

Et enzym-immunoassay til kvantificering af C4a-fragmentet af komplementproteinet C4 i humant sera eller plasma

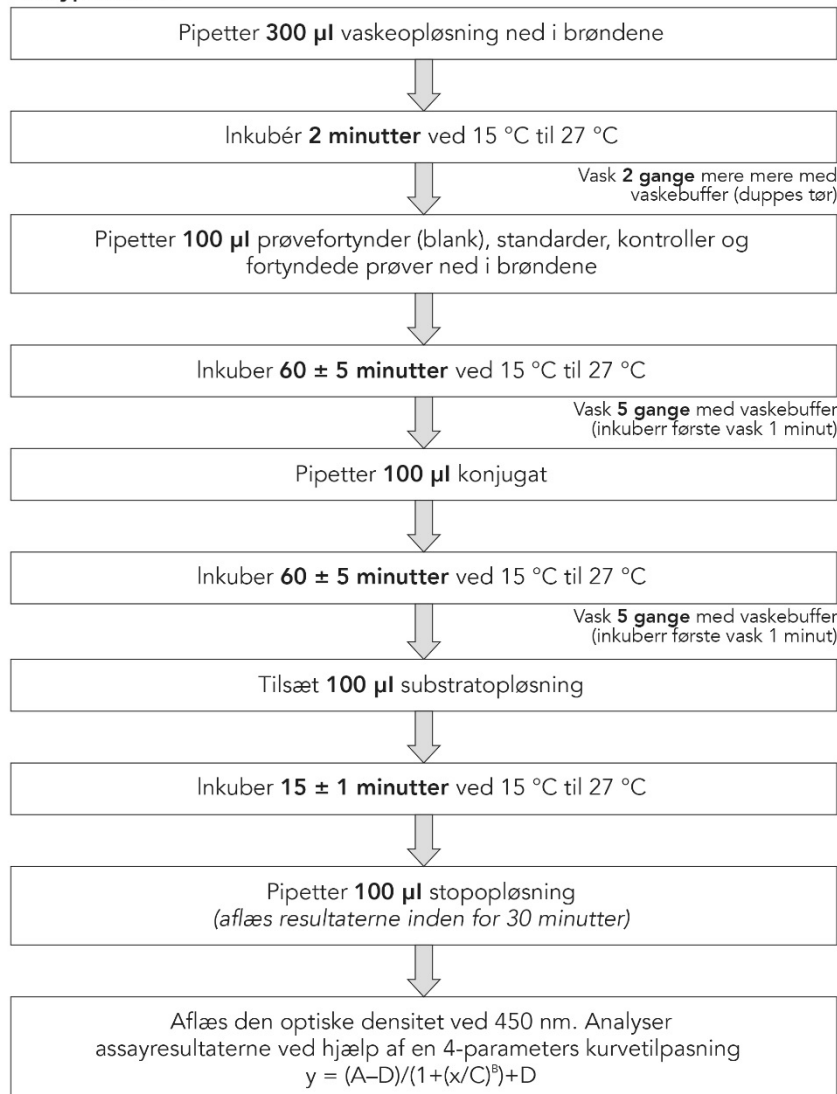
Til *in vitro*-diagnostisk brug. Kun til eksport. Ikke til salg eller brug i USA eller Canada.

OPSUMMERING

Klargøring af reagens, standarder, kontroller og prøve

- Fortynd vaskebufferkoncentratet **1:20** med afioniseret vand
- Fortynd plasmaprøver **1:40** med prøvafortynder (f.eks. 10 µl prøve + 390 µl fortynder)
- Fortynd serumprøver **1:80** med prøvafortynder (f.eks. 10 µl prøve + 790 µl fortynder)

Assayprocedure





ANVENDELSOMRÅDE

Kittet med MicroVue C4a enzym-immunoassay måler mængden af komplementfragmentet C4a, et aktiveringsfragment af komplementprotein, C4 i humant og primat plasma eller serum. Måling af C4a i humant plasma eller serum dokumenterer involvering af komplementets klassiske eller lectin pathway.

OVERSIGT OG BESKRIVELSE AF TESTEN

MicroVue C4a enzym-immunoassay er et direct-capture immunoassay med 96 brønde til måling af C4a i humant eller primat serum, plasma og andre biologiske eller eksperimentelle prøver. Under normale forhold fører aktivering af de klassiske eller lectin komplement pathways til spaltning af komplementproteinet C4 til C4a og C4b af proteasen C1s. C4a spaltes hurtigt til den mere stabile, mindre aktive form C4a-des Arg af endogent serumcarboxypeptidase N-enzym. Derfor giver en kvantificering af C4a-des Arg en pålidelig måling af aktivering af klassisk eller lectin komplement pathway, der er forekommet i testprøver.¹⁻⁴

MicroVue C4a-assayet, som er en hurtig, meget specifik og kvantitativ procedure til måling af C4a-niveauer, er beregnet til undersøgelser af rollen eller status af komplement pathway aktivering under en lang række forskningsforhold, samt til monitorering af generering af C4a *in vivo* eller *in vitro*. C4a er den svageste af anafylatoksinerne, sammenlignet med C3A og C5a. Den har imidlertid betydning for ændringer i vaskulær permeabilitet, induktion af sammentrækning af glat muskulatur samt frigivelse af histamin fra mastceller og basofile celler. C4a menes at spille en rolle i flere forskellige autoimmune sygdomme, herunder reumatoid arthritis, SLE og akut glomerulonefritis.⁵⁻¹⁵ Det har for nyligt vist sig at være markør for akut og kronisk Lyme borreliose.¹⁶⁻¹⁷

PROCEDURE PRINCIPPER

MicroVue C4a enzym-immunoassay til kvantificering af C4a i humant plasma eller serum er en tre-trins procedure, der anvender (1) en mikroassay-plade, som er belagt med et murint, monoklonalt antistof, der specifikt bindes til humant C4a, (2) et HRP-konjugeret monoklonalt anti-humant C4a-antistof og (3) et kromogent substrat.

I trin 1 tilsættes standarder, kontroller og prøvepræparater til mikrobrøndene, som er forbelagte med et specifikt anti-C4a monoklonalt antistof. C4a, men ikke C4 eller andre komplement aktiveringsprodukter der findes i præparaterne, vil bindes til det immobiliserede anti-C4a monoklonale antistof. Efter inkubering fjerner en vaskecyklus ubundet materiale.

I trin 2 tilsættes peberrodsperoxidase (HRP)-konjugeret monoklonalt anti-humant C4a antistof til hver testbrønd. Det enzym-konjugerede anti-humane C4a-antistof binder sig til C4a, som indfanges i mikrobrøndene. Efter inkubering fjerner en vaskecyklus ubundet, overskydende materiale.

I trin 3 tilsættes et kromogent enzymsubstrat til hver mikrobrønd. Det bundne HRP-konjugat reagerer med substratet og danner en blå farve. Efter inkubation stoppes enzymreaktionen kemisk, farven skifter til gul, og farveintensiteten måles spektrofotometrisk ved 450 nm. Reaktionsblandingsens farveintensitet er proportional med den koncentration af C4a, der findes i testpræparater, standarder og kontroller.

MEDFØLGENDE REAGENSER OG MATERIALER

96 assays til C4a-fragmentet af komplementproteinet, C4

Kittet med MicroVue C4a enzym-immunoassay indeholder følgende:

A C4a standarder	Varenr. 5204 – 5208	1,5 ml hver
B	Klar til brug. Indeholder hver rensset, naturligt humant C4a-protein med en tildelt	
C	proteinkoncentrationen (ng/ml), proteinstabilisatorer	
D		
E		
L C4a lav kontrol	Varenr. 5209	1,5 ml
	Klar til brug. Indeholder rensset, naturligt humant C4a-protein med en tildelt koncentration (ng/ml), proteinstabilisatorer	
H C4a høj kontrol	Varenr. 5210	1,5 ml
	Klar til brug. Indeholder rensset, naturligt humant C4a-protein med en tildelt koncentration (ng/ml), proteinstabilisatorer	
① Mikroassay-plade	Varenr. 5198	12 x 8 brønde
	Otte-brønds strips belagt med et murint, monoklonalt antistof, der er specifikt for humant C4a	
② Stopopløsning	Varenr. A9947	12 ml
	Indeholder 1N (4 %) saltsyre	
③ 20X vaskeopløsningskoncentrat	Varenr. A9957	2 af hver, 50 ml
	Indeholder fosfatbufret saltvand (PBS), 1,0 % Tween-20® og 0,035 % ProClin® 300	
④ Komplementprøvefortynder	Varenr. A3670	50 ml
	Indeholder PBS, 0,05 % Tween-20, 2,5 % proteinstabilisatorer, 0,035 % ProClin 300	
⑤ TMB-substrat	Varenr. 5059	12 ml
	Klar til brug. Indeholder 3,3', 5,5'-tetramethylbenziden (TMB) og hydrogenperoxid (H ₂ O ₂)	
⑥ Konjugat	Varenr. 5211	12 ml
	Indeholder peberrodsperoxidase-konjugeret monoklonalt anti-humant C4a-antistof suspenderet i HRP stabiliserende buffer med konserveringsmiddel	

Tween-20® er et registreret varemærke tilhørende ICI Americas Inc.
ProClin® er et registreret varemærke tilhørende Rohm and Haas Company.

NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER

- Timer (til 60 minutter)
- Rene, ubrugte mikroassay-plader, samt fortyndingsplade til 96 brønde og/eller reagensglas og stativer
- Beholder til vaskebufferfortynding
- Vaskeflaske eller andet valideret vaskesystem til immunoassay
- Mikropipetter og sterile engangspipettespidser
- Justerbar multikanalpipette (8 eller 12 kanaler) eller gentagne mikropipetter
- Rene pipetter, 1 ml, 5 ml og 10 ml
- Reagensreservoirer til tilsættelse af konjugat, substrat og stopopløsninger til plade (brug rene, ubrugte reservoirer til hvert reagens)
- Pladelæser, der kan aflæse A₄₅₀ aflæsninger mellem 0,0 og 3,0
- Afioniseret eller destilleret vand

ADVARSLER OG FORSIGTIGHEDS REGLER

- Til *in vitro*-diagnostisk brug.
- Prøverne skal behandles som potentielt biofarligt materiale. Følg gældende retningslinjer for håndtering af dette kit og eventuelle patientprøver.

- Brug de leverede reagenser som en integreret enhed inden udløbsdatoen, som er angivet på pakningens etiket.
- Opbevar assayreagenser som angivet.
- De coatede strips må ikke anvendes, hvis posen er punkteret.
- ProClin 300 anvendes som et konserveringsmiddel. Tilfældig kontakt med eller indtagelse af buffere eller reagenser, der indeholder ProClin, kan forårsage irritation af hud, øjne eller mund. Anvend god laboratoriepraksis for at reducere risiko for eksponering. Søg læge, hvis der skulle opstå symptomer.
- Stopopløsningen anses for ætsende og kan forårsage irritation. Må ikke indtages. Undgå kontakt med øjne, hud og beklædning. Hvis der forekommer kontakt, skal det berørte område øjeblikkeligt skylles grundigt med vand. Ved indtagelse kontaktes en læge.
- Hver donorenhed, der anvendes til klargøring af standarder og kontroller af dette produkt, er testet vha. en FDA-godkendt metode for tilstedeværelse af antistof mod human immundefekt virus (HIV1 og HIV2) og hepatitis C virus, såvel som for hepatitis B overfladeantigen. Eftersom ingen testmetode kan give fuldstændig sikkerhed for fravær af smittefarlige stoffer, skal disse reagenser håndteres på biosikkerhedsniveau 2 som anbefalet for alle potentielt smittefarlige humane serum- eller blodprøver i manualen fra Centers for Disease Control / National Institutes of Health, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories".¹⁸
- Brug af multikanalpipetter eller gentage pipetteringer anbefales for at sikre rettidig tilførsel af reagenser.
- Tilsæt prøver og standarder så præcist som muligt for at opnå nøjagtige målinger af prøverne. Pipetter omhyggeligt og kun ved hjælp af kalibreret udstyr.
- Korrekt prøvetagning og opbevaring af prøverne er afgørende for nøjagtige resultater (se *HÅNDBTERING OG KLARGØRING AF PRØVER*).
- Undgå mikrobiel- eller krydskontaminering af prøver og reagenser.
- Test hver prøve dobbelt.
- Ingen mikroassaybrønd må anvendes til mere end én test.
- Andre inkuberingsstider og temperaturer end de, der er angivet i afsnittet Procedure, kan give fejlagtige resultater.
- TMB-substrat skal beskyttes mod lys og kontakt med metal eller gummi under opbevaring og inkubation. Undgå kontakt med øjne, hud og beklædning. Hvis der forekommer kontakt, skal det berørte område øjeblikkeligt skylles grundigt med vand.
- Mikrobrøndene må ikke tørre, efter at analysen er begyndt.
- Når der fjernes væske fra mikrobrøndene, må bunden af brønden hverken skrubes eller berøres.
- Varme-inaktiverede, hyperlipæmiske eller kontaminede prøver kan give fejlagtige resultater.
- For at undgå aerosoldannelse under vasken skal der anvendes et apparat til at aspirere vaskevæsken ind i en flaske med alm. blegemiddel.
- En vaskeflaske eller automatisk påfyldningsenhed skal anvendes til at vaske pladen (*ASSAYPROCEDURE*, 6 trin). Undlad anvendelse af en multikanalpipette til at vaske mikropladen for at opnå det bedste resultat.
- Testning skal udføres i et område med tilstrækkelig ventilation.
- Bortskaf beholdere og ubrugt indhold i henhold til gældende kliniske retningslinjer for bortskaffelse af biologisk farligt materiale.
- Bær egnet beskyttelsestøj, handsker og øjen/ansigtsbeskyttelse ved håndtering af indholdet i dette kit.
- Vask hænderne grundigt efter håndtering.
- For yderligere oplysninger om faresymboler, sikkerhed, håndtering og bortskaffelse af komponenterne i dette kit henvises til sikkerhedsdatabladet (SDS), der findes på quidel.com.

OPBEVARING

Opbevar det uåbnede kit ved 2 °C til 8 °C.

TEGN PÅ USTABILITET ELLER FORRINGELSE AF REAGENSER

Uklarhed eller misfarvning af den fortyndede vaskeopløsning er tegn på nedbrydning af reagentet. Hvis et af disse tegn opstår, skal opløsningen bortskaffes.

PRAE PARATHÅNDTERING OG FORBEREDELSE

Håndter og bortskaf alle prøver under iagttagelse af universelle forholdsregler.

Al håndtering af prøverne skal udføres ved 2 °C til 8 °C.

Prøvetagning

Serum/plasma

Pga. den komplementaktivering, der forekommer under koagulering, vil C4a-koncentrationen i normale humane serumprøver være højere end den koncentration, der kan opnås med prøver af EDTA-plasma. C4a-niveauerne i EDTA-plasma repræsenterer derfor muligvis mere præcist koncentrationerne *in vivo*.

C4a-fragmentet er følsomt overfor proteolyse i forkert indsamlede eller opbevarede prøver, og C4a kan genereres i forkert håndterede prøver via kunstig komplementaktivering. Korrekt prøvetagning, opbevaring og håndtering af prøverne er derfor af afgørende betydning.¹⁹ For at opnå optimale plasmaresultater anbefales det at anvende K2 eller K3 EDTA-prøvetagningsglas.

Serum- og EDTA-plasmaprøver skal tages aseptisk ved hjælp af standardteknikker.²⁰ Prøverne skal testes straks eller opbevares på is i ikke mere end fire timer, før de analyseres.

Hvis prøven ikke kan testes inden for fire timer ifølge retningslinjerne beskrevet ovenfor, skal den nedfryses ved -70 °C eller derunder.

Optøning af frosne prøver

Gør en fortyndingsplade (eller -glas) klar for at minimere håndteringstiden af prøverne. Tilsæt den korrekte mængde fortyndingsmiddel (som beskrevet i afsnittet Prøvefortynding nedenfor) forud for optøning af prøverne til evaluering.

Optø frosne prøver hurtigt ved 37 °C, indtil netop optøede. Overfør straks de optøede prøver til is for at forhindre komplement-aktivering inden fortynding. Opbevar prøverne på is i højst fire timer. Prøverne må ikke efterlades ved 37 °C, da der kan forekomme komplement-aktivering. Prøverne må ikke optøs ved stuetemperatur eller på is, da det kan føre til komplement-aktivering og påvirke testens resultat. Prøverne skal testes så hurtigt som muligt efter optøning. Prøverne kan nedfryses/optøs fem gange uden effekt. Hvis prøverne skal fryses mere til flere analyser, tilråder Quidel at nedfryse flere alikvoter af prøven for at ikke at overskride det anbefalede antal gange for nedfrysning/optøning.

Prøvefortynding

FORSIGTIG: Alle prøver skal håndteres som potentielt smittefarlige. Brug universelle forholdsregler. Undlad anvendelse af varme-inaktiverede, kontaminede eller forkert opbevarede prøver.

BEMÆRK: Se Optøning af frosne prøver for vigtige bemærkninger om korrekte metoder til at optø frosne prøver. Korrekt håndtering af prøverne er afgørende for nøjagtige resultater.

Prøverne skal fortyndes, således at observerede værdier er over LLOQ og ikke overskrider ULOQ. Prøver med aflæsninger uden for dette område skal genanalyseres med en ny fortynding.

Forbered en passende fortynding (se følgende afsnit) af hver prøve med prøvefortynderen. Bland hver fortynding forsigtigt for at undgå dannelse af skum og bobler. Fortyndede prøver må ikke opbevares eller genbruges.

Plasma

Den anbefalede fortynding for plasmaprøver i prøvefortynder er 1:40. Fortynd på følgende måde:

10 µl prøve + 390 µl prøvefortynder

Serum

Den anbefalede fortynding for serumprøver i prøvefortynder er 1:80. Fortynd på følgende måde:

10 µl prøve + 790 µl prøvefortynder

Prøver med høje niveauer af komplement-aktivering kan kræve større prøvefortyndinger end angivet ovenfor.

Tilsæt fortyndede prøver til mikrotiterbrøndene

Fuldfør tilsætningen af fortyndede prøver til mikrotiterbrøndene i løbet af 15 minutter efter tilsætningen af den første prøve.

Begge metoder kan bruges til at tilsætte fortyndede prøver, standarder, kontroller og buffer til brøndene (se trin 4 i *ASSAYPROCEDURE*). For assaykørsler, hvor der kun testes få prøver, kan de fortyndede prøver og andre reagenser tilsættes direkte til de angivne brønde med en mikropipette (100 µl/brønd). For små eller store kørsler, men især for større, anbefaler Quidel at bruge "replika pladeproceduren", beskrevet nedenfor, til at tilsætte standarder, kontroller og fortyndede prøver i mikrobrøndene så hurtigt som muligt.

Brug en multikanalpipette til at tilsætte 120 µl til 130 µl af hver opløsning til de enkelte brønde i en blank plade (medfølger ikke) svarende til det ønskede endelige EIA-mønster. Når alle opløsningerne, der skal testes, er blevet tilsat mikrobrøndene i den blanke plade, skal der hurtigt overføres 100 µl fra hver blank brønd til de antistof-belagte brønde ved hjælp af multikanalpipetter. For at undgå risikoen for krydskontaminering skal pipettespidserne udskiftes, hver gang der sker en ændring i sammensætningen af de prøver, der overføres.

Denne "replika pladeprocedure" er en bekvem måde til også at tilsætte konjugat, substrat og stopopløsning.

REAGENS FORBEREDELSE

Bring alle reagenser og materialer til 15 °C til 27 °C før brug.

Efter de nødvendige reagenser og materialer er taget ud, skal de ubrugte materialer lægges tilbage i de passende opbevaringstemperaturer (se *OPBEVARING*).

Mikroassay-strips

Fastlæg det antal strips, der er nødvendige for assayet. Quidel anbefaler at teste de blanke brønde, standarder og kontroller dobbelt. Fjern de unødvendige strips, læg dem i opbevaringsposen, luk posen tæt til igen, og læg den tilbage i 2 °C til 8 °C. Fastgør de strips, der skal anvendes, i assayet i assaypladens ramme.

Vaskeopløsning

Bland 20X vaskeopløsningskoncentratet ved at vende flasken flere gange. Hvis 20X vaskeopløsningskoncentratet er blevet opbevaret ved 2 °C til 8°C, kan der være dannet krystaller. For at opløse krystallerne skal flasken varmes i et 37 °C til 50 °C vandbad, indtil alle krystallerne er opløst, og derefter blandes grundigt. Klargør vaskeopløsningen ved at fortynde hele indholdet af en af flaskerne med 20X vaskeopløsningskoncentrat i op til én liter destilleret eller afioniseret vand. Bland grundigt. Vaskeopløsningen er stabil i 30 dage ved opbevaring i en ren beholder ved 2 °C til 8°C. Hvis der opstår misfarvning eller uklarhed, skal reagenset bortskaffes.

Standarder og kontroller

Standarder og kontroller leveres klar til brug og kræver hverken fortynding eller klargøring inden anvendelse.

ANALYSE PROCEDURE

Læs hele indlægssedlen, inden assayet startes.

Se ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER og KLARGØRING AF REAGENS.

1. Noter mikroassaybrøndenes positioner, der svarer til de(n) blanke brønd(e), alle testprøver, standarder og kontroller, såvel som de anførte lotnumre fra hætteglasetiketterne. Marker det ene hjørne af mikroassaypladen for orientering.
2. Klargør mikroassay-strips som følger:
 - a. Rehydrér mikrobrøndene ved at tilsætte ca. 300 µl vaskeopløsning til hver brønd med en vaskeflaske eller automatisk påfyldningsenhed.
 - b. Inkuber ved 15 °C til 27 °C i 2 minutter.
 - c. Fjern væsken fra hver brønd.
 - d. Tilsæt ca 300 µl vaskeopløsning til hver brønd.
 - e. Fjern væsken fra hver brønd.
 - f. Gentag trin d-e endnu en gang for at vaske i alt tre gange.**
 - g. Vend pladen og bank den to gange mod absorberende papir for at fjerne eventuel resterende væske.
3. Vælg en eller flere brønde til at fungere som en blank. Tilsæt 100 µl prøvafortynder til de(n) brønd(e), der vil blive brugt som blank i pladeaflæseren.
4. Tilsæt 100 µl standarder, kontroller eller fortyndede prøver til de angivne duplikatbrønde. Hele pladen skal være belagt inden for 15 minutter efter den første prøve er lagt på pladen.
5. Inkuber ved 15 °C til 27 °C i 60 ± 5 minutter.
6. Vask mikrobrøndene i alt 5 gange på følgende måde:
 - a. Aspirer indholdet fra hver brønd.
 - b. Tilsæt ca 300 µl vaskeopløsning til hver brønd med en vaskeflaske eller automatisk pladevasker.
 - c. Inkuber brøndene i 1 minut ved 15 °C til 27 °C.
 - d. Aspirer indholdet fra hver brønd.
 - e. Vend pladen og bank den mod absorberende papir for at fjerne eventuel resterende væske.
 - f. Tilsæt ca 300 µl vaskeopløsning til hver brønd.
 - g. Aspirer indholdet fra hver brønd.
 - h. Vend pladen og bank den mod absorberende papir for at fjerne eventuel resterende væske mellem hver vask.
 - i. Gentag trin f-h yderligere fire gange for i alt fem gange vask.**
 - j. Efter den femte vaskecyklus vendes og bankes pladen mod absorberende papir for at fjerne eventuel resterende væske.
7. Anvend en multikanalpipette eller gentagen pipette til at lægge 100 µl C4a-konjugat i hver vasket testbrønd, herunder de(n) blanke brønd(e).
8. Inkuber mikroassay-strips ved 15 °C til 27 °C i 60 ± 5 minutter.
9. Vask mikrobrøndene efter 60-minutters inkubation (trin 8), som beskrevet under *ANALYSE PROCEDURE*, trin 6.
10. Umiddelbart efter vaskeproceduren skal der dispenseres 100 µl TMB-substratopløsning ned i hver brønd, herunder de(n) blanke.
11. Inkuber mikroassay-strips ved 15 °C til 27 °C i 15 ± 1 minutter.
12. Tilsæt 100 µl stopopløsning til hver brønd for at stoppe den enzymatiske reaktion. Stopopløsningen skal tilsættes brøndene i samme rækkefølge og med samme hastighed som substratopløsningen blev tilsat.
13. Bank pladen let på bordpladen for at sprede farveudviklingen jævnt og fuldstændigt. **BEMÆRK: Optimale resultater kan opnås ved hjælp af pladeaflæserens auto-mix funktion (hvis tilgængelig) lige inden aflæsning af pladen.**

14. Bestem absorbans aflæsningen ved 450 nm for hver testbrønd samt inden for 30 minutter efter tilsætning af stopopløsningen (trin 12), idet der foretages en blank korrektion i overensstemmelse med det spektrofotometriske system, der anvendes.
15. Bestem koncentrationen af prøver og kontroller ud fra standardkurven.
16. Bortskaf de resterende fortyndede prøver, substrat og de brugte mikroassaystrips (se *ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER*).

KVALITETSKONTROL

Analysecertifikatet, der er inkluderet i dette kit, er lotspecifikt og skal anvendes til at bekræfte, at de opnåede resultater svarer til dem, der opnås hos Quidel Corporation. De vedlagte optiske densitetsværdier er udelukkende beregnet som retningslinjer. De opnåede resultater på dit laboratorium kan variere herfra.

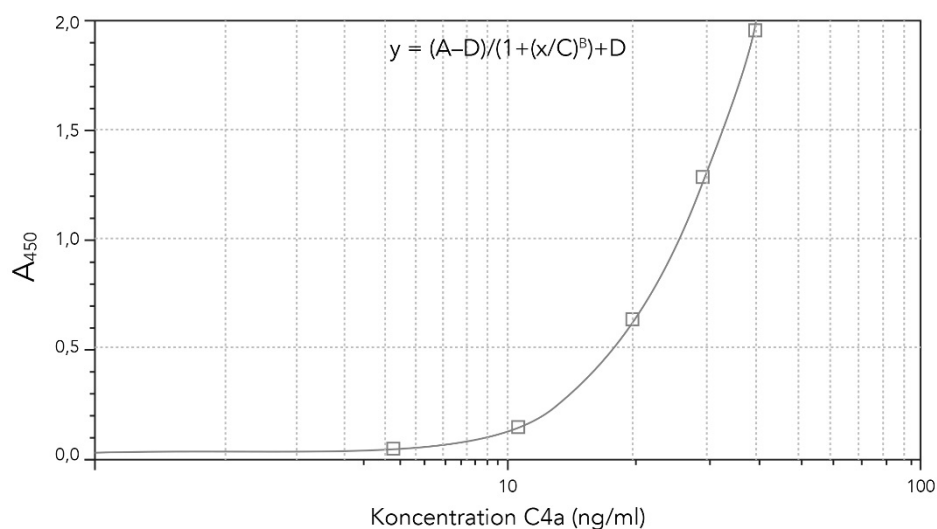
Kvalitetskontrolområder er vedlagt. Kontrolværdierne har til formål at verificere validiteten af kurven og prøveresultaterne. Hvert laboratorium bør etablere sine egne parametre for acceptable assaygrænser. Hvis kontrolværdierne IKKE ligger inden for laboratoriets acceptable grænseværdier, er assayresultaterne tvivlsomme, og prøverne skal gentages.

TOLKNING AF RESULTATER

Brug af standardkurve: Standardkurven for C4a EIA genereres ved at anvende de blanke fratrukne A_{450} værdier for hver standard (på y-aksen) og den tildelte koncentration for hver C4a-standard (på x-aksen). Efter 4-parameters regression skal den genererede standardkurve opfylde valideringskravene (se nedenfor). Det meste plade aflæsningssoftware og de fleste computere er i stand til at udføre disse beregninger.

Alternativt kan dataene afbildes manuelt, og værdierne (ng/ml) af testprøverne kan aflæses direkte fra best-fit linjen på standardkurven. Et eksempel på en typisk standardkurve er vist i figur 1.

Figur 1
Repræsentativ standardkurve



Prøve	Muestra	A_{450}	ng/ml
Standard A	Estándar A	0,05	5,19
Standard B	Estándar B	0,179	10,51
Standard C	Estándar C	0,657	20,29
Standard D	Estándar D	1,301	29,57
Standard E	Estándar E	1,956	40,34

Beregning af faktiske C4a-koncentrationer i testprøver

Den faktiske C4a-koncentration i hvert ufortyndet testpræparat bestemmes ved at gange C4a ng/ml-koncentrationen, bestemt ud fra kittets standardkurve, med den reciprokke værdi af den anvendte prøvefortyndingsfaktor.

Hvis A_{450} -værdierne for et givent testpræparat er større end værdierne for den højeste standard (E), skal resultaterne rapporteres som "større end" C4a-koncentrationen af den højeste standard (E) ganget med prøvefortyndingsfaktoren. Hvis en mere præcis C4a-koncentration er påkrævet, skal testpræparatet genanalyseres med en større fortyndingsfaktor. I alle gentagne assays skal C4a-standarder og kontroller også køres.

VALIDERING

korrelationskoeffizient (r): $\geq 0,98$
blank: $\leq 0,150$

Der henvises til hætteglasetiketterne eller produkt C of A for de acceptable gennemsnitlige C4a-koncentrationsintervaller for høje og lave kontroller.

BEGRÆNSNINGER

MicroVue C4a enzym-immunoassay har været anvendt til at teste præparater, der er taget som serum eller som plasma i K2- eller K3-EDTA. Det anbefales ikke at bruge citrat- eller heparinplasma i MicroVue C4a-assayet, da de vil producere fejlagtige resultater. Andre antikoagulanter er ikke blevet testet.

OBSERVEREDE VÆRDIER

EDTA-plasma og serum fra henholdsvis 32 og 44 normale donorer, blev testet i kittet med MicroVue C4a enzym-immunoassayet. Resultaterne er vist herunder.

Prøve	n	Middelværdi (ng/ml)	Interval (ng/ml)
EDTA-plasma	32	1694,65	383,50 til 8168,17
Serum	44	1098	20,92 til 4437,24

BEMÆRK: Middelværdien og standardafvigelsen af koncentrationerne af C4a-fragmentet, der bestemmes for plasma- eller serumprøver, kan variere mellem de forskellige laboratorier. Derfor anbefales det, at hvert laboratorium fastlægger middelværdien af C4a-fragmentkoncentrationen og standardafvigelse for prøverne.

EFFEKTIVITET

Begrænsninger

LOD: Detektionsgrænsen (LOD) for C4a EIA er 0.29 ng/ml, der bestemmes af den øvre 3 SD grænse i en nul-standard undersøgelse.

LLOQ: Den nederste kvantificeringsgrænse (LLOQ) for C4a EIA er 5,0 ng/ml, den laveste koncentration på standardkurven, der opfylder CLSI-kriterierne for nøjagtighed og præcision.

ULOQ: Den øverste kvantificeringsgrænse (ULOQ) for C4a EIA er 61 ng/ml, den højeste koncentration, der opfylder CLSI-kriterierne for nøjagtighed og præcision.

Interfererende stoffer

Følgende stoffer blev testet i C4a EIA og fundet ikke at interferere med assayet ved anvendelse af plasma- eller serumprøver:

Stof	Koncentration
Bilirubin	40 mg/dl
Hæmoglobin	200 mg/dl
Triglycerider	3000 mg/dl
Glukose	1000 mg/dl
Kolesterol	500 mg/dl
Albumin	6000 mg/dl
Gammaglobulin	6000 mg/dl
EDTA	10 mM
Heparin	3 U/ml

Præcision

Intra-og inter-assay præcision blev bestemt ved assay af 20 replikater af 1 plasmaprøve og 1 serumprøve i 10 forskellige assays.

Prøve	C4a (ng/ml)	Intra-assay ¹ CV. (%)	Inter-assay ² CV. (%)
EDTA-plasma	833,9	3,7 %	4,4 %
Serum	1941,5	4,3 %	4,0 %

¹n = 20 replikater ²n = 10 kørsler

Linearitet

Linearitet blev udført ved at fortynde prøver med prøvfortynder og sammenligne observerede værdier med forventede værdier. Typiske resultater er angivet nedenfor.

Prøve	Fortyndingsfaktor	Observeret C4a (ng/ml) ³	Forventet C4a (ng/ml) ³	Recovery (%)
EDTA-plasma	60	35,27	35,27	100 %
	80	27,247	26,45	103 %
	100	21,678	21,16	102 %
	120	18,156	17,64	103 %
Serum	80	23,657	23,657	100 %
	95	20,331	19,92	102 %
	110	17,743	17,21	103 %
	125	15,885	15,14	105 %

³Fortyndingsfaktor ikke inkluderet.

Opspædningsrecovery

Opspædningsrecovery blev udført ved at opspæde prøver med en kendt mængde rensset C4a og sammenligne observerede værdier med forventede værdier.

Prøve	C4a	Prøve	C4a	Prøve
Plasma 1	899,598		1211,02	92 %
Plasma 2	996,199	416,91	1288,55	91 %
Plasma 3	902,898		1257,25	95 %
Serum 1	1000,298		1526,67	84 %
Serum 2	1522,56	807,258	2090,01	90 %
Serum 3	675,658		1570,40	106 %

ASSISTANCE

For serviceydelse uden for USA bedes du kontakte din lokale forhandler. Yderligere information om Quidel, vores produkter og vores distributører findes på vores hjemmeside at quidel.com

REFERENCER

1. Moon K.E., Gorski J.P., Hugli T.E. 1981. "Complete primary structure of human C4a anaphylatoxin." *J BIOL CHEM* 256(16):8685-8692.
2. Gorski J.P., Hugli T.E., Muller-Eberhard H.J. 1979. "C4a: The third anaphylatoxin of the human complement system." *PROC NATL ACAD SCI (USA)* 76(10):5299-5302.
3. Gorski J.P., Hugli T.E., Muller-Eberhard H.J. 1981. "Characterization of human C4a anaphylatoxin." *J BIOL CHEM.* 256(6):2707-2711.
4. Hugli, T.E. 1986. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *COMPLEMENT* 3:111-27.
5. Fukuoka Y, Xia H-Z, Sanchez-Nunoz L.B., Dellinger A.L., Escribano L., Schwartz L.B. 2008. "Generation of anaphylatoxins by human β -Tryptase from C3, C4, and C5." *J IMMUNOL.* 180:6307-6316.
6. Mateja M.M., Korosec P., Kern I., Flezar M., Suskovic S., Sorli J. 2004. "Complement factors C3a, C4a, and C5a in chronic obstructive pulmonary disease and asthma." *AM J RESPIR CELL MOL BIOL.* 31:216-219.
7. Lee S-H, Rhim T., Choi Y-S, Kim S-H, Cho S-Y, Paik Y-K, Park C-S. 2006. "Complement C3a and C4a increased in plasma of patients with aspirin-induced asthma." *AM J RESPIR CRIT CARE MED.* 173:370-378.
8. Hass P-J, van Strijp J., 2007. "Anaphylatoxins: Their role in bacterial infection and inflammation." *IMMUNOL RES.* 37(3):161-175.
9. Abou-Ragheb H.H.A., Williams A.J., Brown C.B., Milford-Ward A. 1992. "Plasma levels of the anaphylatoxins C3a and C4a in patients with IgA nephropathy/Henoch-Shonlein nephritis." *NEPHRON* 62:22-26.
10. Tsuruta T., Yamamoto T., Matsubara S., Nagasawa S., Tanase S., Tanaka J., Takagi K., Kambara T. 1993. "Novel function of C4a anaphylatoxin: Release from monocytes of protein which inhibits monocyte chemotaxis." *AM J PATHOL* 142(6):1848-1857.
11. Wild G., Watkins J., Milford-Ward A., Hughes P., Hume A., Rowell N.R. 1990. "C4a anaphylatoxin levels as an indicator of disease activity in systemic lupus erythematosus." *CLIN EXP IMMUNOL* 80:167-170.
12. Ingram G., Hakobyan S., Robertson N.P., Morgan B.P. 2010. "Elevated plasma C4a levels in multiple sclerosis correlate with disease activity." *J NEUROIMMUNOL.* 223:124-127.
13. Olu K., Atsumi T., Bohgaki M., Amengual O., Kataoka H., Horita T., Yasuda S., Koike T. 2009. "Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome." *ANN RHEUM DIS.* 68:1030-1035.
14. Nyakoe N.K., Taylor R.P., Makumi J.N., Waitumbi J.N. 2009. "Complement consumption in children with Plasmodium falciparum malaria." *MALARIA J.*, 8:7-15.
15. Marcheix B., Carrier M., Martel C., Cossette M., Pellerin M., Bouchard D., Perrault L.P. 2008. "Effect of pericardial blood processing on postoperative inflammation and the complement pathways." *ANN THORAC SURG.* 85:530-535.

16. Shoemaker R.C., Giclas P.C., Crowder C., House D., Glovsky M.M. 2008. "Complement split products C3a and C4a are early markers of acute lyme disease in tick bite patients in the United States." *INT ARCH ALLERGY IMMUNOL* 146:255-261.
17. Stricker R.B., Savely V.R., Motanya N.C., Giclas P.C. 2008. "Complement split products C3a and C4a in chronic lyme disease." *SCAND J IMMUNOL*. 69:64-69.
18. 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>.
19. 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*. 73:484-88.
20. Centers for Disease Control. 1987. "Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings." *MMWR*. 36 (suppl. No. 2S):001.

REF A036 – MicroVue C4a Fragment 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

PIA036001DA00 (04/19)

ORDLISTE

REF

Katalognummer



CE-mærket for overensstemmelse

EC REP

Autoriseret repræsentant i det Europæiske

LOT

Batch-code



Anvendes inden



Producent



Temperaturbegrænsning



Tilsigtet anvendelse



Konsultere brugsanvisningen e-mærkning af



Biologisk fare

IVD

Til *in vitro* diagnostisk anvendelse



Indeholder nok til 96 bestemmelser

CONT

Inghold/Indeholder

CONTROL

Prøve
