

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung des C4a-Fragments des Komplementproteins C4 in Humanseren oder -plasma

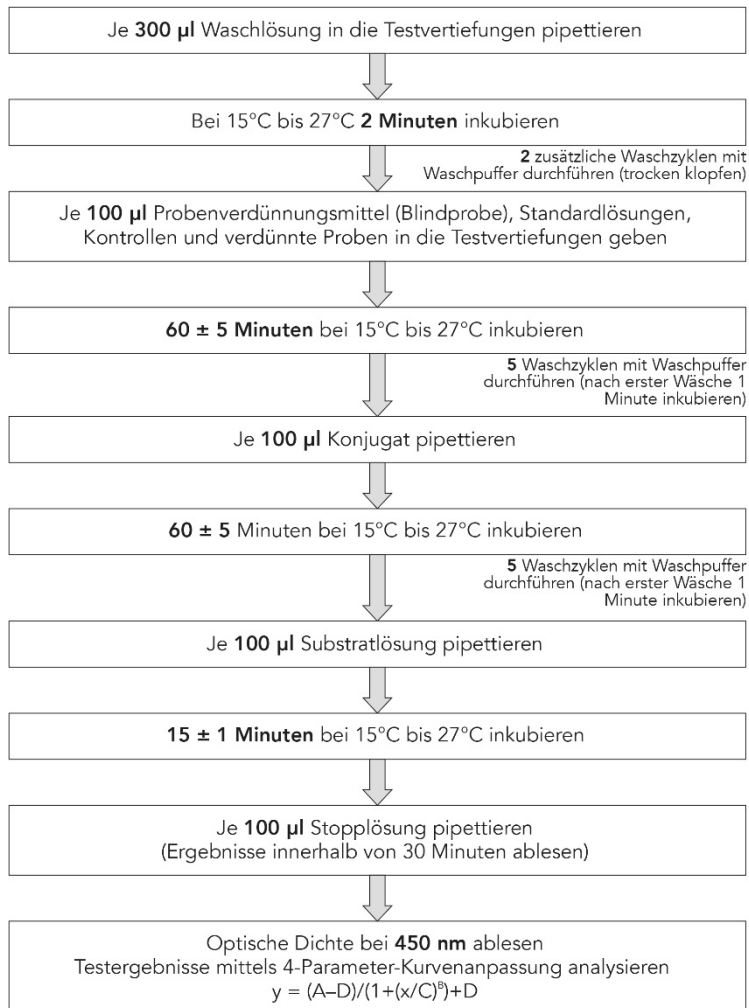
Zur *in-vitro*-diagnostischen Anwendung. Nur für die Ausfuhr. Nicht zum Verkauf oder zur Anwendung in den USA oder Kanada bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG

Reagenz, Standardlösungen, Kontrollen und Vorbereitung von Proben

- Konzentrierten Waschlösung im Verhältnis 1:20 mit entionisiertem Wasser verdünnen
- Plasmaproben im Verhältnis 1:40 mit Probenverdünnungsmittel verdünnen (z. B. 10 µl Probe + 390 µl Verdünnungsmittel)
- Serumproben im Verhältnis 1:80 mit Probenverdünnungsmittel verdünnen (z. B. 10 µl Probe + 790 µl Verdünnungsmittel)

Testverfahren





VERWENDUNGSZWECK

Das MicroVue C4a Enzymimmunoassay-Kit dient der Messung des Komplementfragments C4a, einem Aktivierungsfragment des Komplementproteins C4 in Human- und Primatenplasma oder -serum. Die Messung von C4a in Humanplasma oder -serum ergibt einen Nachweis für die Beteiligung des klassischen oder Lektin-Wegs des Komplements.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Der MicroVue C4a Enzymimmunoassay ist ein „Direct-Capture-Immunoassay“ mit 96 Vertiefungen und dient zur Messung des C4a in Human- oder Primatenserum, -plasma und anderen biologischen oder experimentellen Proben. Unter normalen Bedingungen führt die Aktivierung des klassischen oder Lektin-Komplementwegs zur Spaltung des Komplementproteins C4 in C4a und C4b durch die Protease C1s. C4a wird durch das endogene Serumenzym Carboxypeptidase N rasch in seine stabilere, weniger aktive Form C4a-des Arg gespalten. Somit ermöglicht die Quantifizierung von C4a-des Arg eine zuverlässige Messung der Komplementaktivierung des klassischen oder Lektin-Wegs in Testproben.¹⁻⁴

Der MicroVue C4a Assay stellt ein schnelles, hochspezifisches Verfahren zur quantitativen Messung der C4a-Konzentrationen bereit. Er eignet sich für Untersuchungen, die die Rolle oder den Status der Komplementaktivierung in zahlreichen Forschungsbereichen betreffen, sowie für das Monitoring der Bildung von C4a *in vivo* oder *in vitro*. C4a ist verglichen mit C3a und C5a das schwächste der Anaphylatoxine, es spielt jedoch eine Rolle bei der Erzielung von Veränderungen der Gefäßpermeabilität, der Induktion der Kontraktion glatter Muskeln und der Histaminabgabe durch Mastzellen und Basophile. Es wird angenommen, dass C4a eine Rolle bei verschiedenen Autoimmunerkrankheiten spielt, einschließlich Gelenkrheumatismus, SLE und akuter Glomerulonephritis.⁵⁻¹⁵ Es wird seit Kurzem als Marker sowohl für akute als auch für chronische Borreliose diskutiert.¹⁶⁻¹⁷

FUNKTIONSPRINZIP

Der MicroVue C4a Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von C4a in Humanplasma oder -serum ist ein Dreischrittverfahren. Zur Durchführung des Assays werden (1) eine mit einem murinen monoklonalen Antikörper beschichtete Mikroassay-Platte, der speziell an humane C4a bindet, (2) ein HRP-konjugierter monoklonaler anti-humaner C4a-Antikörper und (3) ein chromogenes Substrat eingesetzt.

In Schritt 1 werden Standardlösungen, Kontrollen und Testproben in die Mikroassay-Vertiefungen gegeben, die mit einem speziellen anti-C4a monoklonalen Antikörper beschichtet sind. In den Proben vorhandenes C4a bindet sich im Gegensatz zu C4 und anderen Komplementaktivierungsprodukten an den immobilisierten anti-C4a monoklonalen Antikörper. Nach einer Inkubationszeit wird durch einen Waschzyklus ungebundenes Material entfernt.

In Schritt 2 werden in jede Testvertiefung an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte monoklonale anti-humane C4a-Antikörper gegeben. Der enzymkonjugierte anti-humane C4a-Antikörper bindet sich an das C4a, das in den Vertiefungen des Mikroassays eingefangen wurde. Nach einer Inkubationszeit wird durch einen Waschzyklus überschüssiges Konjugat entfernt.

In Schritt 3 wird in jede Mikroassay-Vertiefung ein chromogenes Enzymsubstrat gegeben. Das gebundene HRP-Konjugat reagiert mit dem Substrat und bildet dabei eine blaue Farbe. Nach einer Inkubationszeit wird die Enzymreaktion chemisch gestoppt, was zu einer Farbänderung von Blau zu Gelb führt. Die Farbintensität wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Farbintensität der Reaktionsmischung verhält sich proportional zu der C4a-Konzentration in den Testproben, Standardlösungen und Kontrollen.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

96 Tests zur Bestimmung des C4a-Fragments des Komplementproteins C4

Das MicroVue C4a Enzymimmunoassay-Kit enthält folgende Komponenten:

A	C4a Standardlösungen	Artikelnr. 5204 – 5208	je 1,5 ml
B	Gebrauchsfertig. Enthält gereinigtes natives humanes C4a-Protein mit einer bekannten		
C	Proteinkonzentration (ng/ml), Proteinstabilisatoren		
D			
E			
L	C4a niedrige Kontrolle	Artikelnr. 5209	1,5 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält gereinigtes natives humanes C4a-Protein mit einer bekannten		
	Proteinkonzentration (ng/ml), Proteinstabilisatoren		
H	C4a hohe Kontrolle	Artikelnr. 5210	1,5 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält gereinigtes natives humanes C4a-Protein mit einer bekannten		
	Proteinkonzentration (ng/ml), Proteinstabilisatoren		
1	Mikroassay-Platte	Artikelnr. 5198	12 x 8 vertiefungen
	Streifen à 8 Vertiefungen, beschichtet mit murinem monoklonalem Antikörper speziell für humanes		
	C4a in einem wiederverschließbaren Folienbeutel		
2	Stopplösung	Artikelnr. A9947	12 ml
	Enthält 1N (4%) Salzsäure		
3	20-fach konzentrierte Waschlösung	Artikelnr. A9957	je 2, 50 ml
	Enthält phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 1,0% Tween-20® und 0,035% ProClin® 300		
4	Verdünnungsmittel für Komplementproben	Artikelnr. A3670	50 ml
	Enthält PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% Proteinstabilisatoren, 0,035% ProClin 300		
5	TMB Substrat	Artikelnr. 5059	12 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)		
6	Konjugat	Artikelnr. 5211	12 ml
	An Meerrettichperoxidase konjugierter monoklonaler anti-humaner Antikörper gegen C4a, in HRP-Stabilisatorpuffer mit Konservierungsmittel suspendiert		

Tween-20® ist eine eingetragene Marke der ICI Americas Inc.
ProClin® ist eine eingetragene Marke der Rohm and Haas Company.

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)

- Stoppuhr (über einen Bereich von 60 Minuten)
- Saubere, unbenutzte Mikroassay-Platten, Verdünnungsplatte mit 96 Vertiefungen und/oder Proberöhrchen und Ständer
- Behälter für die Verdünnung des Waschpuffers
- Waschflasche oder anderes validiertes, für Immunoassays geeignetes Waschsystem
- Mikropipetten und sterile Einwegpipettenspitzen
- Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanäle) oder Mehrfachmikropipetten
- Saubere Pipetten, 1 ml, 5 ml und 10 ml
- Reagenzienbehälter zum Hinzufügen von Konjugat, Substrat- und Stopplösung auf der Platte (für jedes Reagenz saubere, noch nicht verwendete Behälter verwenden)
- Plattenlesegerät, das A₄₅₀-Messungen im Bereich von 0,0 bis 3,0 vornehmen kann
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Zur *in-vitro*-diagnostischen.
- Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln. Bei der Arbeit mit diesem Kit und den Patientenproben die allgemein gültigen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Die Testreagenzien wie angegeben lagern.
- Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
- ProClin 300 wird als Konservierungsmittel verwendet. Der unbeabsichtigte Kontakt mit Pufferlösungen oder Reagenzien, die ProClin enthalten, bzw. deren Einnahme kann zu Reizungen der Haut, der Augen oder des Mundes führen. Die Anforderungen der guten Laborpraxis beachten, um die Exposition möglichst gering zu halten. Beim Auftreten erster Symptome einen Arzt aufsuchen.
- Die Stopplösung ist ätzend und kann Reizungen verursachen. Nicht einnehmen. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen. Im Fall einer Einnahme einen Arzt aufsuchen.
- Alle Spendereinheiten, die für die Standardlösungen und Kontrollseren dieses Produkts verwendet werden, wurden anhand einer von der FDA zugelassenen Methode auf Antikörper gegen HIV (HIV1 und HIV2), Hepatitis-C-Viren sowie HBsAg untersucht. Da keine Testmethode mit absoluter Sicherheit garantieren kann, dass keine infektiösen Substanzen vorliegen, sollten diese Reagenzien wie alle potenziell infektiösen Humanserum- oder Blutproben gemäß Biosafety Level 2 behandelt werden. Dementsprechende Empfehlungen sind im Handbuch „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ der US-Gesundheitsbehörden (Centers for Disease Control/National Institutes of Health) beschrieben.¹⁸
- Für ein zügiges und effizientes Dosieren der Reagenzien wird der Gebrauch von Mehrkanal- oder Mehrfachpipetten empfohlen.
- Um genaue Messungen zu gewährleisten, bei der Zugabe der Proben und Standardlösungen genau arbeiten. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen und nur kalibrierte Geräte verwenden.
- Für den Erhalt genauer Ergebnisse müssen die Proben fachgerecht entnommen und aufbewahrt werden (*siehe PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG*).
- Eine mikrobielle Kontamination oder Kreuzkontamination von Proben und Reagenzien ist zu vermeiden.
- Jede Probe als Doppelbestimmung messen.
- Jede Mikroassay-Vertiefung jeweils nur für einen Test verwenden.
- Wenn die Inkubationszeiten und -temperaturen bei der Testdurchführung von den Vorgaben im Abschnitt „Testverfahren“ abweichen, können falsche Ergebnisse auftreten.
- Das TMB-Substrat muss während der Lagerung und Inkubation vor Licht und Kontakt mit Metall oder Gummi geschützt werden. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen.
- Die Mikroassay-Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
- Beim Entfernen von Flüssigkeiten aus den Mikroassay-Vertiefungen den Boden der Vertiefungen nicht ankratzen oder berühren.
- Hitzeinaktivierte, hyperlipämische oder kontaminierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
- Um beim Waschen die Bildung von Aerosolen zu vermeiden, eine Vorrichtung verwenden, mit der die Waschflüssigkeit in eine Flasche mit haushaltsüblichem Bleichmittel gesaugt wird.
- Zum Waschen der Platte eine Waschflasche oder ein automatisiertes Dosiergerät verwenden (TESTVERFAHREN, Schritt 6). Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassay-Platte verwenden.
- Testverfahren in Bereichen mit angemessener Belüftung durchführen.
- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.
- Bei der Handhabung der Kitkomponenten geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.

- Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt (SDB) auf quidel.com, um weitere Informationen zu Gefahrensymbolen, Sicherheit, Handhabung und Entsorgung der Komponenten in diesem Kit zu erhalten.

LAGERUNG

Ungeöffnetes Kit bei 2°C bis 8°C aufbewahren.

ANZEICHEN FÜR INSTABILITÄTEN ODER ZERSETZUNGSVORGÄNGE DER REAGENZIEN

Eine Trübung oder Farbveränderung der verdünnten Waschlösung weist auf einen Zersetzungsvorgang des betreffenden Reagenz hin. In beiden Fällen ist die Lösung zu entsorgen.

PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG

Bei der Handhabung und der Entsorgung aller Proben die allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Alle Bearbeitungsvorgänge der Proben sollten bei 2°C bis 8°C durchgeführt werden.

Probennahme

Serum/Plasma

Aufgrund der Komplementaktivierung, die während der Gerinnung auftritt, ist die C4a-Konzentration in normalen Humanserumproben höher als die Konzentration, die bei EDTA-Plasmaproben erzielt wird. Die C4a-Werte in EDTA-Plasma entsprechen daher u. U. in höherem Maße den In-Vivo-Konzentrationen. Bei unsachgemäßer Entnahme oder Aufbewahrung von Proben kann beim C4a-Fragment Proteolyse auftreten. Bei unsachgemäß gehandhabten Proben kann C4a durch ein Artefakt einer Komplementaktivierung gebildet werden. Daher ist die fachgerechte Entnahme, Aufbewahrung und Handhabung von Proben unabdinglich.¹⁹ Für den Erhalt optimaler Plasmaergebnisse werden K2- oder K3-EDTA-Entnahmeröhrchen empfohlen.

Serum- und EDTA-Plasmaproben sind unter Verwendung eines Standardverfahrens unter keimfreien Bedingungen zu entnehmen.²⁰ Die Proben sollten umgehend getestet oder bis zur Testdurchführung für maximal vier Stunden auf Eis gelagert werden.

Wenn eine Probe nicht innerhalb von vier Stunden nach den oben angegebenen Richtlinien getestet werden kann, sollte sie bei –70°C oder niedrigeren Temperaturen eingefroren werden.

Auftauen eingefrorener Proben

Um die Dauer der Probenhandhabung so kurz wie möglich zu halten, eine Verdünnungsplatte (oder Röhrchen) vorbereiten und die erforderliche Menge an Verdünnungsmittel hinzufügen (wie unter „Probenverdünnung“ weiter unten beschrieben), bevor die Proben für den Test aufgetaut werden.

Gefrorene Proben schnell bei 37°C bis kurz nach dem Auftaupunkt auftauen. Die aufgetauten Proben sofort auf Eis legen, um Komplementaktivierung vor der Verdünnung zu vermeiden. Proben nicht länger als vier Stunden auf Eis legen. Proben nicht bei 37°C aufbewahren, da sonst Komplementaktivierung auftreten kann. Proben nicht bei Raumtemperatur oder auf Eis auftauen, da dies zu Komplementaktivierung und damit zur Beeinträchtigung der Testergebnisse führen kann. Proben sollten unmittelbar nach dem Auftauen getestet werden. Es können bis zu fünf Gefrier-/Auftauzyklen durchgeführt werden, ohne dass die Proben beeinträchtigt werden. Falls Proben zur weiteren Analyse erneut eingefroren werden müssen, empfiehlt Quidel das Einfrieren mehrerer Proben-Aliquoten, um ein Überschreiten der empfohlenen Anzahl von Gefrier-/Auftauzyklen zu vermeiden.

Probenverdünnung

VORSICHT: Alle Proben sind als potenziell infektiös zu behandeln. Allgemein übliche Vorsichtsmaßnahmen beachten. Hitzeinaktivierte, kontaminierte oder falsch gelagerte Proben dürfen nicht verwendet werden.

HINWEIS: Wichtige Hinweise zum korrekten Auftauen gefrorener Proben sind unter Auftauen gefrorener Proben zu finden. Die korrekte Handhabung der Proben ist für präzise Ergebnisse unerlässlich.

Proben **müssen** so weit verdünnt werden, dass die gemessenen Werte über der LLOQ (untere Qualifikationsgrenze) liegen und die ULOQ (obere Qualifikationsgrenze) nicht übersteigen. Proben, deren Werte außerhalb dieses Bereichs liegen, müssen in einem anderen Verdünnungsverhältnis neu getestet werden.

Alle Proben mit Verdünnungsmittel auf ein geeignetes Verhältnis verdünnen (siehe folgender Abschnitt). Vorsichtig mischen, dabei die Bildung von Schaum und Blasen vermeiden. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden.

Plasma

Es wird empfohlen, Plasmaproben mit dem Probenverdünnungsmittel im Verhältnis von 1:40 zu verdünnen. Die Verdünnung ist wie folgt durchzuführen:

10 µl Probe + 390 µl Probenverdünnungsmittel

Serum

Es wird empfohlen, Serumproben mit dem Probenverdünnungsmittel im Verhältnis von 1:80 zu verdünnen. Die Verdünnung ist wie folgt durchzuführen:

10 µl Probe + 790 µl Probenverdünnungsmittel

Proben mit einem hohen Grad an Komplementaktivierung müssen u. U. stärker verdünnt werden, als oben angegeben.

Hinzufügen verdünnter Proben in die Mikrotiter-Vertiefungen

Die Zugabe der verdünnten Proben in die Mikrotiter-Vertiefungen muss innerhalb von 15 Minuten nach der Anwendung der ersten Probe abgeschlossen sein.

Eine der beiden folgenden Methoden kann für die Zugabe der verdünnten Proben, Standardlösungen, Kontrollen und Puffer in die Vertiefungen verwendet werden (siehe Schritt 4 des *TESTVERFAHRENS*). In Testläufen, bei denen nur wenige Proben getestet werden, können die verdünnten Proben und anderen Reagenzien mit einer Mikropipette direkt in die zugeteilten Vertiefungen (100 µl/Vertiefung) zugegeben werden. Bei kleinen oder großen Testläufen, jedoch v. a. bei größeren Testläufen, empfiehlt Quidel die Verwendung der „Replica-Plating“-Methode, die weiter unten beschrieben ist, um die Standardlösungen, Kontrollen und verdünnten Proben so schnell wie möglich in die Mikroassay-Vertiefungen zu bekommen.

Mithilfe von Mehrkanalpipetten 120 µl bis 130 µl jeder Lösung in die einzelnen Vertiefungen auf einer unbeschichteten Mikrotiterplatte (nicht im Lieferumfang enthalten) entsprechend dem gewünschten EIA-Endmuster geben. Nachdem alle zu testenden Lösungen in die Mikroassay-Vertiefungen der unbeschichteten Platte gegeben wurden, zügig 100 µl von jeder unbeschichteten Vertiefung in die antikörperbeschichteten Vertiefungen mithilfe einer Mehrkanalpipette transferieren. Um die Möglichkeit einer Kreuzkontamination zu vermeiden, müssen die Pipettenspitzen jedes Mal gewechselt werden, wenn sich die Zusammensetzung der transferierten Proben verändert.

Diese „Replica-Plating“-Methode ist auch für die Zugabe von Konjugat, Substrat und Stopplösung geeignet.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien und Materialien vor der Verwendung auf 15°C bis 27°C bringen.

Nach der Entnahme der erforderlichen Reagenzien und Materialien die nicht benötigten Komponenten wieder auf die entsprechende Lagertemperatur bringen (*siehe LAGERUNG*).

Mikroassay-Teststreifen

Die für den Test erforderliche Anzahl von Teststreifen bestimmen. Quidel empfiehlt, Blindvertiefungen, Standardlösungen und Kontrollen in Doppelbestimmung zu testen. Die nicht benötigten Teststreifen entfernen und in den Aufbewahrungsbeutel legen. Den Beutel wieder verschließen und wieder auf 2°C bis 8°C bringen. Die im Test verwendeten Teststreifen im Testplattenrahmen befestigen.

Waschlösung

Die 20-fach konzentrierte Waschlösung durch mehrfaches Umdrehen der Flasche mischen. Wenn die 20-fach konzentrierte Waschlösung bei 2°C bis 8°C gelagert wurde, haben sich u. U. Kristalle gebildet. Zum Auflösen dieser Kristalle die Flasche in einem 37°C bis 50°C warmen Wasserbad erwärmen, bis sich alle Kristalle aufgelöst haben, und anschließend sorgfältig mischen. Die Waschlösung vorbereiten, indem der gesamte Inhalt einer Flasche mit 20-fach konzentrierter Waschlösung mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf bis 1 Liter verdünnt wird. Gründlich mischen. Die Waschlösung ist bei Aufbewahrung in einem sauberen Behälter bei 2°C bis 8°C für 30 Tage haltbar. Das Reagenz beim Auftreten von Verfärbungen oder Trübungen entsorgen.

Standardlösungen und Kontrollen

Standardlösungen und Kontrollen werden gebrauchsfertig geliefert und müssen vor der Verwendung nicht verdünnt oder zubereitet werden.

TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

Siehe hierzu WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN und VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.

1. Die Positionen der Mikroassay-Vertiefungen entsprechend zu den Blindvertiefungen, alle Proben, Standardlösungen und Kontrollen sowie die auf den Flaschenetiketten angegebenen Chargennummern schriftlich festhalten. Die Ausrichtung der Mikroassay-Platte durch die Markierung einer Plattenecke kennzeichnen.
2. Die Mikroassay-Teststreifen wie folgt vorbereiten:
 - a. Die Mikroassay-Vertiefungen rehydrieren, indem mit einer Waschflasche oder einem automatisierten Dosiergerät ca. 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung gegeben wird.
 - b. Zwei Minuten bei 15°C bis 27°C inkubieren.
 - c. Die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen.
 - d. In jede Vertiefung ca. 300 µl Waschlösung geben.
 - e. Die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen.
 - f. Die Schritte d-e noch einmal wiederholen, insgesamt drei Waschschr**itte durchführen.
 - g. Die Platte umdrehen und zweimal kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeit zu entfernen.
3. Eine oder mehrere Vertiefungen als Blindvertiefungen auswählen. 100 µl des Probenverdünnungsmittels in die Vertiefung(en) geben, die zur Bestimmung des Nullwertes des Plattenlesegeräts verwendet werden sollen.
4. Je 100 µl Standardlösung, Kontrollen oder verdünnte Proben in die zugeteilten Doppelvertiefungen geben. Die gesamte Platte muss innerhalb von 15 Minuten nach dem Laden der ersten Probe auf die Platte beladen werden.

5. 60 ± 5 Minuten bei 15°C bis 27°C inkubieren.
6. Die Mikroassay-Vertiefungen insgesamt 5 Mal unter Verwendung der folgenden Methode waschen:
 - a. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
 - b. Mit einer Waschflasche oder einem automatisierten Plattenwaschgerät ca. $300\ \mu\text{l}$ Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - c. Die Vertiefungen 1 Minute bei 15°C bis 27°C inkubieren.
 - d. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
 - e. Die Platte umdrehen und kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeit zu entfernen.
 - f. In jede Vertiefung ca. $300\ \mu\text{l}$ Waschlösung geben.
 - g. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
 - h. Zwischen jedem Waschvorgang die Platte umdrehen und kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeit zu entfernen.
 - i. **Die Schritte f-h noch Vier Zeitenwiederholen, insgesamt Fünf Waschschriffe durchführen.**
 - j. Nach dem fünften Waschzyklus die Platte umdrehen und kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeit zu entfernen.
7. Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette jeweils $100\ \mu\text{l}$ eines C4a-Konjugats in jede gewaschene Testvertiefung geben, auch in die Blindvertiefung(en).
8. Die Mikroassay-Teststreifen 60 ± 5 Minuten bei 15°C bis 27°C inkubieren.
9. Die Mikroassay-Vertiefungen nach der 60-minütigen Inkubation (Schritt 8) wie unter *TESTVERFAHREN* in Schritt 6 beschrieben waschen.
10. Unmittelbar nach dem Waschverfahren $100\ \mu\text{l}$ der TMB-Substratlösung in jede Vertiefung geben, auch in die Blindvertiefung(en).
11. Die Mikroassay-Teststreifen 15 ± 1 Minuten bei 15°C bis 27°C inkubieren.
12. In jede Vertiefung $100\ \mu\text{l}$ Stopplösung geben, um die enzymatische Reaktion zu stoppen. Die Stopplösung sollte in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Substratlösung in die Vertiefungen gegeben werden.
13. Die Platte vorsichtig oben antippen, damit sich die Farbentwicklung gleichmäßig und vollständig verteilt. **HINWEIS: Optimale Ergebnisse werden durch die Anwendung der automatischen Mischfunktion des Plattenlesegeräts (falls vorhanden) direkt vor dem Ablesen der Mikroassay-Platte erreicht.**
14. Innerhalb von 30 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung (Schritt 12) die Extinktion der Testvertiefungen bei $450\ \text{nm}$ bestimmen und mithilfe des verwendeten Spektrophotometrie-Systems eine Blindwertkorrektur vornehmen.
15. Die Konzentration der Proben und Kontrollen anhand der Standardkurve bestimmen.
16. Die übrigen verdünnten Proben, Substrate und die verwendeten Mikroassay-Teststreifen entsorgen (*siehe WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*).

QUALITÄTSKONTROLLE

Das diesem Kit beiliegende Analysezertifikat ist chargenspezifisch und soll sicherstellen, dass die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse denen der Quidel Corporation entsprechen. Die angegebenen Extinktionswerte sollen lediglich als Richtwerte dienen. Die von Ihrem Labor erhaltenen Ergebnisse können davon abweichen.

Die zu verwendenden Qualitätskontrollbereiche sind angegeben. Die Kontrollwerte dienen zur Verifizierung der Gültigkeit der Kurven- und Probenergebnisse. Jedes Labor sollte eigene Kriterien für akzeptable Testgrenzwerte festlegen. Wenn die Kontrollwerte NICHT innerhalb des Akzeptanzbereichs Ihres Labors liegen, sollten die Testergebnisse infrage gestellt und die Proben erneut getestet werden.

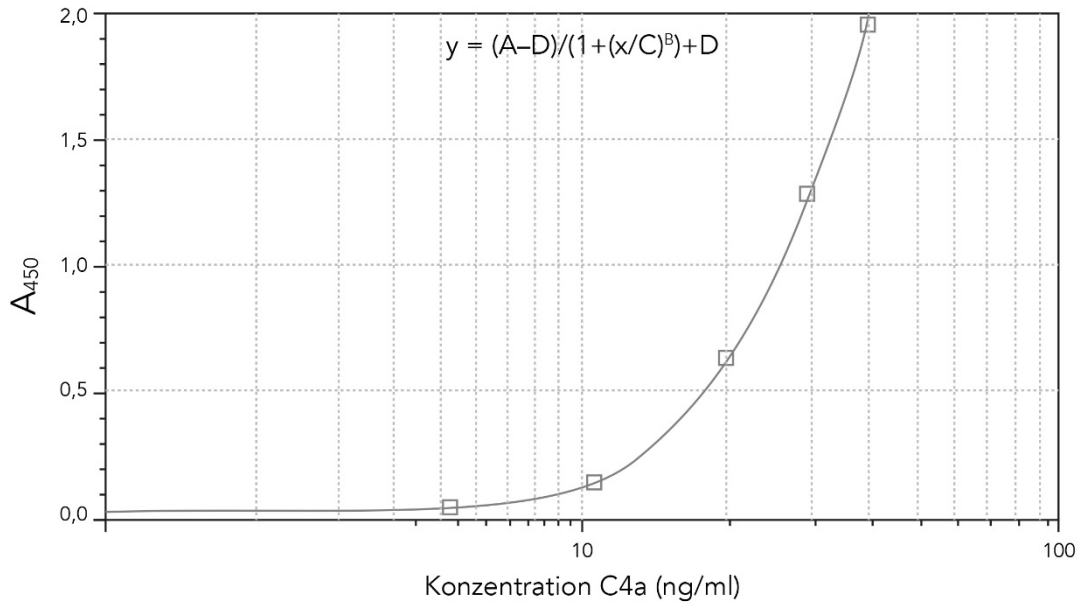
AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Verwendung der Standardkurve: Die Standardkurve des C4a EIA wird mit den Blindwert-korrigierten A_{450} -Werten der verschiedenen Standardlösungen (auf der y-Achse) und der bekannten Konzentration der C4a-Standardlösungen (auf der x Achse) erstellt. Nach der 4-Parameter-Regression muss die erstellte

Standardkurve die Validierungsanforderungen erfüllen (siehe unten). Diese Berechnungen können mit den meisten Plattenlese-Softwareprogrammen und Computern durchgeführt werden.

Alternativ dazu können die Daten manuell in Diagramme eingetragen und die Werte (ng/ml) der Proben direkt in der Regressionsgeraden der Standardkurve abgelesen werden. Ein Beispiel einer typischen Standardkurve ist in Abbildung 1 dargestellt.

Abbildung 1
Typische Standardkurve



Probe	A ₄₅₀	ng/ml
Standardlösung A	0,05	5,19
Standardlösung B	0,179	10,51
Standardlösung C	0,657	20,29
Standardlösung D	1,301	29,57
Standardlösung E	1,956	40,34

Berechnung der tatsächlichen C4a-Konzentration in Proben

Die in einer unverdünnten Probe vorliegende C4a-Konzentration wird berechnet, indem die C4a-Konzentration in ng/ml, die von der Standardkurve des Kits ermittelt wurde, mit dem Reziprokwert des für die Probe verwendeten Verdünnungsfaktors multipliziert wird.

Wenn die A₄₅₀-Werte für eine bestimmte Probe größer sind als die höchsten Werte der Standardlösung (E), dann müssen die Ergebnisse als „größer als“ die C4a-Konzentration der höchsten Werte der Standardlösung (E) multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor angegeben werden. Wenn ein präziserer Wert der C4a-Konzentration erforderlich ist, sollte die Probe mit einem höheren Verdünnungsfaktor erneut getestet werden. Bei allen Testwiederholungen müssen auch die C4a-Standardlösungen und Kontrollen gemessen werden.

VALIDIERUNG

korrelationskoeffizient (r): ≥ 0,98
blindprobe: ≤ 0,150

Die durchschnittlichen zulässigen C4a-Konzentrationsbereiche für die hohen und niedrigen Kontrollen sind auf den Flaschenetiketten der Produkte C und A angegeben.

GRENZEN DER METHODE

Der MicroVue C4a Enzymimmunoassay wurde zum Testen von Proben eingesetzt, die als Serum oder Plasma in K2- oder K3-EDTA vorlagen. Es wird nicht empfohlen, Zitratplasma oder Heparinplasma im MicroVue C4a Test zu verwenden, da diese falsche Ergebnisse liefern. Andere Antikoagulanzen wurden nicht untersucht.

PROBENWERTE

EDTA-Plasma- und Serumproben von 32 bzw. 44 normalen Spendern wurden mit dem MicroVue C4a Enzymimmunoassay-Kit getestet. Die Ergebnisse sind im Folgenden aufgeführt.

Probe	n	Mittelwert (ng/mL)	Bereich (ng/mL)
Plasma EDTA	32	1694,65	383,50 bis 8168,17
Sérum	44	1098	20,92 bis 4437,24

HINWEIS: Die durchschnittliche Abweichung und die Standardabweichung (SD) der C4a-Fragment-Konzentrationen, die in Plasma- oder Serumproben gemessen werden, können von Labor zu Labor variieren. Daher wird empfohlen, dass jedes Labor eigene Durchschnittswerte für die C4a-Fragment-Konzentration und die Standardabweichung für Proben festlegt.

LEISTUNGSMERKMALE DES TESTS

Grenzen

Nachweisgrenze: Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) für das C4a EIA liegt bei 0.29 ng/ml. Sie wurde im Rahmen einer Nullstandardstudie am oberen Grenzwert der 3-fachen Standardabweichung festgelegt.

Untere Quantifikationsgrenze: Die untere Quantifikationsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLOQ) für das C4a EIA liegt bei 5,0 ng/ml, der niedrigsten Konzentration der Standardkurve, die den CLSI-Kriterien für Genauigkeit und Präzision noch gerecht wird.

Obere Quantifikationsgrenze: Die obere Quantifikationsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULOQ) für das C4a EIA liegt bei 61 ng/ml, der höchsten Konzentration, die den CLSI-Kriterien für Genauigkeit und Präzision noch gerecht wird.

Störsubstanzen

Die folgenden Substanzen wurden im C4a EIA getestet. Sie stellen keine Störung für den Test mit Plasma oder Serum dar:

Substanz	Konzentration
Bilirubin	40 mg/dl
Hämoglobin	200 mg/dl
Triglyzerid	3000 mg/dl
Glukose	1000 mg/dl
Cholesterol	500 mg/dl
Albumin	6000 mg/dl
Gammaglobulin	6000 mg/dl
EDTA	10 mM
Heparin	3 U/ml

Präzision

Die Intra- und Inter-Assay-Präzision wurde durch den Test von 20 Replikaten von 1 Plasmaprobe und 1 Serumprobe in 10 verschiedenen Testserien ermittelt.

Probe	C4a (ng/ml)	Intra-Assay ¹ C.V. (%)	Inter-Assay ² C.V. (%)
EDTA Plasma	833,9	3,7%	4,4%
Serum	1941,5	4,3%	4,0%

¹n = 20 replikate ²n = 10 testserien

Linearität

Die Linearität wurde ermittelt, indem Proben mit Probenverdünnungsmittel verdünnt und die gemessenen Werte mit den erwarteten Werten verglichen wurden. Typische Ergebnisse sind im Folgenden aufgeführt.

Probe	Verdünnungsfaktor	Gefundenes C4a (ng/ml) ³	Erwartetes C4a (ng/ml) ³	Wiederfindung (%)
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%

³Verdünnungsfaktor nicht einbezogen.

Wiederfindungsrate aufgestockter Proben

Die Wiederfindungsrate aufgestockter Proben wurde ermittelt, indem Proben mit einer bekannten Menge von gereinigtem C4a aufgestockt und die gefundenen Werte mit den erwarteten Werten verglichen wurden.

Probe	C4a (ng/mL)	Aufstockung (ng/ml)	Ergebnis (ng/ml)	Wiederfindung (%)
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%

KUNDENDIENST

Auskünfte über das Serviceangebot außerhalb der USA erhalten Sie von Ihrer Vertretung vor Ort. Weitere Informationen zu Quidel, unseren Produkten und Vertretungen finden Sie auf unserer Website unter quidel.com.

LITERATURVERWEISE

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

PIA036001DE00 (04/19)

GLOSSAR

REF

Katalog-Nr.



CE-Konformitätskennzeichnung

EC REP

Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft

LOT

Chargencode



Verwenden bis



Hersteller



Temperaturbegrenzung



Verwendungszweck



Consult E-Beschriftung
Gebrauchsanweisung beachten



Biogefährdung

IVD

Zur *In-vitro*-Diagnostik



Inhalt ist ausreichend für 96 Bestimmungen

CONT

Inhalt/Enthält

CONTROL

Kontrolle
