

Saggio immunoenzimatico per la quantizzazione dei frammenti di C3a della proteina di complemento C3 presenti nel siero o plasma umano

SOMMARIO

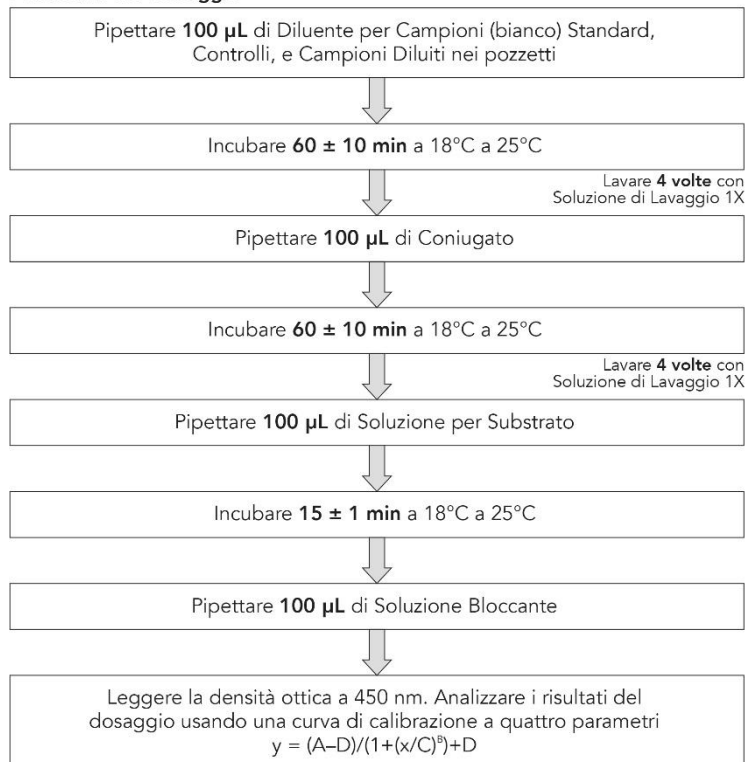
Preparazione Reagente

- Diluire la Wash Solution Concentrat 1:20 con Acqua Deionizzata

Preparazione Campione (Plasma – 1:200; Siero – 1:5000)

- Pipettare il Diluente per Campioni per diluizione 1:
90 μ L per ciascun campione di plasma
490 μ L per ciascun campione di siero
- Pipettare il Diluente per Campioni per diluizione 2:
475 μ L per ciascun campione di plasma
495 μ L per ciascun campione di siero
- Scongela rapidamente i campioni incubandoli a 37°C fino a quando circa il 90% del campione è scongelato. Porre immediatamente nel ghiaccio.
- Miscelare delicatamente ciascun campione.
- Trasferire 10 μ L di ciascun campione di plasma o di siero al volume appropriato di Diluizione 1 di Diluente per Campioni e miscelare delicatamente.
- Trasferire 25 μ L di ciascun campione diluito di plasma o 5 μ L di ciascun campione diluito di siero dalla miscela di diluizione 1 al volume adeguato di diluizione 2 di diluente per campioni e miscelare delicatamente.
25 μ L di campioni diluito di plasma \rightarrow 475 μ L Diluente per Campioni
5 μ L di campioni diluito di siero \rightarrow 495 μ L Diluente per Campioni

Procedura del Dosaggio





SCOPO DEL TEST

Il Dosaggio Immunoenzimatico MicroVue C3a Plus misura la quantità di C3a nel siero o plasma umano.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Il Dosaggio Immunoenzimatico MicroVue C3a Plus è un immunodosaggio a cattura diretta su micropiastra a 96 pozzetti per il dosaggio quantitativo del C3a nel siero, plasma e altri campioni biologici o sperimentali. In condizioni normali, l'attivazione delle sequenze classica, alternativa o del complemento lectina porta alla formazione dell'enzima multi-molecolare C3 convertasi in grado di scindere C3 in C3a e C3b.¹ C3a è un frammento proteico a basso peso molecolare (approssimativamente 9kD) di 77 amminoacidi.² C3a viene rapidamente metabolizzato dall'enzima sierico carbossipeptidasi N in una forma più stabile, la C3a des-Arg³, meno attiva, di 76 amino acidi. Per comodità, entrambe le forme si riferiscono a "C3a" in questo documento.

Il dosaggio MicroVue C3a Plus, un sistema quantitativo, rapido e altamente specifico per la determinazione dei livelli di C3a, è destinato per indagini nel ruolo o nello stato di sequenze dell'attivazione del complemento terminale, e per il monitoraggio della generazione del C3a *in vivo* o *in vitro*. Il C3a ha dimostrato di: incrementare la permeabilità vascolare; essere spasmogenico e chemiotattico; indurre il rilascio di mediatori farmacologicamente attivi da un'ampia varietà di tipi di cellule. È ben documentato il ruolo del C3a nella patogenesi delle reazioni infiammatorie osservate nella sepsi batterica da gram-negativi, nel trauma, nella cardiopatia ischemica, nell'ischemia cerebrale, nella sindrome post-dialitica e in diverse patologie autoimmuni, tra cui l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso e la glomerulonefrite acuta.^{4, 6-23}

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il Dosaggio Immunoenzimatico MicroVue C3a Plus è una procedura a tre step che utilizza (1) una micropiastra coattata con un anticorpo monoclonale murino specifico per un neo-epitopo del C3a umano, (2) un anticorpo polyclonale coniugato con fosfatasi alcalina di rafano (HRP) specifico per la regione C3a del C3 e (3) un substrato cromogenico.

In fase uno, Standard, Controlli e campioni diluiti sono aggiunti ai pozzetti coattati con un anticorpo monoclonale murino specifico per C3a. L'anticorpo monoclonale si lega alla regione C3a presente negli standards, nei controlli o nei campioni. Dopo il periodo di incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove quanto non si è legato.

In fase due, l'anti-C3 (C3a) coniugato con perossidasi di rafano (HRP) viene aggiunto a ciascun pozzetto. L'enzima coniugato anti C3 (C3a) si lega al C3a immobilizzato catturato nella prima fase.. Dopo il periodo di incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove il coniugato non legato.

In fase tre, 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 il 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 C3a presenti negli standard, nei controlli e nei campioni. I risultati sono calcolati a partire dalla curva standard generata utilizzando analisi con 4 parametri.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

96 Test per C3a

Il kit MicroVue C3a Plus EIA contiene quanto segue:

A	C3a Plus Standard	Codice 5140 – 5145	1 ciascuno, 1,5 mL
B	Pronti all'uso. Contiene siero umano con concentrazione note di C3a (ng/mL), con stabilizzanti		
C	proteici		
D			
E			
L	Controllo Basso	Codice 5146	1,5 mL
	Pronto all'uso. Contiene siero umano con a concentrazione nota di C3a (ng/mL), e stabilizzanti proteici		
N	Controllo Alto	Codice 5147	1,5 mL
	Pronto all'uso. Contiene siero umano con concentrazione nota di C3a (ng/mL), e stabilizzanti proteici		
1	Strisce Coattate	Codice 5148	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 each, 50 mL
	Contiene tampone fosfato (PBS), 1,0% Tween-20®, e 0,035% ProClin® 300		
4	Diluente per Campione	Codice 5150	50 mL
	Contiene un tampone a base proteica con 0,05% di ProClin 300		
5	Substrato con TMB	Codice 5059	12 mL
	Pronto all'uso. Contiene 3,3',5,5'-tetramethylbenzidene (TMB) e Perossido di idrogeno (H ₂ O ₂)		
6	Coniugato	Codice 5151	12 mL
	Contiene anticorpo polyclonale anti-C3a coniugato con Perossidasi di Rafano		

Tween-20® è un marchio registrato di ICI Americas Inc.

ProClin® è un marchio registrato di Rohm and Haas Company.

MATERIALI RICHIESTO MA NON FORNITO

- Timer (intervallo di tempo 60 minuti)
- Piastra di diluizione a 96 pozzetti (VWR REF: 47743-828) o provette e cestelli per test per la diluizione dei campioni (opzionale)
- Micropiastre pulite e non utilizzate per il metodo di replicazione delle piastre (opzionale)
- Contenitore graduato per la diluizione del tampone di lavaggio
- Sistemi di lavaggio convalidato per saggio immunologico
- Micropipette e puntali sterili, monouso
- Serbatoi di reagente per l'aggiunta del coniugato, del substrato e della soluzione bloccante alla piastra (usare serbatoi puliti e non utilizzati per ciascun reagente)
- Pipetta multicanale regolabile (8 o 12 canali) o micropipette ripetibili (opzionali)
- Lettore per piastra in grado di effettuare letture ad una densità ottica A₄₅₀ tra 0,0 e 3,0
- Acqua deionizzata o distillata

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- 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."²⁴
- 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 *TRATTAMENTO CAMPIONI E PREPARAZIONE*).
- 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 10). 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 25°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.

Torbidità o alterazione del colore di Diluente per Campione indica un deterioramento di questo reagente. Se ciò dovesse avvenire, la soluzione va eliminata. Il colore del diluente per campioni può variare da rosa a marrone: ciò è normale e non indica deterioramento né instabilità.

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 C3a può essere generato in campioni utilizzati impropriamente attraverso un'attivazione artefatta del complemento. Per risultati ottimali nel plasma, si raccomanda l'uso di provette di prelievo con K2 EDTA (Fisher REF: 22-040-161).

I valori dei campioni serici normali saranno più alti di quelli ottenuti sui campioni di plasma EDTA. I livelli di C3a nel plasma EDTA possono più rappresentare accuratamente le concentrazioni *in vivo*.²⁵

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

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

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

Per ridurre al minimo il tempo di manipolazione dei campioni, impostare una piastra (o provette) di diluizione e aggiungere il volume adeguato di diluente (come descritto nella seguente sezione *Diluizione dei campioni*) prima di scongelare i campioni per la valutazione.

Scongelare i campioni congelati rapidamente a 37°C fino a quasi scongelamento. Trasferire i campioni scongelati immediatamente su ghiaccio per prevenire l'attivazione del complemento prima della diluizione.

Mantenere i campioni nel ghiaccio per non più di due ore. 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 C3a e influire sui risultati. I campioni dovrebbero essere dosati appena possibile dopo scongelamento. È possibile eseguire un solo ciclo 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 infettive. Usare le Precauzioni Universali. Non utilizzare campioni calore-inattivati, contaminati, o non correttamente conservati.

NOTA: Vedere *Scongelo dei Campioni Congelati* per le indicazioni importanti sui metodi più adatti per scongelare i campioni congelati. Il trattamento adeguato del campione è essenziale per ottenere risultati accurati.

NOTA CRITICA: Eseguire il prelievo di campioni e di diluizione correttamente per evitare l'attivazione del complemento e la conseguente generazione C3a nei campioni.

I campioni **devono** essere diluiti in modo che i valori osservati a A_{450} siano al di sopra del LLOQ e non superino il valore A_{450} del ULOQ. I campioni con letture a A_{450} di fuori di questo intervallo devono essere ri-dosati ad una nuova diluizione.

Determinare il numero (N) di campioni da esaminare. Etichettare 2 gruppi di provette del test da # 1 a # N, e registrare a quali campioni corrispondono ciascuna provetta. In alternativa è possibile utilizzare una piastra di diluizione a 96 pozzetti per effettuare le diluizioni.

Preparare una diluizione adeguata (come descritto nella sezione seguente) per ciascun campione usando il Diluente per Campioni. Per ogni diluizione, miscelare delicatamente per evitare la formazione di schiuma o bolle. Non tenere o riutilizzare campioni diluiti.

Metodo di diluizione

Per ottenere risultati ottimali, eseguire una due-diluizioni passo per preparare ciascun campione.

Plasma

Diluire i campioni di plasma in un rapporto di 1:200 con il diluente per campioni fornito, come segue:

- Per ciascuna diluizione, pipettare 90 μL di diluente per campioni per la diluizione 1 e 475 μL per la diluizione 2 in provette o piastre di diluizione separate.
- Preparare la diluizione 1 aggiungendo 10 μL del campione di test a 90 μL di diluente per campioni (la provetta o piastra per la diluizione 1 del plasma). Miscelare delicatamente.
- Preparare la diluizione 2 aggiungendo 25 μL della diluizione 1 a 475 μL di diluente per campioni (la provetta o piastra per la diluizione 2 del plasma). Miscelare delicatamente.

Siero

Diluire i campioni di siero in un rapporto di 1:5000 con il diluente per campioni fornito, come segue:

- Per ciascun campione di test, pipettare 490 μL di diluente per campioni per la diluizione 1 e 495 μL per la diluizione 2 in provette o piastre di diluizione separate.
- Preparare la diluizione 1 aggiungendo 10 μL del campione di test a 490 μL di diluente per campioni (la provetta o piastra per la diluizione 1 del siero). Miscelare delicatamente.
- Preparare la diluizione 2 aggiungendo 5 μL della diluizione 1 a 495 μL di diluente per campioni (la provetta o piastra per la diluizione 2 del siero). Miscelare delicatamente.

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 µL a 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 25°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*).

Standard e Controlli

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

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.

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 riporla 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. Etichettare la piastra/provette di diluizione in modo che corrispondano a tutti i campioni di test.
3. Aggiungere il diluente per campioni alla piastra/provette di diluizione. (*Vedere Diluizione del Campione.*)
4. Scongelare i campioni test e diluire immediatamente.
5. Selezionare uno o più pozzetti come bianco. Aggiungere 100 µL di Diluente Campione — Specimen Diluent — ai pozzetti che saranno usati come bianco.

6. Aggiungere 100 µL di ciascuno Standard C3a Plus (A, B, C, D, E) ai pozzetti in doppio. **NOTA: Gli standard sono già stati diluiti e sono pronti all'uso.**
7. Aggiungere 100 µL di Controllo Basso C3a Plus e Controllo Alto C3a Plus ai pozzetti in doppio. **NOTA: I controlli sono già stati diluiti e sono pronti all'uso.**
8. Aggiungere 100 µL di ciascun campione diluito nei pozzetti assegnati. (Vedere *Diluizione del Campione*.)
9. Incubare a 18°C a 25°C per 60 ± 10 minuti.
10. Lavare i pozzetti come segue:
 - a. Dopo l'incubazione del passaggio 9 (o nel passaggio 12 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 tre volte.**
 - e. Dopo il quarta ciclo di lavaggio, capovolgere la piastra, e tamponare in maniera decisa su carta assorbente per due volte per rimuovere residui di liquido di lavaggio.
11. Usando una pipetta multicanale o ripetitiva, dispensare 100 µL di Coniugato C3a in ciascun pozzetto lavato, compresi i pozzetti del bianco.
12. Incubare le strisce a 18°C a 25°C per 60 (± 10) minuti.
13. Lavare i pozzetti dopo l'incubazione di 60 minuti (passaggio 12) , come descritto nel passaggio 10.
14. Subito dopo la procedura di lavaggio, dispensare 100 µL della Soluzione di Substrato in ciascun pozzetto, compresi i pozzetti del bianco.
15. Incubare le strisce a 18°C a 25°C per 15 (± 1) minuti.
16. 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.
17. Effettuare le letture di assorbanza a 450 nm (valore A_{450}) per ciascun pozzetto entro 60 minuti dall'aggiunta della Soluzione Bloccante (passaggio 16), facendo la necessaria conta del bianco.
18. Determinare la concentrazione dei campioni e dei Controlli dalla Curva Standard.
19. 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 C3a Plus Campioni di Controllo Basso e Alto 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.

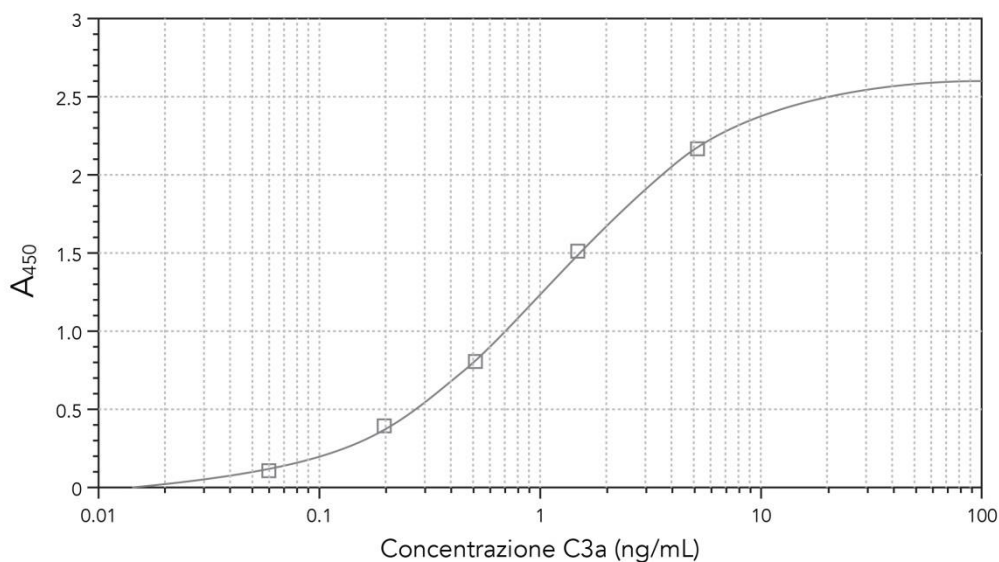
Il Certificato di Analisi compreso nel kit è lotto-specifico e deve essere usato per verificare che i risultati ottenuti in laboratorio siano simili a quelli ottenuti da Quidel Corporation.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolo dei Risultati

Uso della Curva Standard: La curva standard per il dosaggio EIA C3a Plus 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. Nella Figura 1 è riportato un esempio di una tipica Curva Standard.

Figura 1
Esempio di Curva Standard



Calcolo delle Concentrazioni Reali di C3a nei campioni

La concentrazione assegnata riportata sui flaconi degli standard e dei controlli sono unità assolute del complesso C3a. La concentrazione di C3a 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 1:200 per il test, e il 4-parametro rese curva logistica di una concentrazione di 0,5 ng C3a/mL, allora la concentrazione di C3a nel campione sarà 100 ng C3a/mL (o $200 \times 0,5$).

Al fine di ottenere determinazioni accurate della concentrazione di C3a per i campioni che hanno valori di A_{450} superiore al ULOQ 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 l'asintoto superiore (D) e il coefficiente di correlazione della curva logistica a 4 parametri derivata per gli standard A, B, C, D ed E del C3a. I valori devono rientrare nell'intervallo specificato affinché il dosaggio sia validato:

coefficiente di correlazione (r):	> 0.98
Asintoto superiore (D):	$\geq 1,49$

Fare riferimento alle etichette dei flacon per i range di concentrazione di C3a per i controlli basso e alto.

LIMITI

Il saggio immunoenzimatico MicroVue C3a Plus deve essere usato su campioni di siero o plasma K2 EDTA. 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 C3a Plus. Di seguito i risultati.

	n	Media (ng/mL)	Intervallo (ng/mL)
Plasma EDTA	20	129,6	33,8 a 268,1
Siero	20	240,4	71,0 a 589,2

NOTA: Le concentrazioni di C3a determinate per siero e plasma EDTA possono variare tra laboratori; pertanto, si raccomanda che ciascun laboratorio stabilisca un proprio intervallo. I valori indicati nella tabella di cui sopra sono linee guida.

PRESTAZIONI DEL DOSAGGIO

Limiti

LOD: Il limite di rilevazione (LOD) per il dosaggio C3a Plus è 0,012 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 C3a Plus è 0,023 ng/mL, la più bassa concentrazione sulla curva standard che rispetta i criteri interni di accuratezza e precisione.

ULOQ: Il limite superiore di quantizzazione (ULOQ) per il dosaggio C3a Plus è 2,531 ng/mL, la concentrazione più alta sulla curva standard che soddisfa i criteri interni di accuratezza e precisione. Campioni diluiti con una concentrazione superiore a questo limite dovranno essere sottoposti di nuovo a test con una diluizione più elevata.

Sostanze Interferenti

Le sostanze elencate di seguito sono state dosate nel test C3a Plus e non interferiscono con il dosaggio per concentrazioni fino a:

Sostanza	Concentrazione
Albumina	6000 mg/dL
Gamma Globuline	6000 mg/dL
Bilirubina	20 mg/dL
Emoglobina	200 mg/dL
Trigliceridi	3000 mg/dL
Sodio Eparina	3 U/mL
Glucosio	1000 mg/dL
Colesterolo	500 mg/dL
EDTA	10 mM
C3 Proteina	5 µg/mL
C5 Proteina	5 µg/mL
C5a	5 µg/mL

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	C3a (ng/mL)	Intra-dosaggio ¹	Inter-dosaggio ²
		C.V. (%)	C.V. (%)
Plasma EDTA	55,80	4,7	14,7
	119,5	5,0	19,6
Siero	533,3	5,3	8,3
	2308	4,5	5,9

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	Osservato C3a (ng/mL)	Recupero (%)
Plasma EDTA	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
Serum	1250	2097	96,5
	2500	2128	97,9
	5000	2173	100,0
	10000	2160	99,4
	20000	2196	101,1
	40000	2423	111,5

Recupero

Il recupero dei picchi è stato eseguito testando campioni con una quantità nota di C3a purificato e confrontando i valori osservati con i valori previsti.

Campione	C3a (ng/mL)	Spike (ng/mL)	Risultato (ng/mL)	Recupero (%)
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

ASSISTENZA

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

BIBLIOGRAFIA

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 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- α 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

PIA032001IT00 (11/17)

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



Rischio biologico

IVD

Per uso diagnostico *In Vitro*



Contenuto sufficiente per 96 determinazioni

CONT

Contenuto / Contiene

CONTROL

Controllo
