

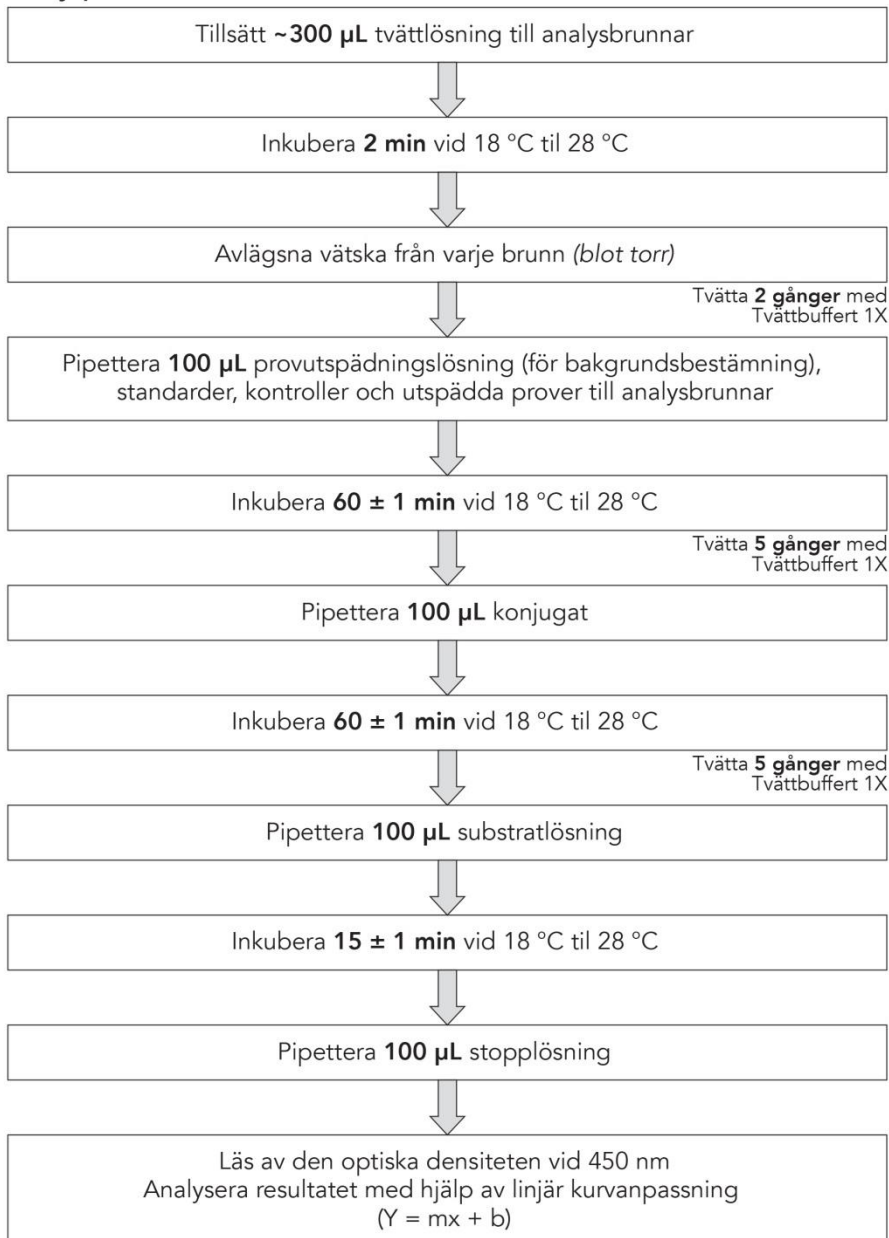
MicroVue C5a enzymimmunanalys mäter mängden C5a i humant serum

SAMMANDRAG

Reagens och provförberedelse

- Späd tvättlösningkoncentrat 1:20 med destillerat vatten
- Späd serumprover 1:50 med komplementprovutspädning (t ex 10 µL + 490 µL).
- Späd plasmaprover 1:20 med komplementprovutspädning (t ex 20 µL + 380 µL).

Analysprocedur





AVSEDD ANVÄNDNING

MicroVue C5a enzymimmunanalys mäter mängden C5a i humant serum eller human plasma.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

MicroVue C5a enzymimmunanalys är en "direct-capture" immunanalys med 96 brunnar, för mätning av C5a i humant serum eller human plasma.

Under normala betingelser resulterar aktivering av de klassiska, alternativa eller lektinkomplementvägarna i bildandet av ett multimolekylärt C5-konvertasenzym som är kapabelt att klyva C5 i C5a och C5b.^{1,2} C5b är en nyckelbeståndsdel av terminalkomplementkomplexet och har en mängd olika funktioner i denna roll. C5a är ett proteinfragment med låg molekylärvikt (ca 9kD) som består av 74 aminosyror.³ C5a metaboliseras snabbt av serumenzymet karboxypeptidas till en mer stabil, mindre aktiv form, bestående av 73 aminosyror, C5a des-Arg.^{2,3} För bekvämlighets skull kommer båda dessa former att hänföras till som "C5a" i denna dokumentation.

MicroVue-C5a-analysen, som tillhandahåller en snabb, mycket specifik och kvantitativ procedur för mätning av C5a-nivåer, är konstruerad för undersökningar av rollen eller statusen hos terminalkomplementvägsaktivering i ett stort antal forskningsmiljöer och för observering av genereringen av C5a *in vivo* eller *in vitro*.⁴ Som den mest potenta av komplementanafylatoxinerna, har C5a en mängd biologiska funktioner² som inkluderar mastcells- degranulering, kemotaxi, leukocytsekvistrering och cellaktivering via bindning till C5a-receptor² (C5aR eller CD88). Forskning har associerat förhöjda nivåer av C5a i flytande och adsorberad form med hemo-inkompatibilitet mellan några biomaterial, särskilt i utomkroppsliga omlopp.⁵⁻⁹ Forskning har också associerat C5a-nivåer med patogenes vid en mängd sjukdomstillstånd, såväl hjärtinfarkt¹⁰⁻¹⁴ och stroke^{15,16} som vaskulärt läckagesyndrom och påföljande njurskada¹⁷⁻¹⁹. C5a:s roll i patogenesen vid malaria²⁰ och andra infektiösa sjukdomar, såväl som blodförgiftning,²¹⁻²⁴ är likaledes väldokumenterad.

PRINCIP FÖR TILLVÄGAGÅNGSSÄTTET

MicroVue-C5a-enzymimmunanalys är en trestegsprocedur, där man använder sig av (1) en mikroanalysplatta som är ytbelagd med monoklonal mus-antikropp, specifik för en neo-epitop på humant C5a, (2) en med HRP-konjugat försedd monoklonal mus-antikropp till C5a-delen av C5 samt (3) ett kromogent substrat.

I det första steget tillsätts standarder, kontroller och utspädda testprover till brunnar som är ytbelagda med en monoklonal mus-antikropp mot C5a. Den monoklonala antikroppen binder till C5a i standarderna, kontrollerna eller proverna. Efter en inkubationstid tar en tvättcykel bort allt obundet material.

I steg två tillsätts pepparrotsperoxidase(horeseradish peroxidase)(HRP)konjugerad murin anti-C5(C5a) till varje analysbrunn. Det enzymkonjugerade anti-C5(C5a) binder till det fixerade C5a, som fästs in i steg ett. Efter en inkuberingsperiod avlägsnar en tvättcykel allt obundet konjugat.

I steg tre tillsätts 3,3',5,5' tetrametylbensidin (TMB), en användningsklar, kromogenisk substratlösning, till analysbrunnarna. Det bundna HRP:t reagerar med substratet, vilket ger en blå färg. Efter en inkuberingsperiod stoppas reaktionen kemiskt, något som resulterar i en färgväxling från blått till gult, vilket bekräftar att reaktionen har ägt rum. Färgintensiteten mäts spektrofotometriskt vid A₄₅₀. Färgintensiteten hos reaktionsblandningen är proportionell till koncentrationen av befintligt C5a i de utspädda testproverna, standarderna och kontrollerna. Resultaten beräknas från den framtagna standardkurvan med användning av linjär regressionsanalys.

INGÅENDE REAGENSER OCH MATERIAL

96 analyser för C5a-komplex

MicroVue C5a EIA-kitet innehåller följande:

A C5a-standarder	Art. 5131 – 5135	1 av vardera, 1,5 mL
B Användningsklar. Innehåller humanserum med proteinstabilisatorer med bestämd C5a-koncentration (ng/mL)		
C		
D		
E		
L Låg kontroll	Art. 5136	1,5 mL
Användningsklar. Innehåller humanserum med proteinstabilisatorer med bestämd C5a-koncentration (ng/mL)		
H Hög kontroll	Art. 5137	1,5 mL
Användningsklar. Innehåller humanserum med proteinstabilisatorer med bestämd C5a-koncentration (ng/mL)		
1 Ytbehandlade remsor	Art. 5129	12 av vardera
Åttabrunnsremsor, som är ytbehandlade med en monoklonal antikropp från mus, i en återförslutningsbar foliepåse		
2 Stopplösning	Art. A9947	12 mL
Innehåller 1N (4%) saltsyra		
3 20X tvättlösningsskoncentrat	Art. A9957	2 av vardera, 50 mL
Innehåller fosfatbuffrad saltlösning (PBS), 1,0% Tween-20® och 0,035% Proclin® 300		
4 Komplementprovspädningsvätska	Art. A3670	50 mL
Innehåller PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% proteinstabilisatorer, 0,035% Proclin 300		
5 TMB-substrat	Art. 5059	12 mL
Användningsklar. Innehåller 3,3',5,5'-tetrametylbensidin (TMB)		
6 Konjugat	Art. 5130	12 mL
Innehåller pepparrotsperoxidaskonjugerad, monoklonal antikropp från mus mot C5a		

Tween-20® är ett registrerat varumärke som ägs av ICI Americas Inc.

ProClin® är ett registrerat varumärke som ägs av Rohm and Haas Company.

ERFORDERLIGA MEN EJ MEDFÖLJANDE MATERIAL

- Timer (60-minuters)
- Miniräknare eller annan databaserad metod för utvärdering av analysen
- Rena, oanvända mikroanalysplattor och/eller provrör och ställ
- Mätbehållare för utspädd tvättbuffert
- Tvättflaska eller annat tvättsystem för immunanalys
- Justerbar multikanalpipett (8 eller 12 kanaler) eller repetermikropipetter (valfritt)
- Rena pipetter, 1 mL, 5 mL och 10 mL
- Mikropipetter och sterila engångspipettspetsar
- Plattavläsare som kan läsa av en A₄₅₀-optisk densitet på mellan 0,0 och 3,0
- Avjonat eller destillerat vatten

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- För *in vitro*-diagnostisk användning.
- Ej för försäljning eller användning i USA eller Kanada.
- Behandla proverna som potentiellt riskavfallsmaterial.
- Följ allmänna försiktighetsåtgärder vid hantering av innehållet i detta kit och eventuella patientprover.

- Använd de tillhandahållna reagenserna som en sammanhängande enhet före det utgångsdatum som finns angivet på förpackningsetiketten.
- Lagra analysreagenserna enligt föreskrift.
- Använd inte de ytbehandlade remsorna, om det har gått hål på påsen.
- ProClin 300 används som ett konserveringsmedel. Tillfällig kontakt med eller förtäring av buffertar eller reagenser som innehåller ProClin kan orsaka irritation på huden, i ögonen eller munnen. Använd god laboratoriepraxis för att reducera exponering. Sök medicinsk vård vid eventuella symptom.
- Stopplösningen anses vara frätande och kan orsaka irritation. Får ej förtäras. Undvik kontakt med ögon, hud och kläder. Vid ev kontakt, skölj omedelbart det drabbade området med vatten. Vid ev förtäring, tillkalla läkare.
- Varje donerad enhet som använts vid framställningen av standarder och kontrollserum i denna produkt har testats med en FDA-godkänd metod beträffande befintlighet av antikropp riktad mot humant immunbristvirus (HIV1 och HIV2) och mot hepatit C-virus, såväl som beträffande hepatit B-ytantigen. Eftersom ingen testmetod kan erbjuda en fullständig försäkran om att infektiösa ämnen inte finns, bör dessa reagenser hanteras på biosäkerhetsnivå 2, såsom rekommenderas för eventuellt potentiellt infektiöst humanserum eller –blodprov i manualen "Biosäkerhet på mikrobiologiska och biomedicinska laboratorier" ("Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories"), 2007, av "Centers for Disease Control/National Institutes of Health" (USA).⁽²⁵⁾
- Användning av multikanalspipetter eller repeterpipetter rekommenderas för försäkran om tillsättning av reagens på utsatt tid.
- För exakt mätning av prover, tillsätt prover och standarder i exakt mängd. Pipettera noggrant och använd endast kalibrerad utrustning.
- Korrekt insamling och lagring av prover är väsentlig för noggranna resultat (se *HANTERING OCH FÖRBEREDANDE AV PROVER*).
- Undvik mikrobiell eller korskontaminering av prover eller reagenser.
- Testa varje prov i duplikat.
- Använd inte samma mikroanalysbrunn för mer än ett test.
- Användning av andra inkuberingstider och -temperaturer än de som föreskrivits i Procedur-avsnittet kan ge felaktiga resultat.
- TMB-substratet måste skyddas mot ljus under lagring och inkubation. Undvik kontakt med ögon, hud och kläder. Om kontakt sker, skölj omedelbart det drabbade området med vatten.
- Låt inte mikroanalysbrunnarna torka ut när analysen väl har börjat.
- Vid avlägsnande av vätska från mikroanalysbrunnarna, skrapa inte i eller vidrör botten på brunnarna.
- Värmeinaktiverade, hyperlipemiska eller kontaminerade prover kan ge felaktiga resultat.
- För undvikande av aerosolbildning vid tvättning kan man använda en apparat för att suga ut tvättvätskan i en flaska som innehåller hushållsblekningsmedel.
- En tvättflaska eller automatisk påfyllningsanordning ska användas för att tvätta plattan (*ANALYSPROCEDUR*, steg 8). För bästa resultat, använd inte en multikanalspipett för tvättningen av mikroanalysplattan.
- Testning ska utföras i utrymmen med tillräcklig ventilation.
- Kassera behållare och oanvänt innehåll i enligt gällande nationella och lokala reglerings föreskrifter.
- Använd lämpliga skyddskläder, -handskar och -glasögon/ansiktsskydd vid hantering av kitets innehåll.
- 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.

LAGRING

Lagra öppnat kit vid 2 °C til 8 °C. Värm upp reagenser och material, som valts ut för användning, till 18 °C til 28 °C före användning. Lägg alla oanvända mikroanalysremсор i lagringspåsen, återförslut påsen och lagra vid 2 °C til 8 °C.

INDIKATIONER PÅ INSTABILITET ELLER FÖRSÄMRING PÅ REAGENSER

Grumlighet i eller missfärgning av den utspädda tvättlösningen indikerar försämring på denna reagens. Om detta inträffar, ska lösningen kasseras.

HANTERING OCH FÖRBEREDANDE AV PROVER

Hantera och kasta alla prover med användande av allmänna försiktighetsåtgärder.

Allt provhanteringsarbete ska utföras vid 2 °C till 8 °C.

Insamling av prover

Korrekt insamling, behandling och lagring av prover är viktig, eftersom C5a kan bildas i felaktigt hanterade prover genom artefaktuell komplementaktivering.

Värden för normala serumprover är normalt högre än de som erhålls med EDTA-plasmaprover eller citrerade, normala plasmaprover. C5a-nivåerna i EDTA- eller citrerad plasma kan därför mer exakt representera *in vivo*-koncentrationerna.²⁶

Serum-, EDTA-, eller citrerade plasmaprover ska samlas in aseptiskt genom användning av standardtekniker.²⁷ Proverna ska antingen testas omedelbart eller lagras vid 4 °C eller på is i högst fyra timmar, innan de analyseras.

Om provet inte kan testas inom fyra timmar enligt de riktlinjer som är specificerade ovan, ska provet frysas vid -70 °C eller lägre.

En **Provstabiliseringslösning** (Artikelnr A9576) kan också användas för att bereda humana serum- och plasmaprover för lagring. Korrekt användning av denna produkt, som endast kan erhållas från Quidel, kräver att provet blandas 1:1 med lösningen före infrysning. Ytterligare teknisk information om lösningen kan erhållas på begäran.

Upptining av frysta prover

Tina frysta prover snabbt i 37 °C tills de är precis upptinade. Lägg omedelbart över upptinade prover på is (i högst åtta timmar) för att förhindra komplementaktivering före utspädningen. **Låt inte** proverna ligga kvar i en temperatur på 37 °C, eftersom detta kan leda till komplementaktivering. Tina inte prover i rumstemperatur eller på is, eftersom detta kan leda till C5-aktivering och påverka resultaten. Proverna ska testas så snart som möjligt efter upptining. Upp till 3 infrysnings-/upptiningscykler kan göras utan att proverna påverkas. Om prover måste frysas om för ytterligare analys, föreslår Quidel att man fryser in multipla aliquoter av proverna för att undvika fler infrysnings-/upptiningscykler.

Spädning av prover

WARNING: Behandla alla prover som potentiellt riskavfall. Använd allmänna försiktighetsåtgärder. Använd inte värmeinaktiverade, kontaminerade eller felaktigt lagrade prover.

OBS: Se HANTERING OCH FÖRBEREDANDE AV PROVER beträffande viktiga anmärkningar om de rätta metoderna för att tina frysta prover. Rätt hantering av prov är viktig för riktiga resultat.

Quidel föreslår att normala plasmaprover späds 1:20 i den tillhandahållna provutspädningen; serumprover ska spädas 1:50. En 1:200-spädning, eller högre, kan krävas för ett prov med höga nivåer av C5a. Proverna **måste** spädas så att de A_{450} -värden som observeras är över LLOQ och inte överstiger A_{450} -värdet för C5a-standard E. Proverna med A_{450} -avläsningar utanför detta intervall ska analyseras om vid en ny spädning.

Betstäm antalet (N) prover som ska testas. Märk teströren #1 till #N och registrera vilka prover som motsvarar vilka rör. Gör iordning en lämplig spädning (se föregående stycke) av varje prov med användning av provutspädningen. Blanda noggrant men undvik skum- och bubbelbildning. Lagra inte eller återanvänd utspädda prover.

Tillsättning av utspädda prover till mikrotiterbrunnarna

Tillsättningen av utspädda prover till mikrotiterbrunnarna måste fullgöras inom 15 minuter från appliceringen av det första provet. Vilken som av två metoder kan användas för att tillsätta utspädda prover, standarder, kontroller och buffertar till brunnarna (se steg 6 i *ANALYSPROCEDUR*). Vid små analysomgångar, där endast några få prover testas, kan de utspädda proverna och andra reagenser tillsättas direkt till sina inmärkta brunnar med en mikropipett (100 µL/brunn). Vid små eller stora omgångar, men i synnerhet vid större omgångar, rekommenderar vi användande av en multikanalspipett för tillsättning av prover enligt följande.

För att fylla i standarder, kontroller och utspädda prover i mikroanalysbrunnarna så snabbt som möjligt kan man använda sig av en "replica plating"-procedur. Istället för att man tillsätter 100 µL av var och en av standarderna, kontrollerna eller de utspädda proverna var för sig till de antikroppsinklädda brunnarna, kan 120-130 µL av varje lösning tillsättas till individuella brunnar på en bakgrunds- platta (ingår ej) som motsvarar det slutliga, efterfrågade EIA- mönstret. Efter att alla lösningar som ska testas har tillsatts till mikroanalysbrunnarna på bakgrundsplattan, ska 100 µL från varje brunn för bakgrundsbestämning snabbt föras över till de antikroppsinklädda brunnarna med användande av en multikanalsmikropipett. För att undvika eventuell korskontaminering måste pipettspetsarna bytas för varje gång man ändrar sammansättning hos de prover som ska överföras.

"Replica plating"-proceduren kan även användas för att smidigt tillsätta konjugatet, substratet och stopplösningen.

FÖRBEREDNING AV REAGENS

Se till att alla reagenser och material håller 18 °C til 28 °C före användning.

Lägg, efter borttagande av de reagenser och material som behövs, tillbaka de oanvända ingredienserna i sin rätta lagringstemperatur (se *LAGRING*).

1. Standarder och kontroller

Standarder och kontroller kräver ingen utspädning eller beredning före användning.

2. Tvättlösning

Blanda 20X-tvättlösningskoncentratet genom att vända upp och ner på flaskan ett flertal gånger. Om 20X-tvättlösningskoncentratet har lagrats vid 2 °C til 8 °C, kan kristaller ha bildats. För att lösa upp kristallerna, värm upp flaskan i ett 37 °C til 50 °C-vattenbad tills alla kristaller har lösts upp och blanda därefter noggrant. Bered tvättlösningen genom att späda hela innehållet från en av flaskorna med 20X-tvättlösningskoncentrat med upp till en liter destillerat eller avjonat vatten. Blanda noggrant. Tvättlösningen håller sig i 30 dagar, om den lagras i en ren behållare vid 2 °C til 8 °C. Om missfärgning eller grumlighet uppstår, kassera reagensen.

3. Urval av mikroanalysremсор

Bestäm antalet brunnar som behövs för analysen. Det rekommenderas att brunnarna för bakgrundsbestämning, kontrollerna och standarderna testas i duplikat. Ta bort de remсор som inte behövs och lägg dem i lagringspåsen, återförslut påsen och lägg tillbaka den för lagring vid 2 °C til 8 °C. Fäst de remсор som ska användas i analysen i analysplattans ram.

ANALYSPROCEDUR

Läs hela produktbladet innan analysen påbörjas.

Se FÖRBEREDANDE AV REAGENS OCH VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER.

1. Registrera mikroanalysbrunnarnas positioner i förhållande till brunnen/-arna för bakgrundsbestämning, alla testprover, standarder och kontroller, såväl som de angivna serienummerna från etiketterna på vialerna. Sätt en etikett på ett hörn av mikroanalysplattan för orienteringens skull.
2. Förbered mikroanalysremsorna på följande sätt:
 - a. Rehydrera mikroanalysbrunnarna genom att tillsätta ca 300 µL tvättlösning till varje brunn med användande av en tvättflaska eller en automatisk påfyllningsanordning.
 - b. Inkubera vid 18 °C till 28 °C i två minuter.
 - c. Avlägsna vätskan från varje brunn.
 - d. Tillsätt ca 300 µL tvättlösning till varje brunn.
 - e. Avlägsna vätskan från varje brunn.
 - f. Upprepa steg d-e en gång till, totalt tre tvättningar.**
 - g. Vänd upp och ner på plattan och knacka den två gånger hårt mot ett absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska.
3. Välj ut en eller två brunnar för bakgrundsbestämning. Tillsätt 100 µL provspädning till brunnen/-arna som ska användas för bakgrundsbestämning i plattläsaren.
4. Tillsätt 100 µL av varje C5a-standard (A, B, C, D, E) till duplikatbrunnarna. **OBS: standarderna är klara för användning och behöver ingen utspädning.**
5. Tillsätt 100 µL av både C5a låg kontroll och C5a hög kontroll till duplikatbrunnarna. **OBS: Kontrollerna är klara för användning och behöver ingen utspädning.**
6. Tillsätt 100 µL av varje utspätt prov till dess inmärkte mikroanalysbrunn. (Se SPÄDNING AV PROVER).
7. Inkubera vid 18 °C till 28 °C i 60 ± 1 minuter.
8. Tvätta mikroanalysbrunnarna på följande sätt:
 - a. Avlägsna vätskan från varje brunn efter inkubationen i steg 7 (eller i steg 10 nedan).
 - b. Tillsätt ca 300 µL tvättlösning till varje brunn med användande av en tvättflaska eller en automatisk påfyllningsanordning.
 - c. Avlägsna vätskan från varje brunn.
 - d. Upprepa steg b-c ytterligare fyra gånger.**
 - e. Efter den femte tvättcykeln, vänd upp och ner på plattan och knacka den två gånger hårt mot ett absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska.
9. Använd en multikanals- eller repeterpipett för att tillsätta 100 µL C5a-konjugat till varje tvättad testbrunn inklusive brunnen/-arna för bakgrundsbestämning.
10. Inkubera mikroanalysremsorna vid 18 °C till 28 °C i 60 ± 1 minuter.
11. Tvätta mikroanalysbrunnarna efter 60-minuters-inkuberingen (steg 10), enligt beskrivning under ANALYSPROCEDUR, steg 8.
12. Omedelbart efter tvättproceduren ska 100 µL substratlösning tillsättas till varje brunn inklusive brunnen/-arna för bakgrundsbestämning.
13. Inkubera mikroanalysremsorna vid 18 °C till 28 °C i 15 (± 1) minuter.
14. Tillsätt 100 µL stopplösning till varje brunn för att stoppa den enzymatiska reaktionen. Stopplösningen ska tillsättas till brunnarna i samma ordning och i samma takt som substratlösningen har gjorts. Knacka försiktigt på plattan för att sprida färgutvecklingen jämnt. **OBS: Optimala resultat kan uppnås genom användning av plattläsarens auto-mix-funktion (om tillgänglig) precis före avläsning av plattan .**
15. Bestäm absorberingsavläsningen vid 450 nm (A_{450} - värde) för varje testbrunn inom 60 minuter efter tillsättandet av stopplösningen (steg 14) genom att göra den nödvändiga bakgrundskorrigeringen.
16. Bestäm koncentrationen av prover och kontroller med hjälp av standardkurvan.
17. Kasta de återstående utspädda proverna och kontrollerna samt de använda mikroanalysremsorna (se VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER).

KVALITETSKONTROLL

God laboratoriepraxis rekommenderar användande av kontroller för att säkerställa att analysen sker på ett riktigt sätt. Varje C5a-kit innehåller höga och låga kontroller som kan användas för detta ändamål. Kontrollnivåerna tillhandahålls. Kontrollvärdena är avsedda att verifiera kurvans och provresultatens validitet. Varje laboratorium bör etablera sina egna parametrar för acceptabla analysgränser. Om kontrollvärdena INTE är inom ert laboratoriums acceptansgränser, bör analysresultaten anses diskutabla och provtagningarna bör upprepas. Dessutom kräver produktbladet att standardkurvan som tagits fram med kit-standarderna uppfyller stringenta valideringskrav. Om analysen inte uppfyller dessa krav, upprepa analysen eller kontakta Quidel Technical Service.

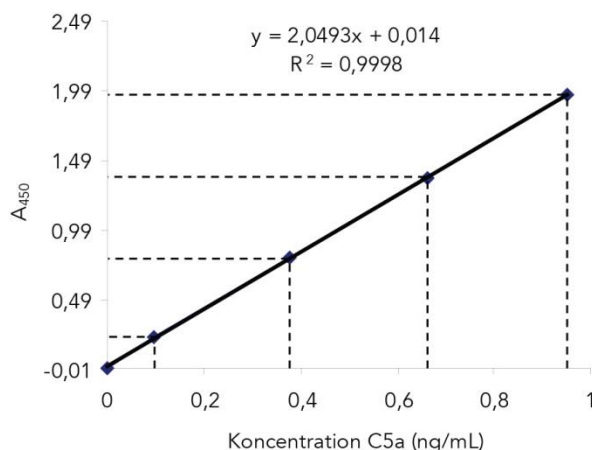
Analyscertifikatet som finns med i detta kit är serienummerspecifikt och ska användas för att verifiera att resultaten som erhållits av ert laboratorium är liknande dem som erhållits på Quidel Corporation.

TOLKNING AV RESULTAT

Beräkning av resultat

Användning av standardkurvan: Standardkurvan för C5a EIA har tagits fram genom att man använt de frändragna A_{450} -bakgrundsvärdena för varje standard (på y-axeln) och den anvisade koncentrationen för varje standard (på x-axeln). Standardkurvan måste uppfylla valideringskraven. De flesta datorer och miniräknare klarar av att utföra dessa beräkningar. Exempel på en typisk standardkurva visas i Figur 1.

Figur 1
Representativ standardkurva



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

Beräkning av faktisk C5a-koncentration i prover

Den anvisade koncentrationen på standardvialerna och kontrollvialerna utgör absoluta enheter av C5a-komplex. Koncentrationen av C5a i ett prov fastställs genom multiplicering av den bestämda koncentrationen med den lämpliga provutspädningsfaktorn. Till exempel, om ett EDTA-plasmaprov späds ut 1:20 för analysen och den linjära regressionskurvan ger en koncentration på 0,5 ng C5a/mL, då är koncentrationen av C5a i provet 10 ng C5a/mL (eller $20 \times 0,5$).

För att erhålla rätt bestämningar av C5a-koncentration för testprover som ger A_{450} -värden som är större än C5a standard E-värdet (eller som ger värden som är mindre än LLOQ), ska proverna omanalyseras med en annorlunda utspädning, så att deras nya A_{450} -värden kommer att vara inom dessa gränser. I alla upprepade analyser måste C5a-standarderna och kontrollerna också testas om.

Validering

Bestäm lutningen på samt interceptet och korrelationskoefficienten för den bäst anpassade erhållna linjen för C5a A-, B-, C-, D-, och E-standarderna. Värdena måste vara inom de specificerade intervallerna för att kvalificera analysen:

korrelationskoefficient (r):	> 0,98
lutning (m):	1,14-2,50
y-intercept (b):	(-)0,0145 til (+)0,0532

Hänvisa till vialetiketterna för det acceptabla C5a- koncentrationsintervallet för de låga och höga kontrollerna.

BEGRÄNSNINGAR

MicroVue C5a-enzymimmunanalysen har använts för att testa prover insamlade som serum eller plasma i EDTA och citrat. Andra antikoagulanter har inte testats.

OBSERVERADE VÄRDEN

EDTA-plasma och serum från tjugo (20) uppenbarligen normala, friska donatorer testades i MicroVue C5a enzymimmunanalys-kitet. Resultaten presenteras nedan.

	n	Medel (ng/mL)	Intervall (ng/mL)
EDTA-plasma	20	20,65	0,37 til 74,33
Serum	20	50,09	13,37 til 179,23

OBS: De C5a-koncentrationer som är bestämda för plasma- eller serumprover kan variera mellan laboratorier; därför rekommenderas att varje laboratorium bestämmer sitt eget intervall. De koncentrationer som tillhandahålls ovan ska endast betraktas som en riktlinje.

UTFÖRANDE AV TESTET

Gränser

LOD: Detektionsgränsen (The limit of detection)(LOD) för C5a-analysen är 0,01 ng/mL, bestämd av den övre 3SD-gränsen i en nollstandardstudie.

LLOQ: Den lägre gränsen för kvantifiering (The lower limit of quantitation) (LLOQ) för C5a-analysen är 0,050 ng/mL, något som är den lägsta koncentrationen på standardkurvan som uppfyller NCCLS:s kriterier för noggrannhet och precision.

Interfererande substanser

Följande substanser testades i C5a-analysen och befanns inte interferera med analysen:

Substans	Koncentration
Bilirubin	40 mg/dL
Hemoglobin	500 mg/dL
Triglycerider	3000 mg/dL
Na + heparin	14 U/mL
C5-protein	80 mg/L
Glukos	1200 mg/dL
Kolesterol	500 mg/dL

Ospädda prover med albuminkoncentrationer > 118,6 mg/mL eller gammaglobulin > 8,9 mg/dL har visats interferera med kvantifieringen i analysen och måste spädas.

Precision

Intra- och interkörningsprecision bestämdes genom analys av 20 replikat av 2 plasmaprover och 2 serumprover i 10 olika körningar.

Prov	C5a (ng/mL)	Intrakörning ¹ C.V. (%)	Interkörning ² C.V. (%)
EDTA-plasma	12,34	3,8	9,9
	1,41	3,9	13,0
Serum	30,13	3,6	7,1
	21,92	3,5	7,8

¹n = 20 replikat ²n = 10 körningar

Linjäritet

Linjäritet utfördes genom seriespädning av prover med provutspädning och genom att jämföra observerade värden med förväntade värden.

Prov	Utspädningsfaktor	Observerat C5a (ng/mL) ³	Förväntat C5a (ng/mL) ³	Utbyte (%)
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%
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%

³Utspädningsfaktor ej inkluderad

SUPPORT

För tjänster utanför USA, vänligen kontakta er lokala distributör. Ytterligare information om Quidel och Quidels produkter och distributörer kan erhållas på vår hemsida på www.quidel.com.

REFERENSER

1. Tack, Brian F., Sam C. Morris, and James W. Prah. "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

PIA025001SV00 (02/17)

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
