

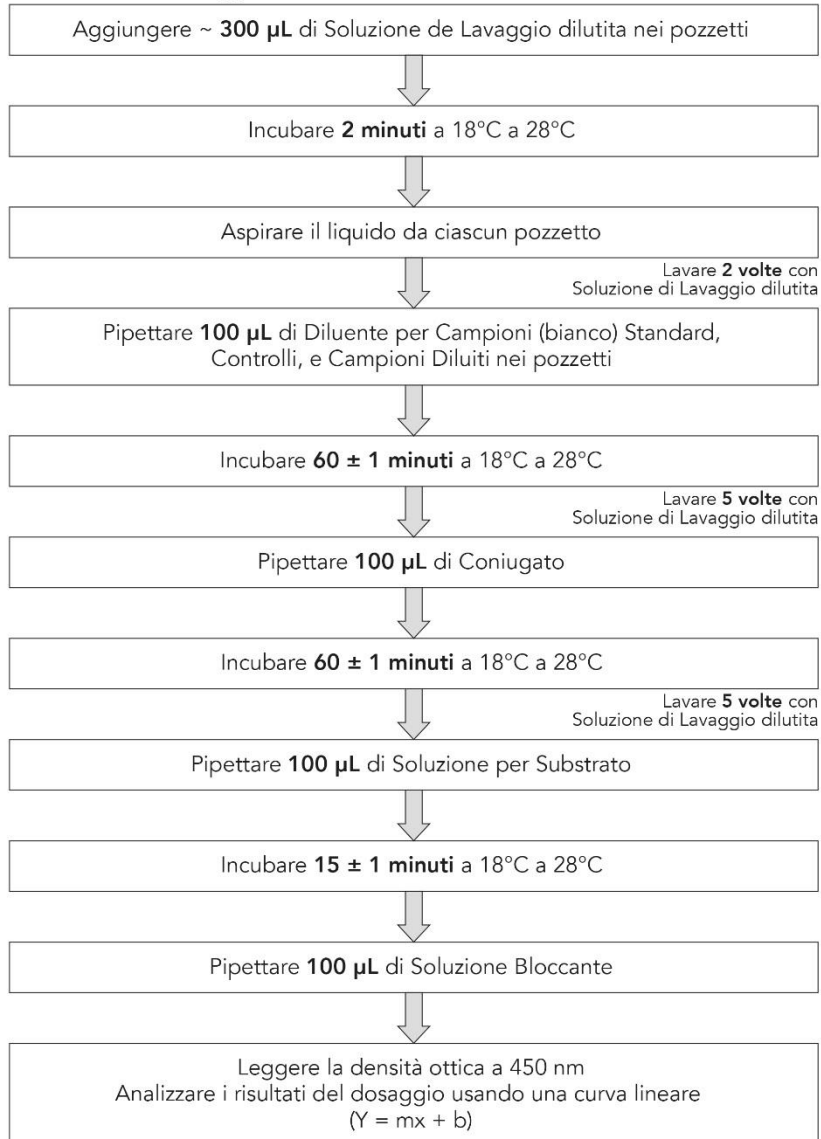
MicroVue C5a è un dosaggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa di C5a nel siero e nel plasma umani

SOMMARIO

Preparazione Reagente e Campione

- Diluire la Wash Solution Concentrat 1:20 con Acqua Deionizzata
- Diluire i campioni di Siero 1:50 con il Diluente per Campioni di Complemento (es. 10 µL + 490 µL).
- Diluire i campioni di Plasma 1:20 con il Diluente per Campioni di Complemento (es. 20 µL + 380 µL).

Procedura del Dosaggio





MicroVue C5a è un dosaggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa di C5a nel siero e nel plasma umani.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Il Dosaggio Immunoenzimatico MicroVue C5a è un immunodosaggio a cattura diretta a 96 pozzetti per la misurazione del C5a nel siero o nel plasma umano.

In condizioni normali, l'attivazione delle sequenze classica, alternativa o del complemento lectina porta alla formazione dell'enzima multi-molecolare C5 convertasi in grado di scindere C5 in C5a e C5b.^{1,2} C5b è un costituente chiave del Complesso Complemento Terminale ed ha una varietà di funzioni in questo ruolo. C5a è un frammento proteico a basso peso molecolare (approssimativamente 9kD) di 74 amminoacidi.³ C5a viene rapidamente metabolizzato dall'enzima sierico carbossipeptidasi in una forma più stabile, la C5a des-Arg^{2,3}, meno attiva, di 73 aminoacidi. Per comodità, entrambe le forme si riferiscono a "C5a" in questo documento.

Il dosaggio MicroVue C5a, che fornisce un sistema quantitativo, rapido e altamente specifico per la determinazione dei livelli di C5a, è destinato per indagini nel ruolo o nello stato di sequenze dell'attivazione del complemento terminale, e per il monitoraggio della generazione del C5a *in vivo* o *in vitro*.⁴ Come la maggior parte delle anafilotossine, C5a ha una gamma di funzioni biologiche² che include la degranolazione dei mastociti, chemiotassi, l'attivazione cellulare attraverso il legame con il Recettore C5a² (C5aR o CD88). La ricerca ha associato livelli elevati di fase fluida a C5a assorbito con emoincompatibilità di alcuni materiali, in particolare nei circuiti extracorporei⁵⁻⁹. La ricerca ha anche associato i livelli di C5a con la patogenesi di una varietà di patologie che includono l'infarto del miocardio¹⁰⁻¹⁴, ictus^{15,16}, così come la sindrome da aumentata permeabilità vascolare e associate lesioni renali¹⁷⁻¹⁹. Il ruolo del C5a nella patogenesi della malaria²⁰ e di altre malattie infettive, così come la sepsi,²¹⁻²⁴ è altrettanto ben documentato.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il Dosaggio Immunoenzimatico MicroVue C5a è una procedura a tre step che utilizza (1) una micropiastra coattata con un anticorpo monoclonale murino specifico per un neo-epitopo del C5a umano, (2) un anticorpo monoclonale murino coniugato con fosfatasi alcalina di rafano (HRP) specifico per la regione C5a del C5 e (3) un substrato cromogenico.

Nella prima fase, Standard, Controlli e campioni diluiti sono aggiunti ai pozzetti coattati con un anticorpo monoclonale murino specifico per C5a. L'anticorpo monoclonale si lega alla regione C5a presente negli standard, nei controlli o nei campioni. Dopo un periodo di incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove quanto non si è legato.

Nella seconda fase, l'anti-C5 (C5a) murino coniugato con perossidasi di rafano (HRP) viene aggiunto a ciascun pozzetto. L'enzima coniugato anti C5 (C5a) si lega al C5a immobilizzato catturato nella prima fase. Dopo un periodo di incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove il coniugato non legato.

Nella terza fase, una soluzione di substrato cromogenico 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB), pronta all'uso, viene aggiunta ai singoli pozzetti. Il coniugato HRP che si è legato (quindi immobilizzato sul fondo dei pozzetti) reagisce con il substrato, formando un colore giallo. Dopo un periodo di incubazione, la reazione viene fermata chimicamente, il che si traduce in una variazione di colore dal blu al giallo, confermando che la reazione ha avuto luogo. L'intensità del colore viene misurata con uno spettrofotometro a A₄₅₀. L'intensità del colore della miscela di reazione è proporzionale alla concentrazione di C5a presenti nei campioni, negli standard e nei controlli. I risultati sono calcolati a partire dalla curva standard generata utilizzando analisi di regressione lineare.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

96 Test per il Complesso C5a

Il kit MicroVue C5a EIA contiene quanto segue:

A	C5a Standard	Codice 5131 – 5135	1 ciascuno, 1,5 mL
B	Pronti all'uso. Contiene siero umano con concentrazione note di C5a (ng/mL), con stabilizzanti		
C	proteici.		
D			
E			
L	Controllo Basso	Codice 5136	1,5 mL
	Pronto all'uso. Contiene siero umano con a concentrazione nota di C5a (ng/mL), e stabilizzanti proteici.		
H	Controllo Alto	Codice 5137	1,5 mL
	Pronto all'uso. Contiene siero umano con concentrazione nota di C5a (ng/mL), e stabilizzanti proteici.		
1	Strisce Coattate	Codice 5129	12 ciascuno
	Otto pozzetti ciascuna, coattate con anticorpo monoclonale murino in una busta richiudibile		
2	Soluzione bloccante	Codice A9947	12 mL
	Contiene Acido Cloridrico 1N (4%)		
3	Soluzione di Lavaggio Concentrata 20X	Codice A9957	2 x 50 mL
	Contiene tampone fosfato (PBS), 1,0% Tween-20®, e 0,035% ProClin® 300		
4	Diluente Campione	Codice A3670	50 mL
	Contiene PBS, 0,05% di Tween-20, 2,5% Stabilizzante proteine, 0,035% ProClin 300		
5	Substrato TMB	Codice 5059	12 mL
	Pronto all'uso. Contiene 3,3',5,5'-tetramethylbenzidene (TMB)		
6	Coniugato	Codice 5130	12 mL
	Contiene anticorpo monoclonale murino anti-C5a coniugato con Perossidasi di Rafano		

Tween-20® è un trademark registrato da ICI Americas Inc.
ProClin® è un trademark registrato da Rohm and Haas Company.

MATERIALI RICHIESTO MA NON FORNITO

- Timer (intervallo di tempo 60 minuti)
- Calcolatrice o altri metodi di calcolo per validare il dosaggio
- Micropiastre pulite, inutilizzate e provette con rack.
- Contenitore graduato per la diluizione del tampone di lavaggio
- Sistemi di lavaggio per micropiastre
- Pipetta multicanale regolabile (8 o 12 canali) o micropipette ripetibili (opzionali)
- Pipette pulite da 1 mL, 5 mL, e 10 mL
- Micropipette e puntali sterili, monouso
- Lettore per piastra – densità ottica A₄₅₀ tra 0,0 e 3,0
- Acqua deionizzata o distillata

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Non destinato alla vendita o all'uso negli Stati Uniti o in Canada.
- Trattare i campioni come materiale potenzialmente infetto.
- Seguire le Precauzioni Universali nel maneggiare il contenuto del kit e i campioni dei pazienti.
- Usare i reagenti forniti come un'unica unità entro la data di scadenza riportata sull'etichetta della confezione.

- Conservare i reagenti come indicato.
- Non usare le Strisce Coattate se la busta è forata.
- ProClin 300 viene usato come conservante. Un contatto accidentale o l'ingestione dei tamponi o dei reagenti che lo contengono possono causare irritazione alla pelle, occhi o bocca. Usare le buone pratiche di laboratorio per ridurre l'esposizione. with or ingestion of buffers or reagents containing ProClin can cause irritation to the skin, eyes or mouth. Use good laboratory practices to reduce exposure. Rivolgersi al medico se i sintomi sono troppo evidenti.
- La Stop Solution è considerata corrosiva e può causare irritazione. Non ingerire. Evitare il contatto con occhi, pelle e indumenti. Se avviene il contatto, lavare immediatamente ed abbondantemente l'area colpita con acqua. Se ingerita, contattare un medico.
- Ogni unità dei donatori utilizzata per la preparazione degli standard e dei sieri di controllo di questo prodotto è stato testato da un metodo approvato dalla FDA per la presenza di anticorpi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV1 e HIV2) e del virus dell'epatite C, così come dell' antigene di superficie dell' epatite B. Dal momento che nessun metodo è in grado di offrire una assoluta certezza che gli agenti infettivi siano assenti, questi reagenti devono essere gestiti a livello di biosicurezza 2 (Biosafety Level2), come raccomandato per ogni campione di siero o di sangue umano potenzialmente infetto dal Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2007.
- L'uso di pipette multicanali o pipettatori ripetibili è raccomandato per assicurare tempestivamente la dispensazione dei reagenti.
- Per un accurato dosaggio dei campioni, aggiungere standard e campioni in maniera precisa. Pipettare accuratamente usando solo pipette calibrate.
- Raccolta e conservazione adeguate dei campioni sono essenziali per ottenere risultati accurati (vedi *PREPARAZIONE E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI*).
- Evitare contaminazione microbica o cross -contaminazione di campioni o reagenti.
- Dosare ciascun campione in duplicato.
- Non usare lo stesso pozzetto per più di un test.
- L'uso di altri tempi di incubazione e altre temperature rispetto a quelle indicate nella Procedura può dare risultati non corretti.
- Il Substrato TMB deve essere protetto dalla luce durante la conservazione e l'incubazione. Evitare il contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti. Se dovesse avvenire il contatto, lavare immediatamente con acqua.
- Non lasciare asciugare i pozzetti durante il dosaggio.
- Rimuovendo il liquido dai pozzetti, non intaccare o anche solo toccare il fondo del pozzetto.
- Campioni contaminati, iperlipemici, inattivati dal calore possono dare risultati errati.
- Per evitare la formazione di aerosol durante il lavaggio, usare un sistema che aspiri il liquido di lavaggio all'interno di una bottiglia contenente candeggina.
- Per lavare la micropiastra si dovrebbe usare un sistema automatico di riempimento o una bottiglia (*PROCEDURA DEL DOSAGGIO*, Step 8). Per ottenere migliori risultati, non usare una pipetta multicanale per lavare la micropiastra.
- I test devono essere effettuati in un'area dotata di ventilazione adeguata.
- Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con la normativa nazionale e locale in vigore.
- Indossare indumenti protettivi, guanti, e protezione occhio/viso durante l'utilizzo del kit.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo la manipolazione.
- Per ulteriori informazioni su simboli di pericolo, sicurezza, manipolazione e smaltimento dei componenti di questo kit, consultare la scheda di sicurezza (SDS) reperibile su quidel.com.

CONSERVAZIONE

Conservare il kit chiuso a 2°C a 8°C. Portare i reagenti e i materiali per il dosaggio a 18°C a 28°C prima dell'uso. Posizionare tutte le strisce inutilizzate nella busta di conservazione, sigillarla e conservarla a 2°C a 8°C.

INDICAZIONI DELL'INSTABILITA' O DEL DETERIORAMENTO DEI REAGENTI

Torbidità o alterazione del colore della soluzione di lavaggio diluita indica un deterioramento di questo reagente. Se ciò dovesse avvenire, la soluzione va eliminata.

TRATTAMENTO CAMPIONI E PREPARAZIONE

Trattare e smaltire i campioni secondo le Precauzioni Universali.

Tutte le operazioni di manipolazione dei campioni devono essere effettuate a 2°C a 8°C.

Raccolta Campione

La corretta raccolta, trattamento e conservazione dei campioni è fondamentale dato che il C5a può essere generato in campioni utilizzati impropriamente attraverso un'attivazione artefatta del complemento.

I valori dei campioni serici normali saranno più alti di quelli ottenuti sui campioni di plasma EDTA o citrato. I livelli di C5a nel plasma EDTA o citrato possono essere più accuratamente determinati *in vivo*.²⁵

I campioni di siero, plasma EDTA o citrato dovrebbero essere raccolti in maniera asettica usando le procedure standard.²⁶ I campioni andrebbero dosati immediatamente o conservati a 4°C o su ghiaccio per non più di 4 ore prima di essere dosati.

Se il campione non può essere dosato entro quattro ore come descritto dalle linee guida di cui sopra, il campione va congelato a -70°C o inferiore.

Una **Soluzione Stabilizzante il Campione** (Codice №. A9576, Specimen Stabilizing Solution) può essere anche usata per preparare campioni di siero o plasma umani da conservare. L'uso adeguato di questo prodotto, disponibile solo da Quidel, richiede che il campione venga miscelato in rapporto 1:1 con la soluzione prima del congelamento. Ulteriori informazioni tecniche relative alla soluzione sono disponibili su richiesta.

Scongelamento dei Campioni Congelati

Scongelare i campioni congelati rapidamente a 37°C fino a quasi scongelamento. Trasferire i campioni scongelati immediatamente su ghiaccio (per non più di otto ore) per prevenire l'attivazione del complemento prima della diluizione. **Non lasciare i campioni a 37°C**, in modo che avvenga l'attivazione del complemento. Non scongelare i campioni a temperatura ambiente o su ghiaccio perchè queste procedure possono portare all'attivazione del C5a e influire sui risultati. I campioni dovrebbero essere dosati appena possibile dopo scongelamento. Possono essere effettuati fino a 3 cicli di congelamento/scongelamento senza influire sui risultati. Se i campioni dovessero richiedere ulteriore congelamento per successive analisi, Quidel raccomanda di congelare più aliquote del campione per evitare cicli di congelamento/scongelamento.

Diluizione del campione

ATTENZIONE: Trattare tutti i campioni come potenzialmente pericolosi. Usare le Precauzioni Universali. Non utilizzare campioni calore-inattivati, contaminati, o non correttamente conservati.

NOTA: Vedere RACCOLTA DEL CAMPIONE E CONSERVAZIONE per le indicazioni importanti sui metodi più adatti per scongelare i campioni congelati. Il trattamento adeguato del campione è essenziale per ottenere risultati accurati.

Quidel suggerisce che i campioni di plasma normale debbano essere diluiti 1:20 con il diluente per campioni fornito; i campioni di siero devono essere diluiti 1:50. Una diluizione 1:200, o superiore, può essere richiesta per un campione con elevati livelli di C5a. I campioni **devono** essere diluiti in modo che i valori osservati a A₄₅₀ siano al di sopra del LLOQ e non superino il valore A₄₅₀ dello Standard E C5a. I campioni con letture a A₄₅₀ di fuori di questo intervallo devono essere ri-dosati ad una nuova diluizione.

Determinare il numero (N) di campioni da esaminare. Etichettare le provette da # 1 a # N, e registrare a quale campione corrisponde ciascun tubo. Preparare una diluizione appropriata (vedi punto precedente) di ciascun campione con il diluente per campioni. Mescolare accuratamente, ma evitare la formazione di schiuma e bolle. Non tenere o riutilizzare campioni diluiti.

Aggiunta Campioni Diluiti nei Micropozzetti.

L'aggiunta di campioni diluiti nei micropozzetti deve essere completato entro 15 minuti dalla dispensazione del primo campione. Uno dei due metodi può essere usato per aggiungere campioni diluiti, standard, controlli e buffer, ai pozzetti (vedere il punto 6 della *PROCEDURA DI DOSAGGIO*). Per il dosaggio di pochi campioni, i campioni diluiti e gli altri reagenti possono essere aggiunti direttamente nei pozzetti con una micropipetta (100 µL/pozzetto). Per dosaggi di molti campioni, si consiglia l'uso di una pipetta multicanale per l'aggiunta di campioni come segue.

Per caricare Standard, Controlli e campioni diluiti nei micropozzetti il più rapidamente possibile, può essere impiegata una procedura "replica plating". Invece di aggiungere 100 µL di ogni Standard, Controlli, o campione diluito al singolo pozzetto coattato dall'anticorpo, si possono aggiungere 120-130 µL di ciascuna soluzione ai singoli pozzetti in una micropiastra non coattata (non fornita) corrispondente al modello EIA finale desiderato. Dopo che tutte le soluzioni da dosare sono state aggiunte ai pozzetti nella micropiastra non coattata, si trasferiscono rapidamente 100 µL da ogni pozzetto della micropiastra non coattata in ciascun pozzetto coattato corrispondente, usando una micropipetta multicanale. Per evitare la possibilità di cross-contaminazioni, i puntali devono essere sostituiti ogni volta che vi sia un cambiamento nella composizione dei campioni da trasferire.

La procedura "replica plating" può essere usata per aggiungere comodamente il Coniugato, il Substrato e la Soluzione Bloccante.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE

Portare tutti i reagenti e i materiali a 18°C a 28°C prima dell'uso.

Dopo aver rimosso i reagenti e i materiali necessari, riportare quanto non si usa alle loro temperature di conservazione (vedi *CONSERVAZIONE*).

1. Standard e Controlli

Gli Standard e i Controlli non richiedono diluizione o preparazione prima dell'uso.

2. Soluzione di Lavaggio – Wash Solution

Agitare per inversione il flacone di la Soluzione di Lavaggio Concentrata 20X prima dell'uso. Se è stata conservata a 2°C a 8°C, si possono essere formati cristalli. Per scioglierli, scaldare la bottiglia in un bagnetto ad acqua a 37°C a 50°C fino a completa dissoluzione dei cristalli, e proseguire mescolando accuratamente. Preparare la Soluzione di Lavaggio diluendo tutto il contenuto di una delle bottiglie di lavaggio concentrata 20X fino a raggiungere un totale di un litro, con acqua distillata o deionizzata. Mescolare accuratamente. La Soluzione di Lavaggio è stabile per 30 giorni se conservata in un contenitore pulito a 2°C a 8°C. Se si verifica una perdita di colore o torbidità, smaltirla.

3. Selezionare Le Strisce

Calcolare il numero di pozzetti necessari al dosaggio. Si raccomanda di dosare Standard, Controlli e Campioni in duplicato. Le strisce non utilizzate vanno riposte nella busta, sigillare la busta e riportarla a 2°C a 8°C. Sistemare le strisce da usare nel dosaggio in un telaio da micropiastra.

Procedura del dosaggio

Leggere le istruzioni per l'uso prima di iniziare il dosaggio.

Vedere *PREPARAZIONE DEL REAGENTE e LIMITI E PRECAUZIONI*.

1. Annotare le posizioni dei pozzetti nella micropiastra corrispondenti al bianco, ai campioni, agli Standard e ai Controlli così come i numeridi lotto riportati sulle etichette dei flaconi. Segnare un angolo della micropiastra per l'orientamento.
2. Preparare le strisce come segue:
 - a. Reidratare i pozzetti aggiungendo circa 300 µL di Soluzione di Lavaggio — Wash Solution — a ciascun pozzetto usando una bottiglia per lavaggio o un dispositivo automatico di riempimento.
 - b. Incubare a 18°C a 28°C per due minuti.
 - c. Rimuovere il liquido da ciascun pozzetto.
 - d. Aggiungere circa 300 µL di Soluzione di Lavaggio a ciascun pozzetto.
 - e. Rimuovere il liquido da ciascun pozzetto.
 - f. Ripetere i passaggi da d a e ancora una volta per un totale di tre lavaggi.**
 - g. Capovolgere la micropiastra e tamponare in maniera decisa su carta assorbente per due volte per rimuovere residui di liquido di lavaggio.
3. Selezionare uno o più pozzetti come bianco. Aggiungere 100 µL di Diluente Campione — Specimen Diluent — ai pozzetti che saranno usati come bianco.
4. Aggiungere 100 µL di ciascuno Standard C5a (A, B, C, D, E) ai pozzetti in doppio. **NOTA: Gli standard sono già stati diluiti e sono pronti all'uso.**
5. Aggiungere 100 µL di Controllo Basso C5a e Controllo Alto C5a ai pozzetti in doppio. **NOTA: I controlli sono già stati diluiti e sono pronti all'uso.**
6. Aggiungere 100 µL di ciascun campione diluito nei pozzetti assegnati. (Vedere *DILUIZIONE DEL CAMPIONE*).
7. Incubare a 18°C a 28°C per 60 ± 1 minuti.
8. Lavare i pozzetti come segue:
 - a. Dopo l'incubazione del passaggio 7 (o nel passaggio 10 che segue) aspirare il liquido da ciascun pozzetto.
 - b. Aggiungere circa 300 µL di Soluzione di Lavaggio — Wash Solution — a ciascun pozzetto usando una bottiglia per lavaggio o un dispositivo automatico di riempimento.
 - c. Aspirare il liquido da ciascun pozzetto.
 - d. Ripetere i passaggi da b a c ancora quattro volte.**
 - e. Dopo il quinto ciclo di lavaggio, capovolgere la piastra, e tamponare in maniera decisa su carta assorbente per due volte per rimuovere residui di liquido di lavaggio.
9. Usando una pipetta multicanale o ripetitiva, dispensare 100 µL di Coniugato C5a in ciascun pozzetto lavato, compresi i pozzetti del bianco.
10. Incubare le strisce a 18°C a 28°C per 60 (± 1) minuti.
11. Lavare i pozzetti dopo l'incubazione di 60 minuti (passaggio 10) , come descritto nel passaggio 8 della *PROCEDURA DI DOSAGGIO*.
12. Subito dopo la procedura di lavaggio, dispensare 100 µL della Soluzione di Substrato in ciascun pozzetto, compresi i pozzetti del bianco.
13. Incubare le strisce a 18°C a 28°C per 15 (± 1) minuti.
14. Aggiungere 100 µL di Soluzione Bloccante — Stop Solution — a ciascun pozzetto per fermare la reazione enzimatica. La Soluzione Bloccante viene aggiunta ai pozzetti nello stesso ordine e alla stessa velocità della Soluzione di Substrato. Battere delicatamente la piastra per disperdere lo sviluppo del colore in modo uniforme. **NOTA: Risultati ottimali si possono ottenere usando (se disponibile) la funzione auto-mix del lettore di micropiastra appena prima della lettura della stessa.**
15. Effettuare le letture di assorbanza a 450 nm (valore A_{450}) per ciascun pozzetto entro 60 minuti dall'aggiunta della Soluzione Bloccante (passaggio 14), facendo la necessaria conta del bianco.
16. Determinare la concentrazione dei campioni e dei Controlli dalla Curva Standard.
17. Smaltire i campioni diluiti rimasti ed i controlli e le strisce usate per il dosaggio (vedi *LIMITI E PRECAUZIONI*).

CONTROLLO DI QUALITA'

La buona pratica di laboratorio consiglia di utilizzare i controlli per assicurare che si stia eseguendo il dosaggio correttamente. Ogni kit contiene C5a Campioni di Controllo Alto e Basso che possono essere

utilizzati a questo scopo. Gli intervalli di riferimento dei Controlli sono forniti. I valori del Controllo servono a verificare la validità della curva e dei risultati del campione. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri parametri per i limiti di accettabilità per il dosaggio. Se i valori di controllo NON rientrano nei limiti di accettabilità del vostro laboratorio, i risultati del test devono essere considerati discutibili, ed i campioni devono essere ri-dosati. Inoltre, il foglietto illustrativo richiede che la curva standard generata con gli Standard del kit soddisfi pienamente i requisiti di convalida. Se il test non soddisfa questi requisiti, ripetere il test, o contattare il Servizio Prodotti Quidel.

Il Certificato di Analisi compreso nel kit è lotto-specifico e deve essere usato per verificare che i risultati ottenuti in laboratorio siano simili a quelli ottenuti da Quidel Corporation.

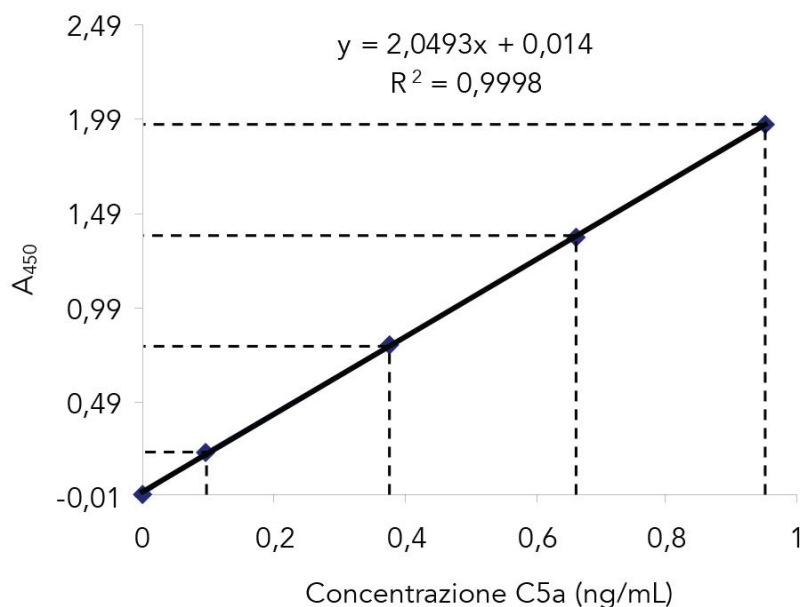
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolo dei Risultati

Uso della Curva Standard: La curva standard per il dosaggio EIA C5a viene generata usando i valori in A_{450} (sottratti del valore del bianco) di ciascuno standard (sull'asse y) e i valori di concentrazione assegnati per ciascuno standard (sull'asse x). La curva standard deve rispettare i requisiti di convalida. Questi calcoli possono essere eseguiti dalla maggior parte dei computer.

Nella Figura 1 è riportato un esempio di una tipica Curva Standard.

Figura 1
Esempio di Curva Standard



Campione	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
$r = 0,9998$	$m = 2,0493$	$b = 0,014$

Calcolo delle Concentrazioni Reali di C5a nei campioni

La concentrazione assegnata riportata sui flaconi degli standard e dei controlli sono unità assolute del complesso C5a. La concentrazione di C5a in un campione è determinata moltiplicando la concentrazione

determinata per l'opportuno fattore diluizione del campione. Per esempio, se un campione di plasma-EDTA viene diluito 1:20 per il test, e la curva di regressione lineare produce una concentrazione di 0,5 ng C5a/mL, allora la concentrazione di C5a nel campione sarà 10 ng C5a/mL (o 20 x 0,5).

Al fine di ottenere determinazioni accurate della concentrazione di C5a per i campioni che hanno valori di A_{450} superiore a quello dello Standard E C5a (o che hanno valori di A_{450} inferiori al LLOQ), i campioni devono essere nuovamente dosati con una diluizione diversa, in modo che il loro nuovo valore di A_{450} siano entro questi limiti. In questo caso anche Standard e Controlli devono essere ri-dosati.

Validazione

Determinare pendenza, intercetta, e coefficiente di correlazione della linea per gli Standard C5a A, B, C, D, E. I valori devono rientrare nell'intervallo specificato affinché il dosaggio sia validato:

coefficiente di correlazione (r):	> 0.98
pendenza (m):	1.14-2.50
intercetta - y (b):	(-)0.0145 a (+)0.0532

Fare riferimento alle etichette dei flacon per i range di concentrazione di C5a per i controlli basso e alto.

LIMITI

Il saggio immunoenzimatico MicroVue C5a deve essere usato su campioni di siero o plasma EDTA o plasma citrato. Non sono stati provati altri anticoagulanti.

VALORI NORMALI

Siero e plasma EDTA di venti (20) donatori normali, apparentemente sani sono stati dosati con il saggio immunoenzimatico MicroVue C5a. Di seguito i risultati.

	n	Media (ng/ml)	Intervallo (ng/ml)
Plasma EDTA	20	20,65	0,37 a 74,33
Siero	20	50,09	13,37 a 179,23

NOTA: Le concentrazioni di C5a determinate per siero e plasma EDTA possono variare tra laboratori; pertanto, si raccomanda che ciascun laboratorio stabilisca un proprio intervallo. I valori indicate nella tabella di cui sopra sono linee guida.

PRESTAZIONI DEL DOSAGGIO

Limiti

LOD: Il limite di rilevazione (LOD) per il dosaggio C5a è 0,01 ng/mL, determinato dal limite superiore 3SD in uno studio sullo zero standard.

LLOQ: Il limite di determinazione quantitativa più basso (LLOQ) per il dosaggio C5a è 0,050 ng/mL, la più bassa concentrazione sulla curva standard che rispetta i criteri NCCLS di accuratezza e precisione.

Sostanze Interferenti

Le sostanze elencate di seguito sono state dosate nel test C5a e non interferiscono con il dosaggio per concentrazioni fino a:

Sostanza	Concentrazione
Bilirubina	40 mg/dL
Emoglobina	500 mg/dL
Trigliceridi	3000 mg/dL

Sostanza	Concentrazione
Sodio Eparina	14 U/mL
C5 Proteina	80 mg/L
Glucosio	1200 mg/dL
Colesterolo	500 mg/dL

I campioni puliti con concentrazioni di Albumina >118,6 mg/dL o di Gamma Globuline > 8,9 mg/dL hanno dimostrato di interferire con la rilevazione del dosaggio e i campioni devono quindi essere ulteriormente diluiti.

Precisione

La precisione intra-dosaggio e inter-dosaggio è stata calcolata dosando 20 replicati di 2 campioni di plasma e 2 campioni di siero in 10 sedute diverse.

Campione	C5a (ng/mL)	Intra-dosaggio ¹ C.V. (%)	Inter-dosaggio ² C.V. (%)
Plasma EDTA	12.34	3.8	9.9
	1.41	3.9	13.0
Siero	30.13	3.6	7.1
	21.92	3.5	7.8

¹n = 20 replicati ²n = 10 sedute

Linearità

la linearità è stata valutata diluendo serialmente i campioni con il diluente e confrontando i valori osservati con quelli attesi.

Campione	Fattore Diluizione	C5a Osservato (ng/mL) ³	C5a Atteso (ng/mL) ³	Recupero (%)
Plasma EDTA	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
Serum	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

³Non incluso il fattore di diluizione

CONTATTI

Per assistenza tecnica, il Servizio Prodotti del Distributore. Informazioni ulteriori su Quidel e sui prodotti Quidel e sui distributori si trovano sul sito www.quidel.com.

BIBLIOGRAFIA

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.

REF A025 – MicroVue C5a 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

PIA025001IT00 (02/17)

GLOSSARIO

REF

Numero di catalogo



Marcio CE di conformità

EC REP

Rappresentante autorizzato
nella Comunità Europea

LOT

Codice lotto



Data di scadenza



Produttore



Limitazione di temperatura



Uso previsto



Leggere le istruzioni e di
etichettatura per l'uso

IVD

Per uso diagnostico *In Vitro*



Contenuto sufficiente per 96 determinazioni

CONT

Contenuto / Contiene

CONTROL

Controllo
