelationskoefficienten för den härledda linjen som passar in bäst för C4d-kitstandarderna. Värdena måste hamna inom de specificerade intervallen för att kvalificera analysen:

korrelationskoefficient (r): $> 0,95$
lutning (m): mellan 3,32 och 6,50
y-avskärning (b): mellan $(-)$ 0,056 och 0,063

Se flasketiketterna för uppgifter om det godtagbara C4d-koncentrationsintervallet för de låga och höga kontrollerna.

BEGRÄNSNINGAR

Detta kit är endast avsett för forskningsbruk och ska inte användas för diagnostiska förfaranden. MicroVues enzymimmunoanalys för C4d-fragment har använts för att testa prover som tagits som serum eller som plasma i EDTA. Andra antikoagulanter har inte testats.

EXEMPELVÄRDEN

Åttio (80) EDTA-plasmaprover (som späts i förhållandet 1:70 i provspädningsmedel) och femtiofyra (54) serumprover (som späts i förhållandet 1:70 i provspädningsmedel) testades i MicroVues enzymimmunoanalys för C4d-fragment. Intervallen för plasma- och serumprover redovisas nedan.

	n	medel	Intervall	
			$\pm 2 \text{ SD}$	$\pm 3 \text{ SD}$
EDTA-Plasma	80	3,5	0,7 μg -6,3 $\mu\text{g/ml}$	0-7,7 $\mu\text{g/ml}$
Serum	54	4,6	1,2 μg -8,0 $\mu\text{g/ml}$	0-9,7 $\mu\text{g/ml}$

TESTPRESTANDA

Gränser

LOD: Detekteringsgränsen (limit of detection - LOD) för C4d-analysen är 0,001 µg/ml, fastställd av den övre 3SD-gränsen i en nollstandardstudie.

LLOQ: Den undre kvantifieringsgränsen (lower limit of quantification - LLOQ) för C4d-analysen är 0,022 µg/ml, och utgör den lägsta punkt på standardkurvan som uppfyllde NCCLS-kriterierna för noggrannhet och precision.

Störande ämnen

Natriumcitrat- och tetranatrium-EDTA testades vid koncentrationer på 1000 mg/dl respektive 800 mg/dl, och befanns inte interferera med analysen.

Precision

Precisionen inom respektive mellan körningar bestämdes genom analys av 20 upprepningar av 3 plasmaprover i 9 olika körningar.

C4d (µg/ml)	Inom körning ¹ CV (%)	Mellan körningar ² CV (%)
4,4	9,7	11,2
4,7	7,4	8,8
7,9	6,1	8,5

¹n = 20 upprepningar ²n = 9 körningar

Linjäritet

Linjäriteten kontrollerades genom blandning av ett högt plasmaprov med ett lågt plasmaprov i olika kombinationer, för att få fram analyter på mellannivån. Den genomsnittliga återhämtningen var 92,7 %, med ett absolut intervall på 87,0-99,0 %.

SUPPORT

To place an order or for technical support, please contact a Quidel Representative at 800.874.1517 (in the U.S.) or 858.552.1100 (outside the U.S.), Monday through Friday, from 8:00 a.m. to 5:00 p.m., Eastern Time. Orders may also be placed by fax at .740.592.9820. For e-mail support contact customerservice@quidel.com or technicalsupport@quidel.com.

Utanför USA: kontakta en lokal distributör för Quidel-produkter. Ytterligare information om Quidel, våra produkter eller distributörer finns på vår hemsida www.quidel.com.

REFERENSER

1. Müller-Eberhard, H.J. 1975. Complement. *Annu. Rev. Biochem.* 44:697.
2. Cooper, N.R. 1985. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol.* 37:151
3. Gorski, J.P., Hugli, T.E., and Müller-Eberhard, H.J. 1979. C4a: The third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc. Natl. Acad., Sci. (USA)* 76:5299.
4. Bokisch, V.A. and Sobel, A.T. 1974. Receptor for the fourth component of complement on human B lymphocytes and cultured human lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* 140: 1336.
5. Fearon, D.T. 1977. Purification of C3b inactivator and demonstration of its two polypeptide chain structure. *J. Immunol.* 119: 1248.
6. Scharfstein, J., Ferreira, A., Gigli, I., and Nussenzweig, V. 1978. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J. Exp. Med.* 148:207.

7. Medof, M.E., and Nussenzweig, V. 1984 . Control of the function of substrate-bound C4b-C3b by the complement receptor Cr1. *J. Exp. Med.* 159:1669.
8. Ross, G.D., and Medof, M.E. 1985. Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3. *Adv. Immunol.* 37:217.
9. Fujita, T., Gigli, I., and Nussenzweig, V. 1978. Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b Inactivator. *J. Exp. Med.* 148: 1044.
10. Nagasawa, S., Ichihara, C., and Stroud, R.M. 1980. Cleavage of C4b by C3b inactivator: production of a nicked form of C4b, C4b', as an intermediate cleavage product of C4b by C3b inactivator. *J. Immunol.* 125:578.
11. Milgrom, H., Curd, J.G., Kaplan, R.A., Müller-Eberhard, H.J., and Vaughan, J.H. 1980. Activation of the fourth component of complement (C4): assessment by rocket immunoelectrophoresis and correlation with the metabolism of C4. *J. Immunol.* 124:2780.
12. Nitsche J. F., Tucker, E.S., Sugimoto, S., Vaughan, J.H., and Curd, J.G. 1981. Rocket immunoelectrophoresis of C4 and C4d. A simple sensitive method for detecting complement activation in plasma. *Am. J. Clin. Path.* 76:679.
13. Perrin, L.H., Shiraishi, S., Stroud, R.M., and Lambert, P.H. 1975. Detection and quantitation in plasma and synovial fluid of a fragment of human C4 with α mobility generated during the activation of the complement system. *J. Immunol.* 115:32.
14. Tucker, E.S. 1984. Complement activation in autoimmune disease. *J. Clin. Immunol.* 7:310.
15. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
16. Centers for Disease Control/National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. U.S. *Department of Health and Human Services*, 2007.

REF A008 – MicroVue C4d Fragment EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PIA008002SV00 (08/19)

ORDLISTA

REF

Katalognummer



CE-märkning om överensstämmelse

EC REP

Auktoriserad representant inom europeiska gemenskapen

LOT

Satskod



Använd före



Tillverkare



Temperaturbegränsning



Avsedd användning



Konsultera e-märkning bruksanvisning



Biologisk risk

IVD

För *in vitro*-diagnostik



Innehållet räcker till 96 bestämningar

CONT

Innehåll/innehåller

CONTROL

Kontroll
