

**Essai immunoenzymatique portant sur la quantification du fragment C3a de la protéine de complément C3 dans le sérum ou plasma humain.**

## RÉSUMÉ

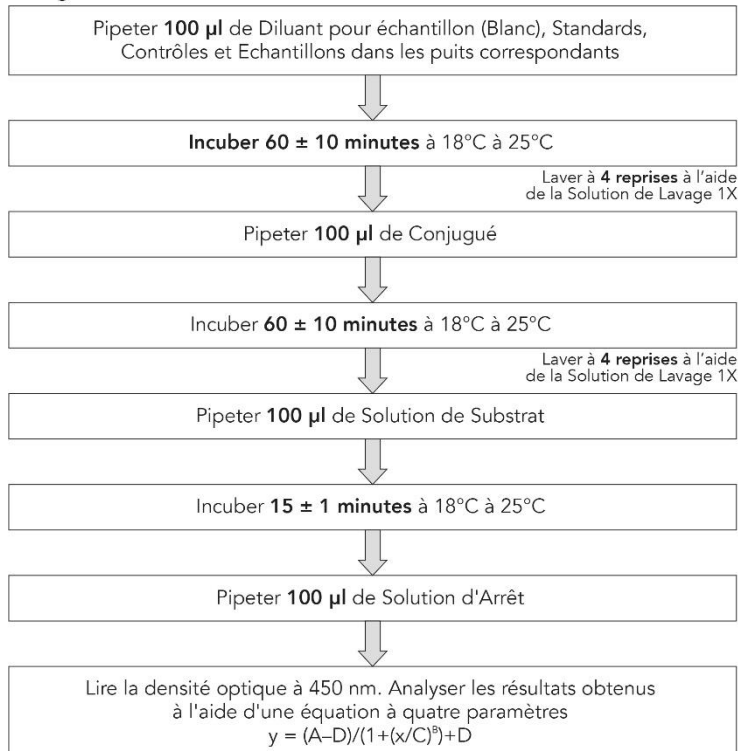
### Préparation des Réactifs

- Diluer la Solution concentrée de Lavage 1:20 à l'aide d'eau distillée.

### Préparation des Échantillons (Plasma – 1:200; Serum – 1:5000)

- Déposer à la pipette du diluant d'échantillon pour la dilution 1 dans des tubes ou des plaques séparées:  
**90 µl pour chaque échantillon de plasma (pour la dilution du plasma 1)**  
**490 µl pour chaque échantillon de sérum (pour la dilution du sérum 1)**
- Déposer à la pipette du diluant d'échantillon pour la dilution 2 dans des tubes ou des plaques séparées:  
**475 µl pour chaque échantillon de plasma (pour la dilution du plasma 2)**  
**495 µl pour chaque échantillon de sérum (pour la dilution du sérum 2)**
- Décongeler rapidement les échantillons en incubant à 37 °C jusqu'à ce qu'environ 90 % de l'échantillon soit décongelé. Poser immédiatement les échantillons sur de la glace.
- Mélanger doucement chaque échantillon.
- Ajouter **10 µl** de chaque échantillon de plasma ou de sérum au volume de diluant d'échantillon indiqué pour la dilution 1 et mélanger doucement.
- Transférer de la dilution des mélanges-1 à la dilution appropriée-2 mélange comme ça, et mélanger doucement.  
**25 µl d'échantillon de plasma dilué de la dilution 1 → 475 µl dilution du plasma 2**  
**5 µl d'échantillon de sérum dilué de la dilution 1 → 495 µl dilution du sérum 2**

### Dosage





## INTÉRÊT DU DOSAGE

L'essai immunoenzymatique MicroVue C3a Plus mesure la quantité de C3a dans le sérum ou le plasma humains.

## RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le dosage EIA MicroVue C3a Plus est un dosage direct sur microplaque à 96 puits, qui permet la mesure du C3a dans le sérum et le plasma humains, et dans d'autres échantillons biologiques ou expérimentaux.

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 C3 convertase capable de cliver le C3 en C3a et C3b.<sup>1</sup> Le C3a est un fragment protéique de faible poids moléculaire (environ 9kD) constitué par 77 acides aminés.<sup>2</sup> Le C3a est rapidement métabolisé par la carboxypeptidase N sérique en une forme plus stable, moins active, de 76 acides aminés, le C3a des-Arg.<sup>3</sup> Dans un souci de simplification, les 2 formes seront appelées "C3a" dans ce document.

Le dosage MicroVue C3a Plus, un mesurer de façon rapide, très spécifique et quantitative les taux de C3a, 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 C3a *in vivo* ou *in vitro*. C3a a été démontré que le C3a accroît la perméabilité vasculaire, qu'il est spasmogène et chimiotactique, et qu'il provoque la libération de médiateurs actifs du point de vue pharmacologique d'un certain nombre de types de cellule. Le rôle du C3a dans la pathogénèse des réactions inflammatoires constatées dans la septicémie bactérienne gram-négative, les traumatismes, les cardiopathies ischémiques, l'ischémie cérébrale, le syndrome post-dialyse et plusieurs maladies auto-immunes (notamment la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux et la glomérulonéphrite aiguë) est bien documenté.<sup>(4, 6-23)</sup>

## PRINCIPE DU DOSAGE

Le dosage ELISA MicroVue C3a Plus est un dosage en 3 étapes qui utilise (1) une microplaque coatée à l'aide d'un anticorps monoclonal murin spécifique d'un néo-épitope du C3a humain, (2) un anticorps polyclonal murin dirigé contre la région C3a du C3 conjugué à de l'HRP, et (3) un substrat chromogénique.

À l'étape 1, Standards, Contrôles et échantillons dilués sont ajoutés dans les puits recouverts d'un anticorps monoclonal murin anti-C3a. L'anticorps monoclonal fixe le C3a présent dans les Standards, Contrôles ou échantillons. Après incubation, un lavage permet d'éliminer ce qui n'a pas été lié.

À l'étape 2, l'anticorps anti-C3(C3a) conjugué à l'HRP est ajouté dans tous les puits. L'anti-C3(C3a) conjugué à l'enzyme se lie sur le C3a immobilisé, capturé lors de la première étape. Après incubation, un lavage permet d'éliminer le conjugué non lié.

À l'étape 3, 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 l'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 A<sub>450</sub>. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de C3a présent dans les Standards, les Contrôles, et les échantillons dilués. Les résultats sont calculés à partir de la courbe standard généré en utilisant 4-analyse des paramètres.

## RÉACTIFS ET MATÉRIELS FOURNIS

### 96 puits pour le dosage du complexe C3a

Le kit de dosage EIA MicroVue C3a Plus contient les éléments suivants:

<b>A Standards C3a Plus</b>	<b>Réf 5140 – 5145</b>	<b>1 flacon, 1,5 ml</b>
<b>B</b> Prêt à l'emploi. Contient une concentration connue en C3a (ng/ml) dans du sérum humain et des		
<b>C</b> stabilisants protéiques		
<b>D</b>		
<b>E</b>		
<b>L Contrôle Faible</b>	<b>Réf 5146</b>	<b>1,5 ml</b>
Prêt à l'emploi. Contient une concentration connue en C3a (ng/ml) dans du sérum humain et des		
stabilisants protéiques		
<b>N Contrôle Fort</b>	<b>Réf 5147</b>	<b>1,5 ml</b>
Prêt à l'emploi. Contient une concentration connue en C3a (ng/ml) dans du sérum humain et des		
stabilisants protéiques		
<b>① Barrettes de puits</b>	<b>Réf 5148</b>	<b>Je 12</b>
8 puits coatés par un anticorps monoclonal murin dans un sachet d'aluminium re-scellable		
<b>② Solution d'Arrêt</b>	<b>Réf A9947</b>	<b>12 ml</b>
Contient de l'Acide Chlorhydrique 1N (4%)		
<b>③ Solution de Lavage Concentrée 20X</b>	<b>Réf A9957</b>	<b>2 x 50 ml</b>
Contient du tampon phosphate (PBS), 1,0% Tween-20® et 0,035% Proclin® 300		
<b>④ Diluant pour échantillon</b>	<b>Réf 5150</b>	<b>50 ml</b>
Contient une base de protéine tamponnée avec 0,05% de ProClin 300		
<b>⑤ Substrat TMB</b>	<b>Réf 5059</b>	<b>12 ml</b>
Prêt à l'emploi. Contient du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		
<b>⑥ Conjugué</b>	<b>Réf 5151</b>	<b>12 ml</b>
Contient un conjugué de peroxydase de raifort et d'anticorps polyclonal anti-C3a		

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)
- 1 plaque de dilution de 96 puits (VWR REF: 47743-828) ou des tubes à essai et des supports de tests pour la dilution d'échantillons (facultatif)
- Plaques à usage unique pour la méthode de la double plaque
- Récipient gradué pour la dilution de la Solution de Lavage
- Bouteille de lavage ou tout autre équipement de lavage validé
- Micropipettes et les embouts de pipette jetables stériles
- Des réservoirs de réactifs pour ajouter le conjugué, le substrat et les solutions d'arrêt à la plaque (utiliser des réservoirs propres et non utilisés pour chaque réactif)
- Multipipette ajustable (8 ou 12 canaux) ou pipetteur automatique
- Lecteur de plaques pouvant lire des densités optiques A<sub>450</sub> comprises entre 0,0 et 3,0
- Eau désionisée ou distillée

## ATTENTION

- Pour utilisation *In vitro*.
- 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. Aucune méthode de test ne pouvant garantir totalement l'absence d'agents infectieux, ces réactifs doivent être manipulés selon le niveau 2 de sécurité biologique comme le recommande, pour tout prélèvement sérique ou sanguin humain potentiellement infectieux, le manuel des Centers for Disease Control/National Institutes of Health intitulé "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories".<sup>24</sup>
- 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 10). 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](http://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 25°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.

Éliminer le Diluant pour Échantillon si on observe l'apparition de trouble ou de décoloration. La couleur du Diluant d'Échantillon peut varier du rose au marron, ce qui est normal et n'est en aucun cas un signe de détérioration ou d'instabilité.

## 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 C3a peut être généré lors de manipulations inadéquates à travers une activation artificielle du complément. Pour obtenir des résultats optimaux sur le plasma, il est recommandé d'utiliser des tubes de prélèvement EDTA K2 (Fisher REF: 22-040-161).

Les valeurs obtenues pour des échantillons de sérums normaux seront plus élevées que celles que l'on obtient avec des échantillons de plasmas prélevés sur EDTA. On peut donc considérer que les taux de C3a obtenus sur plasmas EDTA sont plus représentatifs des taux observés *in vivo*.<sup>25</sup>

On prélèvera les échantillons de sérum ou de plasma EDTA de façon aseptique, selon les techniques standard.<sup>26</sup> Doser immédiatement les échantillons ou bien les conserver sur de la glace (2 heures maximum) jusqu'au dosage.

Si l'échantillon ne peut être testé dans les 2 heures comme décrit précédemment, on le congèlera à -70°C.

**Solution Stabilisante pour Échantillon** (Réf: No. A9576) peut également être utilisé 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

Afin de réduire au maximum la durée de manipulation des échantillons, préparer une plaque de dilution (ou des tubes) et ajouter le volume de diluant indiqué (comme décrit ci-dessous dans la section *Dilution de l'Échantillon*) avant de décongeler les échantillons pour l'évaluation.

Décongeler rapidement les échantillons congelés à 37°C. Placer immédiatement les échantillons tout juste décongelés sur de la glace avant de faire la dilution, afin d'empêcher l'activation du complément. **Ne pas laisser les échantillons sur la glace plus de deux heures. 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 C3, et modifier les résultats. Doser aussitôt que possible les échantillons après leur décongélation. Un seul cycle de congélation/décongélation peut être effectué sans affecter les échantillons. 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 *Congélation/Décongélation des Échantillons* pour savoir comment bien décongeler les échantillons. Une bonne manipulation des échantillons est essentielle pour obtenir des résultats fiables.

**REMARQUE CRITIQUE:** Afin d'éviter l'activation du complément et la production de C3a dans les échantillons qui en résulte, il est essentiel de prélever et de diluer correctement les échantillons.

Les échantillons **doivent** être dilués de telle sorte que les valeurs de  $A_{450}$  observées soient supérieures à la LIDQ et ne soient pas supérieures à la valeur de  $A_{450}$  de la LSDQ. Les échantillons dont les valeurs de  $A_{450}$  se trouvent en dehors de cette fourchette doivent être redosés avec une autre dilution.

Déterminer le nombre (N) d'échantillons à tester. Numéroté 2 séries de tubes à essai de 1 à N, et noter à quel spécimen correspond chaque tube. Préparer une dilution appropriée (voir la section suivante) de chacun des échantillons à l'aide du Diluant pour Échantillon. Bien mélanger doucement en évitant la formation de mousse ou de bulles. Ne pas conserver ou réutiliser les échantillons dilués.

## Méthode de dilution

Pour des résultats optimaux, effectuer à une dilution en deux étapes pour préparer chaque échantillon.

### *Plasma*

Diluer les échantillons de plasma au 1:200 dans le diluant d'échantillon fourni comme suit:

- Pour chaque dilution, déposer à la pipette 90  $\mu\text{L}$  de diluant d'échantillon pour la dilution 1 et 475  $\mu\text{L}$  pour la dilution 2 dans deux tubes ou plaques de dilution différents.
- Préparer la dilution 1 en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  de l'échantillon à analyser à 90  $\mu\text{L}$  de diluant d'échantillon (le tube ou la plaque pour la dilution de plasma 1). Mélanger doucement.
- Préparer la dilution 2 en ajoutant 25  $\mu\text{L}$  de la dilution 1 à 475  $\mu\text{L}$  de diluant d'échantillon (le tube ou la plaque pour la dilution de plasma 2). Mélanger doucement.

### *Sérum*

Diluer les échantillons de sérum au 1:5000 dans le diluant d'échantillon fourni comme suit:

- Pour chaque échantillon à analyser, déposer à la pipette 490  $\mu\text{L}$  de diluant d'échantillon pour la dilution 1 et 495  $\mu\text{L}$  pour la dilution 2 dans des tubes ou plaques de dilution différents.
- Préparer la dilution 1 en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  de l'échantillon à analyser à 490  $\mu\text{L}$  de diluant d'échantillon (le tube ou la plaque pour la dilution de sérum 1). Mélanger doucement.
- Préparer la dilution 2 en ajoutant 5  $\mu\text{L}$  de la dilution 1 à 495  $\mu\text{L}$  de diluant d'échantillon (le tube ou la plaque pour la dilution de sérum 2). Mélanger doucement.

## 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  $\mu\text{L}$ /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  $\mu\text{L}$  de chaque Standard, Contrôle ou échantillon dilué individuellement dans les puits recouverts d'anticorps, 120  $\mu\text{L}$  à 130  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 25°C avant usage.**

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

## Standards et Contrôles

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

## 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.

## 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. Étiqueter les plaques/tubes de dilution de manière à les faire correspondre à tous les échantillons à analyser.
3. Ajouter du diluant d'échantillon aux plaques/tubes de dilution. (Voir la section *Dilution des échantillons*).
4. Décongeler les échantillons à analyser et les diluer immédiatement.
5. Sélectionner 1 ou plusieurs puits pour servir de blanc(s). Ajouter 100 µL de Diluant pour échantillon dans ces puits.
6. Ajouter 100 µL de chaque Standard C3a Plus (A, B, C, D, E) dans les puits en duplicate. **REMARQUE: Les Standards sont prêts à l'emploi et ne nécessitent pas de dilution.**
7. Ajouter 100 µL de chacun des 2 Contrôles C3a Plus Faible et Fort dans les puits en duplicate. **REMARQUE: Les Contrôles sont prêts à l'emploi et ne nécessitent pas de dilution.**
8. Ajouter 100 µL de chacun des échantillons dilués dans les puits correspondants. (Voir le paragraphe *Dilution des échantillons*).
9. Incuber à 18°C à 25°C 60 ± 10 minutes.
10. Laver les puits de la façon suivante:
  - a. Après l'incubation de l'étape 9 (ou de l'étape 12 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 trois fois.**
- e. Après le quatrième lavage, inverser la plaque en la tapotant fermement à 2 reprises sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
11. A l'aide d'une multipette ou d'une pipette automatique, pipeter 100 µL de Conjugué C3a dans chaque puits, y compris ceux qui correspondent au(x) blanc(s).
  12. Incuber les barrettes à 18°C à 25°C pendant 60 ± 10 minutes.
  13. Après cette incubation de 60 minutes, répéter l'étape de lavage décrite à l'étape 10.
  14. Immédiatement après ce lavage, pipeter 100 µL de Solution de Substrat dans tous les puits y compris ceux qui correspondent au(x) blanc(s).
  15. Incuber les barrettes à 18°C à 25°C pendant 15 (± 1) minutes.
  16. 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.**
17. 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 16), en faisant une correction pour les blancs.
  18. Lire la concentration des échantillons et des Contrôles à partir de la courbe standard.
  19. 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 C3a Plus contient un Contrôle Fort et un Contrôle Faible 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.

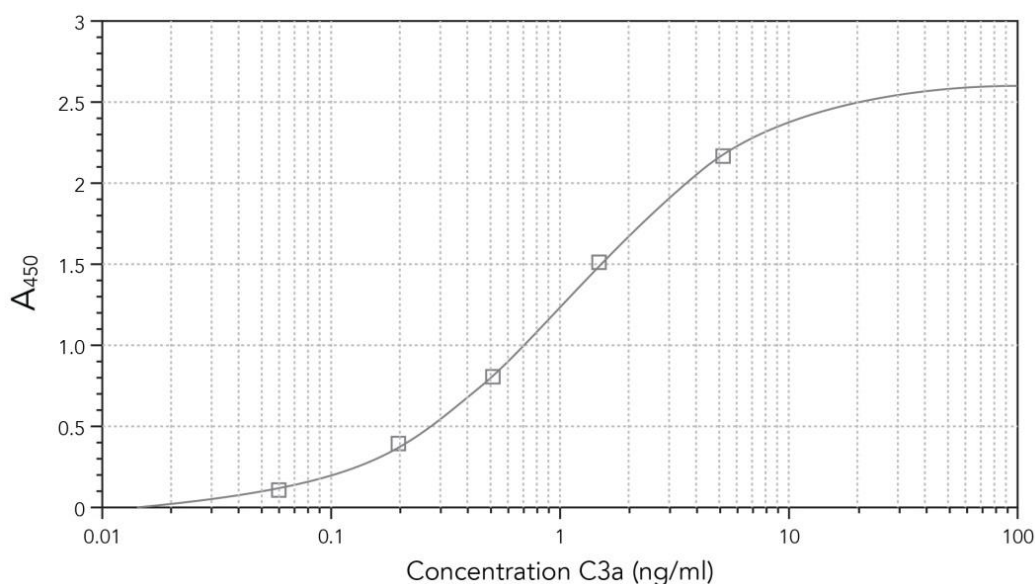
## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

### Calcul des Résultats

**Utilisation de la Courbe Standard:** On trace la courbe standard du dosage EIA C3a Plus 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. On trouvera ci-dessous un exemple de courbe standard (Figure 1).



**Figure 1**  
**Exemple de Courbe Standard**



### Calcul de la concentration en C3a des échantillon

Les concentrations indiquées sur les flacons de Standards et de Contrôles sont des unités absolues de C3a. La concentration en C3a 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 1:200, on obtient une concentration de 0,5 ng/ml C3a sur la courbe obtenue par la 4-paramètre d'analyse, la concentration en C3a de l'échantillon sera égale à 100 ng/ml C3a (ou  $200 \times 0,5$ ).

Si la valeur de  $A_{450}$  pour un échantillon donné est supérieure à la LSDQ du kit ou si les valeurs obtenues sont inférieures à la LIDQ du kit, ajuster la dilution et la re-dosage des échantillons pour obtenir une concentration plus précise et d'obtenir des valeurs de  $A_{450}$  comprises dans ces limites. Il faudra redoser également les Standards et les Contrôles C3a.

### Validation

Déterminer l'asymptote supérieure (D) et le coefficient de corrélation de la courbe logistique à 4 paramètres dérivée corrects pour les Étalons A, B, C, D et E du C3a.

---

coefficient de corrélation ( $r^2$ ):	> 0,98
asymptote supérieure (D):	≥ 1,49

---

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 C3a Plus sur des échantillons de sérum ou de plasma recueillis sur K2 EDTA ou sur citrate. On n'a pas testé d'autres anticoagulants.

## VALEURS OBSERVÉES

On a dosé dans le dosage ELISA MicroVue C3a Plus des EDTA 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	129,6	33,8 à 268,1
Sérum	20	240,4	71,0 à 589,2

REMARQUE: Les concentrations en C3a 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 C3a Plus est égale à 0,012 ng/ml, calculée comme la limite supérieure obtenue pour 3DS dans une étude de précision réalisée à l'aide du standard zéro.

**LIDQ:** La limite inférieure de quantification (LIDQ) du dosage du C3a Plus est égale à 0,023 ng/ml, concentration la plus basse de la courbe étalon remplissant les critères internes d'exactitude et de précision.

**LSDQ:** La limite supérieure de quantification (LSDQ) du dosage du C3a Plus est de 2,531 ng/ml, concentration la plus élevée de la courbe étalon remplissant les critères internes d'exactitude et de précision. Les échantillons dilués présentant une concentration supérieure à cette limite doivent être analysés à nouveau à une dilution supérieure.

### Substances Interférentes

Les substances suivantes ont été testées dans le dosage du C3a Plus et ne trouve pas d'interférer avec le dosage:

Substance	Concentration
Albumine	6000 mg/dl
γ Globulines	6000 mg/dl
Bilirubine	20 mg/dl
Hémoglobine	200 mg/dl
Triglycérides	3000 mg/dl
Na + Héparine	3 U/ml
Glucose	1000 mg/dl
Cholestérol	500 mg/dl
EDTA	10 mM
C3 Protéine	5 µg/ml
C5 Protéine	5 µg/ml
C5a	5 µg/ml

## 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	C3a (ng/ml)	C.V. Intra-essai <sup>1</sup> (%)	C.V. Inter-essais <sup>2</sup> (%)
EDTA Plasma	55,80	4,7	14,7
	119,5	5,0	19,6
Sérum	533,3	5,3	8,3
	2308	4,5	5,9

<sup>1</sup>n = 20 reprises    <sup>2</sup>n = 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.

Échantillon	Facteur de Dilution	Observé C3a (ng/ml)	Récupération (%)
EDTA Plasma	175	67,88	105,5
	200	64,36	100,0
	225	63,67	98,9
	250	62,99	97,9
	275	65,13	101,2
	300	65,54	101,8
Sérum	1250	2097	96,5
	2500	2128	97,9
	5000	2173	100,0
	10000	2160	99,4
	20000	2196	101,1
	40000	2423	111,5

## Spike Récupération

La récupération maximale a été obtenue en surchargeant les échantillons avec une quantité connue de C3a purifié et en comparant les valeurs observées avec les valeurs attendues.

Échantillon	C3a (ng/mL)	Spike (ng/mL)	Résultat (ng/mL)	Récupération (%)
Serum 1	1021		2788	99,7
Serum 2	615,1	1775	2343	98,0
Serum 3	2080		3677	95,4
Plasma 1	53,4		230,5	99,7
Plasma 2	87,4	177,8	240,7	90,8
Plasma 3	118,3		278,8	94,1

## 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 [quidel.com](http://quidel.com).

## RÉFÉRENCES

1. Markiewski, M. Maciej, Dimitrios Mastellos, Ruxandra Tudoran, Robert A. DeAngelis, Christoph W. Strey, et al. 2004. C3a and C3b Activation Products of the Third Component of Complement (C3) Are Critical for Normal Liver Recovery after Toxic Injury. *The Journal of Immunology*. 173: 747-754. <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/173/2/747>.
2. Hugli, Tony E. 1975. Human Anaphylatoxin (C3a) from the Third Component of Complement. Primary Structure. *Journal of Biological Chemistry*. 250(21):8293-8301.
3. Morgan, Edward L., William O. Weigle and Tony E. Hugli. 1982. Anaphylatoxin-Mediated Regulation of the Immune Response, I. C3a-mediated Suppression of Murine Humoral Immune Responses. *J. Exp. Med.* 155:1412-1426.
4. Hugli, Tony E. and Hans J. Muller-Eberhard. 1978. Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Advances in Immunology*. 26:1-53.
5. Hugli, Tony E. 1986. Biochemistry and Biology of Anaphylatoxins. *Complement*. 3:111-127.
6. Purwar, Rahul, Miriam Wittmann, Jorg Zwirner, Martin Oppermann, et al. 2006. Induction of C3 and CCL2 by C3a in Keratinocytes: A Novel Autocrine Amplification Loop of Inflammatory Skin Reactions. *J. Immunol.* 177: 4444-4450.
7. Mack, W.J., A.F. Ducruet, Z.L. Hickman, M.C. Garrett, et al. 2007. Early plasma complement C3a levels correlate with functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 61(2):255-60; discussion 260-1.
8. Burns, Victoria E., Kate M. Edwards, Christopher Ring, Mark Drayson, and Douglas Carroll. 2008. Complement Cascade Activation After an Acute Psychological Stress Task. *Psychosom Med.* 70:387-396.
9. Marcheix, B., Michel Carrier, Catherine Martel, Marieve Cossette, et al. 2008. Effect of Pericardial Blood Processing on Postoperative Inflammation and the Complement Pathways. *Ann. Thorac. Surg.* 85:530-535. doi: 10.1016/j.athoracsur.207.08.050.
10. Gerasimidis, Thomas, Giorgos Sfyroeras, Giorgos Trellopoulos, Lemonia Skoura, Konstantinos Papazoglou, Konstantinos Konstantinidis, ... Efthimia Parapanisiou. 2005. Impact of Endograft Material on the Inflammatory Response After Elective Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *Angiology*. 56(6):743-753.
11. Hoenich, Nicholas A. and Kostas P. Katopodis. 2002. Clinical characterization of a new polymeric membrane for use in renal replacement therapy. *Biomaterials*. 23:3853-3858.
12. Rinder, Christine S., Henry M. Rinder, Michael J. Smith, Jayne B. Tracey, Jane Fitch, Lan Li, ... Brian R. Smith. 1999. Selective Blockade of Membrane Attack Complex Formation During Simulated Extracorporeal Circulation Inhibits Platelet but not Leukocyte Activation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 118:460-466.
13. Smith, Brian Richard, Henry M. Rinder, and Christine S. Rinder. 2002. Interaction of Blood and Artificial Surfaces. *Thrombosis and Hemorrhage, 3rd Edition*. Chapter 42.
14. Gasche, Yvan, Manuel Pascual, Peter M. Suter, Herve Favre, Jean-Claude Chevrolet and Jurg A. Schifflerli. 1996. Complement depletion during haemofiltration with polyacrylonitrile membranes. *Nephrol Dial Transplant*. 11:117-119.
15. Sperling, Claudia, Manfred F. Maitz, Sandra Talkenberger, Marie-Francoise Gouzy, Thomas Groth, and Carsten Werner. 2007. *In vitro* blood reactivity to hydroxylated and nonhydroxylated polymer surfaces. *Biomaterials*. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.041.
16. Frangogiannis, Nikolaos G., C. Wayne Smith, and Mark L. Entman. 2002. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Res.* 53:31-47.
17. Fareed, Jawed, Debra A. Hoppensteadt, Fred Leya, Omer Iqbal, Helmut Wolf, and Roger Bick. 1998. Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes. *Clin Chem.* 44:8(B):1845-1853.
18. Arumugam, Thiruma V., Sung-Chun Tang, Justin D. Lathia, Aiwu Cheng, Mohamed R. Mughal, ... Mark P. Mattson. 2007. Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *PNAS*. 104(35):14104-14109. [www.pnas.org](http://www.pnas.org) doi:10.1073.pnas.0700506104.
19. Van Beek, Johan, Kristina Elward, and Philippe Gasque. 2003. Activation of Complement in the Central Nervous System: Roles in Neurodegeneration and Neuroprotection. *Ann NY Acad Sci.* 992:56-71.

20. Sheerin, N.S. and S.H. Sacks. 2002. Leaked protein and interstitial damage in the kidney: is complement the missing link? *Clin Exp Immunol.* 130:1-3.
21. Bengtsson, A., H. Redl, G. Schlag, K Hogasen, O. Gotze, and T.E. Mollnes. 1998. Anti-TNF Treatment of Baboons with Sepsis Reduces TNF- $\alpha$  IL-6 and IL-8, but not the Degree of Complement Activation. *Scand J Immunol.* 48:509–514.
22. Haas, Pieter-Jan and Jos van Strijp. 2007. Anaphylatoxins: Their Role in Bacterial Infection and Inflammation. *Immunol Res.* 37(3):161-175.
23. Black, Sylvester M., John F. Grehan, Andrew L. Rivard, Barbara A. Benson, Andrea E. Wahner, ... Agustin P. Dalmaso. 2006. Porcine Endothelial Cells and Iliac Arteries Transduced with AdenoIL-4 Are Intrinsically Protected, through Akt Activation, against Immediate Injury Caused by Human Complement. *J. Immunol.* 177:7355-7363.
24. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 2007. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition.* Washington: U.S. Government Printing Office.  
<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>.
25. Mollnes, T.E., P. Garred, and G. Bergseth. 1988. Effect of time, temperature and anticoagulants on *in vitro* complement activation: Consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clin. Exp. Immunology.* 73:484 488.
26. Centers for Disease Control. 1987. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR.* 36 (suppl. No. 2S):001.

**REF** A032 – MicroVue C3a Plus 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](http://quidel.com)

**PIA032001FR00 (11/17)**

## 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



Risques biologiques

---

**IVD**

Pour utilisation *in vitro*



Contenu suffisant pour 96 déterminations

---

**CONT**

Contenu

**CONTROL**

Contrôle

---