

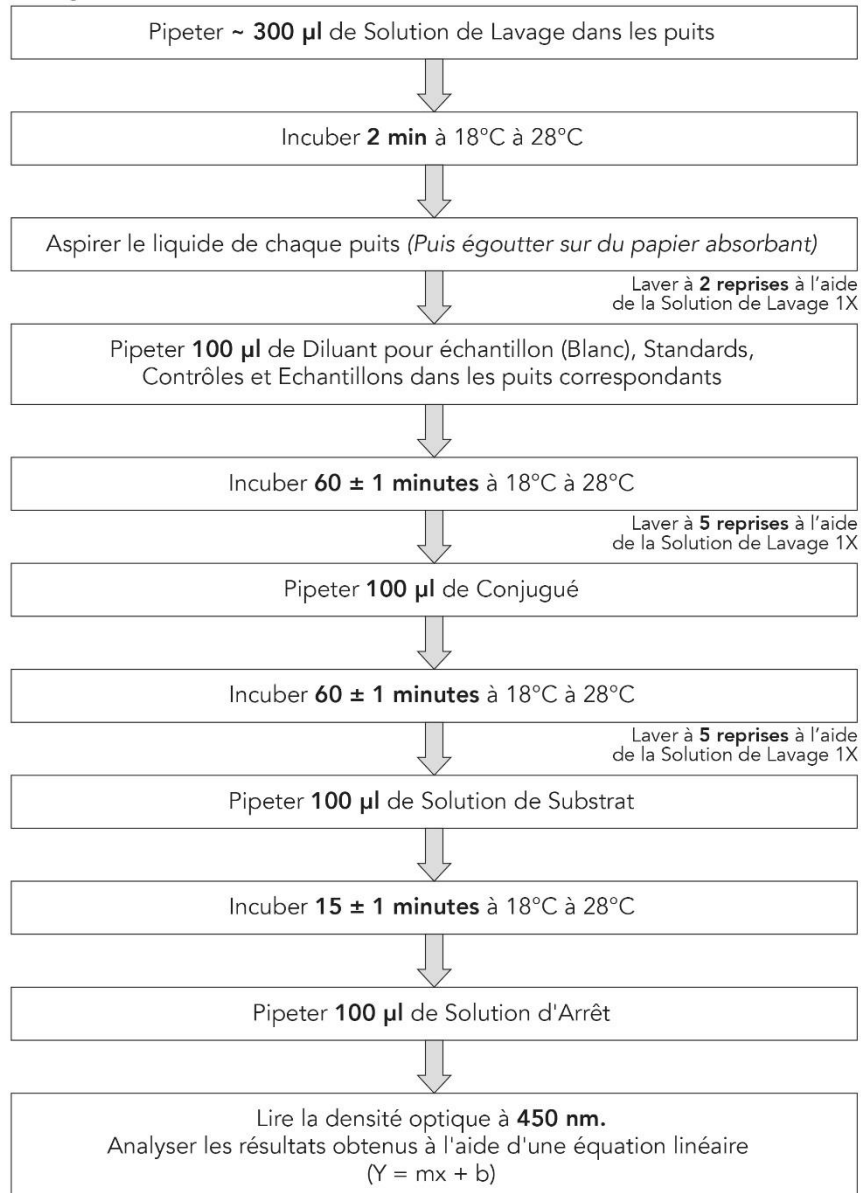
Le dosage ELISA MicroVue C5a permet de doser le taux de C5a dans le sérum et le plasma humains

RÉSUMÉ

Préparation des Réactifs et des Échantillons

- Diluer la Solution concentrée de Lavage 1:20 à l'aide d'eau distillée.
- Diluer les échantillons de Sérum 1:50 à l'aide du Diluant pour échantillon (Par ex: 10 μ l + 490 μ l).
- Diluer les échantillons de Plasma 1:20 à l'aide du Diluant pour échantillon (Par ex: 20 μ l + 380 μ l).

Dosage





INTÉRÊT DU DOSAGE

Le dosage ELISA MicroVue C5a permet de doser le taux de C5a dans le sérum et le plasma humains.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le dosage ELISA MicroVue C5a est un dosage direct sur microplaque à 96 puits, qui permet la mesure du C5a dans le sérum et le plasma humains.

Dans les conditions normales, l'activation du Complément par la voie classique, alternative ou par la voie de la lectine se traduit par la formation d'une enzyme multi-moléculaire C5 convertase capable de cliver le C5 en C5a et C5b.^{1,2} Le C5b est un constituant clef du Complexe Terminal du Complément et possède une variété de fonctions. Le C5a est un fragment protéique de faible poids moléculaire (environ 9kD) constitué par 74 acides aminés.³ Le C5a est rapidement métabolisé par la carboxypeptidase sérique en une forme plus stable, moins active, de 73 acides aminés, le C5a des-Arg.^{2,3} Dans un souci de simplification, les 2 formes seront appelées "C5a" dans ce document.

Le dosage MicroVue C5a, qui permet de mesurer de façon rapide, très spécifique et quantitative les taux de C5a, a été développé pour permettre l'étude du rôle ou du statut de l'activation de la voie terminale du complément dans de nombreux projets de recherches et pour suivre la formation du C5a *in vivo* ou *in vitro*.⁴ Etant la plus puissante des anaphylatoxines du complément, le C5a possède de nombreuses fonctions biologiques² telles que la dégranulation des mastocytes, la chimiotaxie, la leucoséquestration, ou l'activation cellulaire par fixation sur le Récepteur du C5a² (C5aR ou CD88). On a associé en recherche des taux élevés de phase liquide et de C5a adsorbé avec l'hémo-incompatibilité de certains biomatériaux, en particulier dans les circuits extracorporels.⁵⁻⁹ On a également associé en recherche les taux de C5a à la pathogenèse de différentes maladies telles que l'infarctus du myocarde¹⁰⁻¹⁴, les attaques^{15,16}, ainsi que les syndromes de fuite vasculaire et les atteintes rénales associées¹⁷⁻¹⁹. Le rôle du C5a dans la pathogenèse de la malaria²⁰ et d'autres maladies infectieuses, ainsi que dans les septicémies²¹⁻²⁴ est également bien documenté.

PRINCIPE DU DOSAGE

Le dosage ELISA MicroVue C5a est un dosage en 3 étapes qui utilise (1) une microplaque coâtée à l'aide d'un anticorps monoclonal murin spécifique d'un néo-épitope du C5a humain, (2) un anticorps monoclonal murin dirigé contre la région C5a du C5 conjugué à de l'HRP, et (3) un substrat chromogénique.

Lors de la première étape, Standards, Contrôles et échantillons dilués sont ajoutés dans les puits recouverts d'un anticorps monoclonal murin anti-C5a. L'anticorps monoclonal fixe le C5a présent dans les Standards, Contrôles ou échantillons. Après incubation, un lavage permet d'éliminer ce qui n'a pas été lié.

Lors de la deuxième étape, l'anticorps murin anti-C5(C5a) conjugué à l'HRP est ajouté dans tous les puits. L'anti-C5(C5a) conjugué à l'enzyme se lie sur le C5a immobilisé, capturé lors de la première étape. Après incubation, un lavage permet d'éliminer le conjugué non lié.

Lors de la troisième étape, on ajoute dans tous les puits de la 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine (TMB), une solution de substrat chromogénique prête à l'emploi. L'HRP liée réagit avec le substrat pour former une couleur bleue. Après incubation, on stoppe chimiquement la réaction, la couleur bleue vire au jaune, confirmant que la réaction a eu lieu. On mesure l'intensité de la couleur à l'aide d'un spectrophotomètre à A₄₅₀. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de C5a présent dans les échantillons dilués, les Standards et les Contrôles. Les résultats sont calculés à partir de la courbe standard tracée à l'aide d'une méthode de régression linéaire.

RÉACTIFS ET MATÉRIELS FOURNIS

96 puits pour le dosage du complexe C5a

Le kit de dosage EIA MicroVue C5a contient les éléments suivants:

A Standards C5a	Réf 5131 – 5135	1 flacon, 1,5 ml
B Prêt à l'emploi. Contient une concentration connue en C5a (ng/ml) dans du sérum humain et des		
C stabilisants protéiques		
D		
E		
L Contrôle Faible	Réf 5136	1,5 ml
Prêt à l'emploi. Contient une concentration connue en C5a (ng/ml) dans du sérum humain et des		
stabilisants protéiques		
H Contrôle Fort	Réf 5137	1,5 ml
Prêt à l'emploi. Contient une concentration connue en C5a (ng/ml) dans du sérum humain et des		
stabilisants protéiques		
① Barrettes de puits	Réf A3840	Je 12
8 puits coatés par un anticorps monoclonal murin dans un sachet d'aluminium re-scellable		
② Solution d'Arrêt	Réf A9947	12 ml
Contient de l'Acide Chlorhydrique 1N (4%)		
③ Solution de Lavage Concentrée 20X	Réf A9957	2 x 50 ml
Contient du tampon phosphate (PBS), 1,0% Tween-20® et 0,035% Proclin® 300		
④ Diluant pour échantillon	Réf A3670	50 ml
Contient du PBS, 1,0% Tween-20, des stabilisants protéiques, 0,035% Proclin 300		
⑤ Substrat TMB	Réf 5059	12 ml
Prêt à l'emploi. Contient du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB)		
⑥ Conjugué	Réf 5130	12 ml
Contient un conjugué de peroxydase de raifort et d'anticorps monoclonal murin anti-C5a		

Tween-20® est une marque déposée de ICI Americas Inc.

ProClin® est une marque déposée de Rohm and Haas Company.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Minuteur (60 minutes)
- Calculateur ou logiciel permettant de valider le dosage
- Plaques à usage unique et/ou tubes à essais et portoirs
- Récipient gradué pour la dilution de la Solution de Lavage
- Bouteille de lavage ou tout autre équipement de lavage
- Multipette ajustable (8 ou 12 canaux) ou pipetteur automatique (optionnel)
- Pipettes de 1 ml, 5 ml et 10 ml
- Micropipettes et embouts
- Lecteur de plaques pouvant lire des densités optiques A_{450} comprises entre 0,0 et 3,0
- Eau désionisée ou distillée

ATTENTION

- Pour utilisation *In vitro*.
- Non destiné à la vente aux États-Unis ou au Canada.
- Traiter tous les échantillons comme des produits potentiellement dangereux.
- Suivre les précautions standard lors de la manipulation de cette trousse et des échantillons de patients.
- Utiliser ensemble tous les réactifs avant la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de la boîte.

- Suivre les recommandations pour la conservation des réactifs.
- Ne pas utiliser les barrettes de puits si leur emballage est abîmé.
- Le ProClin 300 est un conservateur. Tout contact ou ingestion accidentels de tampons ou de réactifs contenant du ProClin peut entraîner une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Appeler un médecin si on observe ces symptômes.
- La solution d'Arrêt est une solution corrosive et peut provoquer des irritations. Ne pas ingérer. Eviter tout contact avec les yeux, la peau et les vêtements. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.
- Chaque prélèvement utilisé dans la préparation des standards et des contrôles de ce kit provient d'un donneur individuel, et a subi à l'aide d'une méthode approuvée par la FDA un dépistage négatif pour HIV1, HIV2, HCV et HBsAg. Mais ces réactifs doivent cependant être manipulés comme des produits potentiellement infectieux, car aucun test ne peut garantir l'absence totale de ces agents infectieux.
- L'utilisation de multipettes ou de pipetteurs automatiques est recommandée pour limiter le temps de distribution des réactifs.
- Pour obtenir une mesure précise des échantillons, pipeter avec précautions les échantillons et les standards en utilisant du matériel calibré.
- Pour obtenir des résultats précis, il est indispensable de recueillir et de conserver correctement les échantillons. (Se reporter au paragraphe « *RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS* »).
- Eviter toute contamination microbienne ou croisée des échantillons ou des réactifs.
- Doser chaque échantillon en double.
- Ne pas utiliser un puits pour plus d'un test.
- Toute modification du temps et de la température d'incubation indiqués dans le protocole de dosage peut entraîner des résultats erronés.
- Le substrat TMB doit être protégé de la lumière pendant le stockage et l'incubation. Eviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau.
- Ne pas laisser les puits sécher pendant le dosage.
- Lors de l'addition ou de l'aspiration des liquides dans les puits, ne pas gratter ou toucher le fond des puits.
- Des échantillons inactivés par la chaleur, lipidiques ou contaminés peuvent donner des résultats erronés.
- Pour éviter la formation d'aérosols pendant le lavage, aspirer le liquide de lavage dans une bouteille contenant de l'eau de javel.
- On utilisera une bouteille de lavage ou un système de remplissage automatique pour laver les microplaques (voir le protocole de dosage, étape 8). Ne pas utiliser de multipette pour le lavage de la microplaque.
- Le test doit être effectué dans une zone suffisamment ventilée.
- Éliminer les contenants et les contenus non utilisés conformément aux exigences fédérales, nationales et réglementations réglementaires locales.
- Porter des gants et des lunettes de protection, et suivre les bonnes pratiques de laboratoire en manipulant cette trousse.
- Lavez-vous soigneusement les mains après manipulation.
- Pour en savoir plus sur les symboles de danger, la sécurité, la manipulation et l'élimination des composants de ce kit, veuillez vous référer à la Fiche de données de sécurité (FDS) que vous trouverez sur quidel.com.

CONSERVATION

Conserver le kit à 2°C à 8°C avant l'ouverture. Amener tous les réactifs à température ambiante 18°C à 28°C avant le dosage. Refermer avec soin la pochette contenant le reste des barrettes et la conserver à 2°C à 8°C.

INDICATIONS D'INSTABILITÉ OU DE DÉTÉRIORATION DES RÉACTIFS

Éliminer la solution de lavage si on observe l'apparition de trouble ou de décoloration.

RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Manipuler et éliminer les échantillons selon la réglementation en vigueur.

Toutes les manipulations d'échantillons doivent être faites à 2°C à 8°C.

Recueil des échantillons

Le recueil, la manipulation et la conservation des échantillons sont importants dans la mesure où le C5a peut être généré lors de manipulations inadéquates à travers une activation artificielle du complément.

Les valeurs obtenues pour des échantillons de sérums normaux seront plus élevées que celles que l'on obtient avec des échantillons de plasmas normaux prélevés sur EDTA ou citrate. On peut donc considérer que les taux de C5a obtenus sur plasmas EDTA ou citrate sont plus représentatifs des taux observés *in vivo*.²⁵

On prélèvera les échantillons de sérum ou de plasma EDTA ou citrate de façon aseptique, selon les techniques standard.²⁶ Doser immédiatement les échantillons ou bien les conserver à 4°C ou sur de la glace (4 heures maximum) jusqu'au dosage.

Si l'échantillon ne peut être testé dans les 4 heures comme décrit précédemment, on le congèlera à -70°C.

On peut aussi utiliser la **Solution Stabilisante pour Echantillon** (Réf: No. A9576) pour préparer les sérums et les plasmas humains avant de les stocker. Pour bien utiliser ce produit Quidel, on mélangera l'échantillon et la solution à volume égal avant la congélation. D'autres informations techniques sont disponibles sur demande.

Congélation/Décongélation des échantillons

Décongeler rapidement les échantillons congelés à 37°C. Placer immédiatement les échantillons tout juste décongelés sur de la glace (pas plus de 8 heures) avant de faire la dilution, afin d'empêcher l'activation du complément. Ne pas laisser les échantillons à 37°C, car on risque d'observer une activation du complément. Ne pas décongeler les échantillons à température ambiante ou sur de la glace, ce qui pourrait entraîner une activation du C5, et modifier les résultats. Doser aussitôt que possible les échantillons après leur décongélation. Ne pas effectuer plus de 3 cycles de congélation/décongélation. S'il est nécessaire de recongeler des échantillons pour une analyse ultérieure, Quidel recommande de préparer plusieurs aliquotes, afin d'éviter les cycles de congélation/décongélation.

Dilution des échantillons

ATTENTION: Traiter tous les échantillons comme potentiellement infectieux. Ne pas utiliser des échantillons inactivés par la chaleur, contaminés ou mal conservés.

REMARQUE: Se reporter au paragraphe RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS pour savoir comment bien décongeler les échantillons. Une bonne manipulation des échantillons est essentielle pour obtenir des résultats fiables.

Quidel suggère de diluer les plasmas normaux au 1:20 à l'aide du Diluant pour échantillon; les échantillons de sérum doivent être dilués au 1:50. On peut avoir besoin de diluer au 1:200 ou plus des échantillons qui possèdent un taux élevé de C5a. Les échantillons **doivent** être dilués de telle sorte que les valeurs de A₄₅₀ observées soient supérieures à la PPQM et ne soient pas supérieures à la valeur de A₄₅₀ du standard E. Les échantillons dont les valeurs de A₄₅₀ se trouvent en dehors de cette fourchette doivent être redosés avec une autre dilution.

Déterminer le nombre (N) d'échantillons à tester. Numéroter des tubes de #1 à #N, et noter à quel spécimen correspond chaque tube. Préparer une dilution appropriée (voir le paragraphe précédent) de

chacun des échantillons à l'aide du Diluant pour échantillon. Bien mélanger en évitant la formation de mousse ou de bulles. Ne pas conserver ou réutiliser les échantillons dilués.

Addition des échantillons dilués dans les puits

Cette opération doit durer moins de 15 minutes. L'une des 2 méthodes suivantes pourra être utilisée pour l'addition des échantillons dilués, des Standards, des Contrôles et du tampon dans les puits (voir l'étape 6 du *PROTOCOLE DE DOSAGE*). Pour doser quelques échantillons, les échantillons dilués et les autres réactifs peuvent être ajoutés directement dans les puits correspondants à l'aide d'une micropipette (100 µL/puits). Pour des séries, en particulier si le nombre d'échantillons est important, l'utilisation d'une multipipette est recommandée, et on pipettera les échantillons de la façon suivante:

Afin d'ajouter les Standards, Contrôles et échantillons dilués aussi vite que possible dans les puits, on peut employer une deuxième microplaque. Au lieu d'ajouter 100 µL de chaque Standard, Contrôle ou échantillon dilué individuellement dans les puits recouverts d'anticorps, 120-130 µL de chaque solution peuvent être ajoutés dans les puits d'une plaque vierge (non fournie), en respectant le même ordre que la microplaque du kit. Lorsque tous les échantillons à tester ont été ajoutés dans les puits de la plaque vierge, on pourra rapidement, à l'aide d'une multipipette, transférer 100 µL de chaque puits de cette plaque vierge vers les puits recouverts d'anticorps. Afin d'éviter toute contamination croisée, on changera les embouts de la multipipette à chaque nouvelle série d'échantillons.

On peut également employer cette technique de deuxième plaque pour ajouter le Conjugué, le Substrat et la Solution d'Arrêt.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Amener tous les réactifs à 18°C à 28°C avant usage.

Après utilisation, conserver les différents constituants et réactifs inutilisés à la température requise (voir le paragraphe *CONSERVATION*).

1. Les Standards et les Contrôles

Les Standards et les Contrôles ne nécessitent pas de dilution ou de préparation avant usage.

2. Solution de Lavage

Mélanger la Solution de Lavage Concentrée 20X en inversant à plusieurs reprises le flacon. Si la Solution de Lavage Concentrée 20X a été conservée à 2°C à 8°C, on peut observer la formation de cristaux. Pour dissoudre ces cristaux, réchauffer le flacon dans un bain Marie à 37°C à 50°C jusqu'à dissolution, et mélanger soigneusement. Préparer la Solution de Lavage en diluant le contenu d'un des flacons de Solution de Lavage Concentrée 20X dans de l'eau distillée ou désionisée, afin d'obtenir un volume final de 1 litre. Bien mélanger. La Solution de Lavage est stable 30 jours à 2°C à 8°C. Éliminer le réactif en cas d'apparition de trouble ou de décoloration.

3. Barrettes de puits

Déterminer le nombre de barrettes nécessaires pour le dosage. Il est recommandé de doser en double les blancs, les Contrôles et les Standards. Refermer avec soin la pochette contenant le reste des barrettes et la conserver à 2°C à 8°C. Placer les barrettes destinées au dosage sur le support.

DOSAGE

Lire le protocole en entier avant de commencer le dosage.

Voir les paragraphes *PRÉPARATION DES RÉACTIFS* et *ATTENTION*.

1. Noter les positions des puits correspondants aux blancs, Échantillons, Standards et Contrôles, ainsi que les numéros de lots indiqués sur les étiquettes des flacons. Repérer un coin de la plaque.

2. Préparer les barrettes de la façon suivante:
 - a. Réhydrater les puits de la microplaque en ajoutant environ 300 µL de Solution de Lavage dans chacun des puits à l'aide d'une bouteille de lavage ou d'un système automatique.
 - b. Incuber deux minutes à 18°C à 28°C.
 - c. Aspirer le contenu des puits.
 - d. Ajouter environ 300 µL de Solution de Lavage dans chaque puits.
 - e. Aspirer le contenu des puits.
 - f. Répéter les étapes d-e encore une fois, on aura donc au total 3 lavages.**
 - g. Inverser la plaque en la tapotant fermement à 2 reprises sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
3. Sélectionner 1 ou plusieurs puits pour servir de blanc(s). Ajouter 100 µL de Diluant pour échantillon dans ces puits.
4. Ajouter 100 µL de chaque Standard C5a (A, B, C, D, E) dans les puits en duplicate. **REMARQUE: Les Standards sont prêts à l'emploi et ne nécessitent pas de dilution.**
5. Ajouter 100 µL de chacun des 2 Contrôles C5a Faible et Fort dans les puits en duplicate. **REMARQUE: Les Contrôles sont prêts à l'emploi et ne nécessitent pas de dilution.**
6. Ajouter 100 µL de chacun des échantillons dilués dans les puits correspondants. (Voir le paragraphe *Dilution des échantillons*).
7. Incuber à 18°C à 28°C 60 ± 1 minutes.
8. Laver les puits de la façon suivante:
 - a. Après l'incubation de l'étape 7 (ou de l'étape 10 ci-dessous) aspirer le liquide contenu dans les puits.
 - b. Ajouter environ 300 µL de Solution de Lavage dans chaque puits, à l'aide d'une bouteille de lavage ou d'un système automatique.
 - c. Aspirer le contenu des puits.
 - d. Répéter les étapes b-c encore quatre fois.**
 - e. Après le 5^{ème} lavage, inverser la plaque en la tapotant fermement à 2 reprises sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
9. A l'aide d'une multipipette ou d'une pipette automatique, pipeter 100 µL de Conjugué C5a dans chaque puits, y compris ceux qui correspondent au(x) blanc(s).
10. Incuber les barrettes à 18°C à 28°C pendant 60 ± 1 minutes.
11. Après cette incubation de 60 minutes, répéter l'étape de lavage décrite à l'étape 8.
12. Immédiatement après ce lavage, pipeter 100 µL de Solution de Substrat dans tous les puits y compris ceux qui correspondent au(x) blanc(s).
13. Incuber les barrettes à 18°C à 28°C pendant 15 (± 1) minutes.
14. Ajouter 100 µL de Solution d'Arrêt dans tous les puits pour arrêter la réaction enzymatique. Ajouter la Solution d'Arrêt dans le même ordre et avec la même vitesse que lors de l'addition de la Solution de Substrat. Tapoter doucement la plaque pour permettre un développement uniforme de la coloration. **REMARQUE: On obtiendra de meilleurs résultats si on utilise la fonction auto-mix du lecteur de microplaques (si elle existe) juste avant de lire la plaque.**
15. Lire l'absorption à 450 nm (Valeur de A_{450}) pour chaque puits dans les 60 minutes qui suivent l'addition de la Solution d'Arrêt (étape 14), en faisant une correction pour les blancs.
16. Lire la concentration des échantillons et des Contrôles à partir de la courbe standard.
17. Eliminer le reste des échantillons dilués, Contrôles et barrettes utilisées (voir le paragraphe *ATTENTION*).

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent d'utiliser des contrôles pour s'assurer que le dosage fonctionne correctement. Chaque kit de C5a contient un Contrôle Faible et un Contrôle Fort que l'on pourra utiliser à cet effet. On fournit des fourchettes de valeurs pour ces Contrôles.

Les valeurs des Contrôles doivent permettre de vérifier la validité des courbes standards et des résultats obtenus pour les échantillons. Chaque laboratoire doit établir ses propres critères de validation. Si les valeurs obtenues pour les Contrôles ne sont PAS dans les limites acceptables pour votre laboratoire, on considèrera les résultats obtenus comme douteux, et il faudra redoser les échantillons. De plus, le Mode

d'Emploi contenu dans le kit donne un certain nombre de critères d'acceptation. Si le dosage obtenu ne les respecte pas, refaire le dosage ou contacter le Service Technique de Quidel.

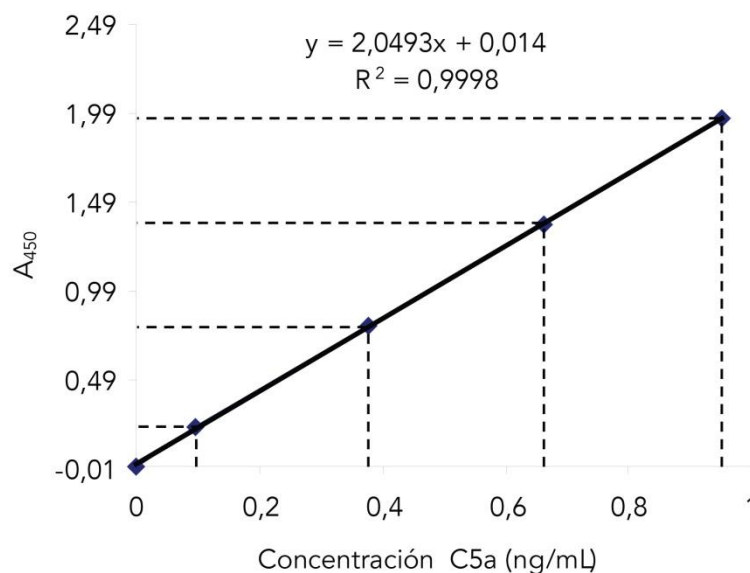
Le Certificat d'Analyse inclus dans ce kit est spécifique du lot et doit être utilisé pour vérifier si les résultats obtenus dans votre laboratoire sont semblables à ceux qui ont été obtenus par Quidel Corporation.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Calcul des Résultats

Utilisation de la Courbe Standard: On trace la courbe standard du dosage EIA C5a en plaçant sur l'axe des y les valeurs A_{450} de chaque standard (dont on aura préalablement soustrait la valeur du blanc), et sur l'axe des x la concentration correspondante. La courbe standard doit répondre aux critères de validation. La plupart des ordinateurs peuvent effectuer ces calculs. On trouvera ci-dessous un exemple de courbe standard (Figure 1).

Figure 1
Exemple de courbe standard



Échantillon	A_{450}	ng/mL
Standard A	-0,001	0
Standard B	0,225	0,095
Standard C	0,789	0,378
Standard D	1,369	0,661
Standard E	1,965	0,953
$r = 0,9998$	$m = 2,0493$	$b = 0,014$

Calcul de la concentration en C5a des échantillons

Les concentrations indiquées sur les flacons de Standards et de Contrôles sont des unités absolues de complexe C5a. La concentration en C5a d'un échantillon est calculée en multipliant la concentration lue sur la courbe par le facteur de dilution de l'échantillon. Par exemple si pour un échantillon de plasma EDTA dilué au 1:20, on obtient une concentration de 0,5 ng C5a/ml sur la courbe obtenue par régression linéaire, la concentration en C5a de l'échantillon sera égale à 10 ng C5a/ml (ou $20 \times 0,5$).

Si la valeur de A_{450} pour un échantillon donné est supérieure à celle du Standard C5a E le plus élevé du kit (ou si les valeurs obtenues sont inférieures à la PPQM), on redosera l'échantillon en modifiant la dilution, afin d'obtenir des valeurs de A_{450} comprises dans ces limites. Il faudra redoser également les Standards et les Contrôles C5a.

Validation

Déterminer la pente, l'interception et le coefficient de corrélation de la droite obtenue à l'aide des Standards C5a A, B, C, D et E. Pour valider le dosage, les valeurs obtenues doivent être dans les fourchettes suivantes:

coefficient de corrélation (r):	> 0,98
pente (m):	1,14-2,50
interception avec l'axe des y (b):	(-)0,0145 à (+)0,0532

Se reporter aux étiquettes des flacons ou à la fiche de contrôle pour connaître les fourchettes de concentrations correspondant aux Contrôles Fort et Faible.

LIMITATIONS

On a utilisé le dosage ELISA MicroVue C5a sur des échantillons de sérum ou de plasma recueillis sur EDTA ou sur citrate. On n'a pas testé d'autres anticoagulants.

VALEURS OBSERVÉES

On a dosé dans le dosage ELISA MicroVue C5a des plasmas et des sérums provenant de vingt (20) donneurs apparemment sains. Les résultats sont présentés ci-dessous.

	n	Moyenne (ng/ml)	Valeurs Extrêmes (ng/ml)
EDTA Plasma	20	20,65	0,37 à 74,33
Sérum	20	50,09	13,37 à 179,23

REMARQUE: Les concentrations en C5a mesurées pour les échantillons de plasma et de sérum peuvent varier selon les laboratoires. Il est donc préférable que chaque laboratoire établisse ses propres normales. Les concentrations qui figurent ci-dessus ne sont donc données qu'à titre indicatif.

CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

Limites

LD: La limite de détection (LD) pour le dosage C5a est égale à 0,01 ng/ml, calculée comme la limite supérieure obtenue pour 3DS dans une étude de précision réalisée à l'aide du standard zéro.

PPQM: La plus petite quantité mesurable (PPQM) du dosage C5a est égale à 0,050 ng/ml. C'est la plus petite concentration lue sur la courbe standard, en suivant les recommandations du NCCLS pour l'exactitude et la précision.

Substances Interférentes

On n'a pas observé d'interférences pour les substances suivantes, testées selon les concentrations indiquées:

Substance	Concentration
Bilirubine	40 mg/dl
Hémoglobine	500 mg/dl
Triglycérides	3000 mg/dl
Na + Héparine	14 U/ml
C5 Protéine	80 mg/l
Glucose	1000 mg/dl
Cholestérol	500 mg/dl

On a montré que des taux d'albumine > 118,6 mg/ml ou de gamma globulines > 8,9 mg/dl présents dans les échantillons non dilués interfèrent dans le dosage. Ces échantillons devront donc être dilués en conséquence.

Précision

On a dosé à 20 reprises 2 échantillons de plasma et 2 échantillons de sérum (Précision intra-essai) et on a dosé ces mêmes échantillons dans 10 dosages différents (Précision inter-essais).

Echantillon	C5a (ng/ml)	C.V. Intra-essai ¹ (%)	C.V. Inter-essais ² (%)
EDTA Plasma	12,34	3,8	9,9
	1,41	3,9	13,0
Sérum	30,13	3,6	7,1
	21,92	3,5	7,8

¹n = 20 ²n = 10 dosages

Linéarité

On a évalué la linéarité en diluant en cascade des échantillons à l'aide du Diluant pour échantillon et en comparant les valeurs obtenues aux valeurs attendues.

Echantillon	Facteur de Dilution	Observé C5a (ng/ml) ³	Attendu C5a (ng/ml) ³	Récupération (%)
EDTA Plasma	10	1,214	1,266	96%
	20	0,667	0,633	105%
	40	0,343	0,317	108%
	80	0,164	0,158	103%
	160	0,077	0,079	98%
	320	0,035	0,040	88%
Sérum	25	0,873	0,864	99%
	50	0,465	0,432	93%
	100	0,236	0,216	92%
	200	0,115	0,108	94%
	400	0,054	0,054	100%
	800	0,024	0,027	113%

³Facteur de dilution non inclus

ASSISTANCE

Pour une commande ou une question technique, veuillez contacter votre distributeur local. Vous trouverez les informations sur Quidel, ses produits et ses distributeurs sur le site www.quidel.com.

RÉFÉRENCES

1. Tack, Brian F., Sam C. Morris, and James W. Prahl. "Fifth component of human complement: purification from plasma and polypeptide chain structure." *Biochemistry* 18(8) (1979): 1490-1497.
2. Guo, Ren-Feng and Peter A. Ward. "Role of C5a in Inflammatory Responses." *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005): 821-852.
3. Hugli, T. E. "Biochemistry and biology of anaphylatoxins." *Complement* 3(3) (1986): 111-127.
4. Yancey, K. B. "Biological properties of human C5a: selected *in vitro* and *in vivo* studies." *Clin. Exp. Immunol.* 71 (1988): 207-210.

5. Hoenich, Nicholas A. and Kostas P. Katopodis. "Clinical characterization of a new polymeric membrane for use in renal replacement therapy." *Biomaterials* 23(18) (2002): 3853-3858.
6. Christine S. Rinder et al. "Selective blockade of membrane attack complex formation during simulated extracorporeal circulation inhibits platelet but not leukocyte activation." *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 118(3) (1999): 460-466.
7. Smith, Brian Richard, Henry M. Rinder, and Christine S. Rinder. "Interaction of Blood and Artificial Surfaces." *Thrombosis and Hemorrhage, 3rd ed.* Eds. J. Loscalzo and A. I. Schafer. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 865-885.
8. Yvan Gasche et al. "Complement depletion during haemofiltration with polyacrylonitrile membranes." *Nephrol. Dial. Transplant* 11 (1996): 117-119.
9. Claudia Sperling et al. "In vitro blood reactivity to hydroxylated and non-hydroxylated polymer surfaces." *Biomaterials* 2007, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.041.
10. Frangogiannis, Nikolaos G., Wayne C. Smith, and Mark L. Entman. "The inflammatory response in myocardial infarction." *Cardiovascular Res.* 53 (2002): 31-47.
11. Walter S. Speidl et al. "Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis." *Euro. Heart Journal* 26 (2005): 2294-2299.
12. Langlois, Paul F. and Maria S. Gawryl. "Detection of the terminal complement complex in patient plasma following acute myocardial infarction." *Atherosclerosis* 70 (1988): 95-105.
13. Jawed Fareed et al. "Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes." *Clin. Chem.* 48(8) (1998): 1845-1853.
14. Antti P. Vakeva et al. "Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: Role of the Terminal Complement Components and inhibition by anti C5 therapy." *Circulation.* 97 (1998): 2259-2267.
15. Thiruma V. Arumugam et al. "Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death." *PNAS* 104(35) (2007): 14104-14109. doi:10.1076/pnas.0700.506.104.
16. Van Beek, Johan, Kristina Elward, and Philippe Gasque. "Activation of Complement in the Central Nervous System: Roles in Neurodegeneration and Neuroprotection." *Ann. NY Acad. Sci.* 992 (2003): 56-71.
17. Sheerin, N. S. and S. H. Sacks. "Leaked protein and interstitial damage in the kidney: is complement the missing link?" *Clin. Exp. Immunol.* 130 (2002): 1-3.
18. T. R. Welch et al. "C5a is important in the tubulointerstitial component of experimental immune complex glomerulonephritis." *Clin. Exp. Immunol.* 130 (2002): 43-48.
19. Thomas Muller et al. "Detection of renal allograft rejection by complement components C5a and TCC in plasma and urine." *J. Lab. Clin. Med.* 129 (1997): 62-71.
20. A. Conroy et al. "C5a Enhances Dysregulated Inflammatory and Angiogenic Responses to Malaria *In vitro*: Potential Implications for Placental Malaria." *PLoS ONE* 4(3) 2009: e4953. doi:10.1371/journal.pone.0004953.
21. A. Bengtsson et al. "Anti-TNF Treatment of Baboons with Sepsis Reduces TNF- α IL-6 and IL-8, but not the Degree of Complement Activation." *Scand. J. Immunol.* 48 (1998): 509-514.
22. Haas, Pieter-Jan and Jos van Strijp. "Anaphylatoxins: Their Role in Bacterial Infections and Inflammation." *Immunol. Res.* 37(3) (2007): 161-175.
23. Ren-Feng Guo et al. "In vivo regulation of neutrophil apoptosis by C5a during sepsis." *J. Leukoc. Biol.* 80(6) (2006): 1575-1583.
24. Ward, Peter A. "Role of the complement in experimental sepsis." *J. Leukoc. Biol.* 83(3) (2008): 467-470.
25. Mollnes, T. E., P. Garred, and G. Bergseth. "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. Immunol.* 73(3) (1988): 484-488.
26. Centers for Disease Control. "Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings." *MMWR.* 1987 36 (suppl. No. 2S):001.

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA025001FR00 (02/17)

GLOSSAIRE

REF

Référence catalogue



Conformité Européenne

EC REP

Représentant autorisé dans
la Communauté Européenne

LOT

Référence du lot



Date d'expiration



Fabricant



Conditions de stockage



Utilisation prévue



Consulter les instructions
électroniques

IVD

Pour utilisation *in vitro*



Contenu suffisant pour 96 déterminations

CONT

Contenu

CONTROL

Contrôle
