

**Dosage enzymatique quantitatif du fragment C4a du complément C4 dans le sérum humain ou le plasma humain**

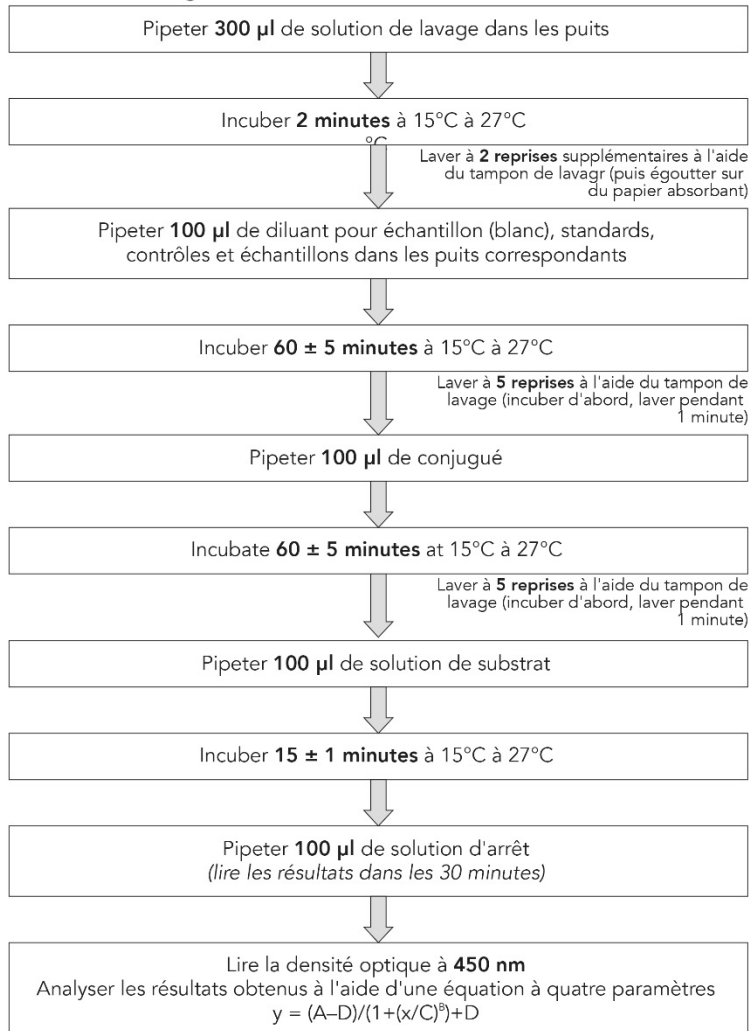
À des fins de diagnostic *in vitro* uniquement. Réservé à l'export. Non destiné à la vente aux États-Unis ou au Canada.

## RÉSUMÉ

### Préparation des réactifs, des standards, des contrôles et des échantillons

- Diluer la solution concentrée de tampon de lavage 1:20 avec de l'eau distillée
- Diluer les échantillons de plasma 1:40 avec du diluant pour échantillon (par ex. : 10 µl d'échantillon + 390 µl de diluant)
- Diluer les échantillons de sérum 1:80 avec du diluant pour échantillon (par ex. : 10 µl d'échantillon + 790 µl de diluant)

### Protocole de dosage





## INTÉRÊT DU DOSAGE

Le kit de dosage ELISA MicroVue C4a permet de doser le taux de fragment de complément C4a, un fragment d'activation du complément, C4 dans le plasma ou le sérum humain et de primates. La mesure de C4a dans le plasma ou le sérum humain fournit la preuve de l'implication de la voie classique ou de la voie de la lectine du complément.

## RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le dosage EIA MicroVue C4 a est un dosage direct sur microplaque à 96 puits, qui permet la mesure du C4a dans le sérum et le plasma humain ou de primates, ainsi que dans d'autres échantillons biologiques ou expérimentaux. Dans des conditions normales, l'activation du complément par la voie classique ou par la voie de la lectine se traduit par la division du complément, C4 en C4a et C4b par la protéase, C1s. C4a est rapidement divisé en sa forme plus stable, moins active, le C4a-des Arg, par le sérum enzymatique endogène carboxypeptidase N. En conséquence, la quantité mesurable de C4a-des Arg doit fournir une mesure fiable de l'activation de la voie classique ou de la voie de la lectine du complément qui s'est produite dans les échantillons de test.<sup>1-4</sup>

Le dosage MicroVue C4a, une procédure de mesure rapide, très spécifique et quantitative des taux de C4a, a été développé pour permettre l'étude du rôle ou du statut de l'activation par la voie du complément dans de nombreux projets de recherche et pour suivre la formation du C4a *in vivo* ou *in vitro*. Le C4a est la plus faible des anaphylatoxines, par comparaison aux C3a et C5a. Toutefois, il joue un rôle dans le déclenchement de modifications de perméabilité vasculaire, l'induction d'une contraction des muscles lisses et la libération d'histamine des mastocytes et basophiles. Le C4a est supposé jouer un rôle dans plusieurs maladies auto-immunes, notamment la polyarthrite rhumatoïde, le LES et la glomérulonéphrite aiguë.<sup>5-15</sup> Il a récemment été impliqué comme marqueur pour les formes aiguë et chronique de la maladie de Lyme.<sup>16-17</sup>

## PRINCIPE DU DOSAGE

Le dosage ELISA MicroVue C4a quantitatif du C4a dans le plasma ou le sérum humain est un dosage en trois étapes qui utilise (1) une microplaque recouverte d'un anticorps monoclonal de souris qui fixe spécifiquement le C4a humain, (2) un anticorps monoclonal anti-C4a humain conjugué à de l'HRP, et (3) un substrat chromogénique.

Lors de l'Étape 1, standards, contrôles et échantillons sont ajoutés dans les puits préalablement recouverts d'un anticorps monoclonal anti-C4a. Le C4a, mais pas le C4 ou d'autres produits d'activation du complément, présent dans les échantillons fixe l'anticorps monoclonal anti-C4a immobilisé. Après incubation, un lavage permet d'éliminer ce qui n'a pas été lié.

Lors de l'Étape 2, l'anticorps monoclonal anti-C4a humain conjugué à l'HRP est ajouté dans tous les puits. L'anticorps anti-C4a humain conjugué à l'enzyme se lie sur le C4a capturé dans les puits. Après incubation, un lavage permet d'éliminer le conjugué en excès non lié.

Lors de l'Étape 3, un substrat enzymatique chromogène est ajouté dans tous les puits. L'HRP lié au conjugué réagit avec le substrat pour former une couleur bleue. Après incubation, la réaction enzymatique est stoppée chimiquement, la couleur vire au jaune et l'intensité de la couleur est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de C4a présente dans les échantillons, les standards et les contrôles

## RÉACTIFS ET MATÉRIELS FOURNIS

### 96 puits pour le dosage du fragment C4a du complément C4

Le kit de dosage EIA MicroVue C4a contient les éléments suivants:

- |  |   |                           |
|--|---|---------------------------|
| <b>A Standards C4a</b>                     | <b>Réf. 5204 – 5208</b>   | <b>1 flacon de 1,5 ml</b> |
| <b>B</b>                                   | Prêt à l'emploi. Chaque flacon contient une concentration connue en protéine C4a humaine native purifiée (ng/ml) et des stabilisants protéiques                         |                           |
| <b>C</b>                                   |   |                           |
| <b>D</b>                                   |   |                           |
| <b>E</b>                                   |   |                           |
| <b>L Contrôle faible de C4a</b>            | <b>Réf. 5209</b>  | <b>1,5 ml</b>             |
|  | Prêt à l'emploi. Contient une concentration connue en protéine C4a humaine native purifiée (ng/ml) et des stabilisants protéiques                                       |                           |
| <b>H Contrôle fort de C4a</b>              | <b>Réf. 5210</b>  | <b>1,5 ml</b>             |
|  | Prêt à l'emploi. Contient une concentration connue en protéine C4a humaine native purifiée (ng/ml) et des stabilisants protéiques                                       |                           |
| <b>① Microplaque</b>                       | <b>Réf. 5198</b>  | <b>12 x 8 puits</b>       |
|  | 8 puits recouverts d'un anticorps monoclonal murin spécifique pour le C4a humain dans un sachet d'aluminium re-scellable  |                           |
| <b>② Solution d'arrêt</b>                  | <b>Réf. A9947</b>   | <b>12 ml</b>              |
|  | Contient de l'acide chlorhydrique 1N (4%)   |                           |
| <b>③ Solution de lavage concentrée 20X</b> | <b>Réf. A9957</b>   | <b>2x50ml</b>             |
|  | Contient du tampon phosphate (PBS), 1,0% Tween-20® et 0,035% ProClin® 300   |                           |
| <b>④ Diluant pour échantillon</b>          | <b>Réf. A3760</b>   | <b>50ml</b>               |
|  | Contient du PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% de stabilisants protéiques, 0,035% ProClin 300  |                           |
| <b>⑤ Substrat TMB</b>                      | <b>Réf. 5059</b>  | <b>12ml</b>               |
|  | Prêt à l'emploi. Contient du 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )  |                           |
| <b>⑥ Conjugué</b>                          | <b>Réf. 5211</b>  | <b>12ml</b>               |
|  | Contient un conjugué de peroxydase de raifort et d'anticorps monoclonal anti-C4a humain en suspension dans un tampon stabilisateur de HRP avec un agent de conservation |                           |

Tween-20® est une marque déposée de ICI Americas Inc.

ProClin® est une marque déposée de Rohm and Haas Company

## MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Minuteur (60 minutes)
- Plaques à usage unique, plaque de dilution à 96 puits et/ou tubes à essais et portoirs
- Récipient pour la dilution de tampon de lavage
- Bouteille de lavage ou tout autre équipement de lavage homologué
- Micropipettes et embouts
- Multipette ajustable (8 ou 12 canaux) ou pipetteur automatique
- Pipettes de 1 ml, 5 ml et 10 ml
- Réservoirs de réactif pour ajouter des solutions de conjugué, de substrat et d'arrêt à la plaque (utiliser des réservoirs vides et propres pour chaque réactif)
- Lecteur de plaques pouvant effectuer des lectures à A<sub>450</sub> comprises entre 0,0 et 3,0
- Eau désionisée ou distillée

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- À des fins de diagnostic *in vitro* uniquement.
- Traiter tous les échantillons comme des produits potentiellement dangereux. Suivre les précautions standard lors de la manipulation de cette trousse et des échantillons de patients.
- Utiliser ensemble tous les réactifs avant la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de la boîte.
- Suivre les recommandations pour la conservation des réactifs.
- Ne pas utiliser les barrettes de puits si leur emballage est abîmé.
- Le ProClin 300 est un conservateur. Tout contact ou ingestion accidentel de tampons ou de réactifs contenant du ProClin peut entraîner une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire pour réduire l'exposition. Consulter un médecin si des symptômes sont observés.
- La solution d'Arrêt est une solution corrosive susceptible de provoquer des irritations. Ne pas ingérer. Éviter tout contact avec les yeux, la peau et les vêtements. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.
- Chaque prélèvement utilisé dans la préparation des standards et des contrôles de ce kit provient d'un donneur individuel, et a subi à l'aide d'une méthode approuvée par la FDA un dépistage négatif pour HIV1, HIV2, HCV et HBsAG. Mais ces réactifs doivent cependant être manipulés comme des produits potentiellement infectieux, car aucun test ne peut garantir l'absence totale de ces agents infectieux. <sup>18</sup>
- L'utilisation de multipettes ou de pipetteurs automatiques est recommandée pour limiter le temps de distribution des réactifs.
- Pour obtenir une mesure précise des échantillons, pipeter avec précautions les échantillons et les standards en utilisant du matériel calibré.
- Pour obtenir des résultats précis, il est indispensable de recueillir et de conserver correctement les échantillons (*se reporter au paragraphe « RECUEIL ET PREPARATION DES ÉCHANTILLONS »*).
- Éviter toute contamination microbienne ou croisée des échantillons et des réactifs.
- Doser chaque échantillon en double.
- Ne pas utiliser un même puits pour plusieurs tests.
- Toute modification du temps ou de la température d'incubation indiqués dans le protocole de dosage peut entraîner des résultats erronés.
- Le substrat TMB doit être protégé de la lumière et de tout contact avec du métal ou du caoutchouc pendant le stockage et l'incubation. Éviter tout contact avec les yeux, la peau et les vêtements. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau.
- Ne pas laisser les puits sécher pendant le dosage.
- Lors de l'addition ou de l'aspiration des liquides dans les puits, ne pas gratter ni toucher le fond des puits.
- Des échantillons inactivés par la chaleur, lipidiques ou contaminés peuvent donner des résultats erronés.
- Pour éviter la formation d'aérosol pendant le lavage, aspirer le liquide de lavage dans une bouteille contenant de l'eau de javel.
- On utilisera une bouteille de lavage ou un système de remplissage automatique pour laver les microplaques (voir le *PROTOCOLE DE DOSAGE*, étape 6). Ne pas utiliser de multipette pour le lavage de la microplaque.
- Le test doit être effectué dans une zone suffisamment ventilée.
- Éliminer les contenants et les contenus non utilisés conformément aux exigences fédérales, nationales et réglementations réglementaires locales.
- Porter des gants et des lunettes de protection, et suivre les bonnes pratiques de laboratoire en manipulant cette trousse.
- Lavez-vous soigneusement les mains après manipulation.
- Pour en savoir plus sur les symboles de danger, la sécurité, la manipulation et l'élimination des composants de ce kit, veuillez vous référer à la Fiche de données de sécurité (FDS) que vous trouverez sur [quidel.com](http://quidel.com).

## CONSERVATION

Conserver le kit à 2°C à 8°C avant l'ouverture.

## INDICATIONS D'INSTABILITÉ OU DE DÉTÉRIORATION DES RÉACTIFS

Éliminer la solution de lavage en cas d'apparition de trouble ou de décoloration.

## RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

**Manipuler et éliminer les échantillons selon les précautions standard.**

**Toutes les manipulations d'échantillons doivent être faites à 2°C à 8°C.**

### Recueil des échantillons

#### *Sérum/plasma*

En raison de l'activation du complément au cours de la coagulation, la concentration en C4a dans des échantillons de sérum humain normaux est supérieure à celle obtenue avec des échantillons de plasma prélevés sur EDTA. On peut donc considérer que les taux de C4a obtenus sur plasma EDTA sont plus représentatifs des taux observés *in vivo*.

Le fragment C4a est susceptible à la protéolyse dans des échantillons incorrectement recueillis ou conservés et le C4a peut être généré dans des échantillons incorrectement manipulés sous l'effet d'une activation artéfactuelle du complément. En conséquence, le recueil, la conservation et la manipulation corrects d'échantillons sont essentiels<sup>19</sup>. Pour obtenir des résultats optimaux avec du plasma, l'utilisation de tubes de prélèvement EDTA K2 ou K3 est recommandée.

On prélèvera les échantillons de sérum ou de plasma EDTA de façon aseptique, selon les techniques standard<sup>20</sup>. Doser immédiatement les échantillons ou bien les conserver sur de la glace (4 heures maximum) jusqu'au dosage.

Si l'échantillon ne peut être testé dans les 4 heures comme décrit précédemment, le congeler à -70°C.

### Décongélation des échantillons

Pour minimiser la durée de manipulation des échantillons, préparer une plaque de dilution (ou des tubes à essais) et ajouter le volume approprié de diluant (comme décrit dans la section Dilution des échantillons ci-après) avant de décongeler des échantillons à des fins d'évaluation.

Décongeler rapidement les échantillons congelés à 37°C. Placer immédiatement les échantillons tout juste décongelés sur de la glace afin d'empêcher l'activation du complément avant de faire la dilution. Ne pas laisser les échantillons sur de la glace pendant plus de quatre heures. Ne pas laisser les échantillons à 37°C, au risque d'observer une activation du complément. Ne pas décongeler les échantillons à température ambiante ou sur la glace, ce qui pourrait entraîner une activation du complément et modifier les résultats. Doser aussitôt que possible les échantillons après leur décongélation. Ne pas effectuer plus de cinq cycles de congélation/décongélation. S'il est nécessaire de recongeler des échantillons pour une analyse ultérieure, Quidel recommande de préparer plusieurs aliquotes, afin d'éviter les cycles de congélation/décongélation.

### Dilution des échantillons

**ATTENTION: Traiter tous les échantillons comme potentiellement infectieux. Suivre les précautions standard. Ne pas utiliser des échantillons activés par la chaleur, contaminés ou mal conservés.**

**REMARQUE: Se reporter au paragraphe Décongélation des échantillons pour savoir comment bien décongeler les échantillons. Une bonne manipulation des échantillons est essentielle à l'obtention de résultats fiables.**

Les échantillons **doivent** être dilués de telle sorte que les valeurs observées soient supérieures à la PPQM et ne soient pas supérieures à la PGQM. Des échantillons dont les valeurs se trouvent en dehors de cette fourchette doivent être redosés avec une autre dilution.

Préparer une dilution appropriée (*voir la section suivante*) de chacun des échantillons à l'aide du diluant pour échantillon. Mélanger délicatement chaque dilution pour éviter la formation de mousse ou de bulles. Ne pas conserver ou réutiliser les échantillons dilués.

### *Plasma*

La dilution recommandée d'échantillons de plasma dans du diluant pour échantillon est de 1:40. Effectuer la dilution comme suit:

*10 µl d'échantillon + 390 µl de diluant pour échantillon*

### *Sérum*

La dilution recommandée d'échantillons de sérum dans du diluant pour échantillon est de 1:80. Effectuer la dilution comme suit:

*10 µl d'échantillon + 790 µl de diluant pour échantillon*

Les échantillons présentant des taux élevés d'activation du complément peuvent nécessiter des dilutions d'échantillon supérieures aux indications ci-dessus.

## Addition des échantillons dilués dans les puits

**Cette opération doit durer moins de 15 minutes.**

L'une des deux méthodes suivantes pourra être utilisée pour l'addition des échantillons dilués, des standards, des contrôles et du tampon dans les puits (voir l'étape 4 du *PROTOCOLE DE DOSAGE*). Pour doser quelques échantillons, les échantillons dilués et les autres réactifs peuvent être ajoutés directement dans les puits correspondants à l'aide d'une micropipette (100 µl/puits). Pour des séries, en particulier si le nombre d'échantillons est important, Quidel recommande d'utiliser une deuxième microplaque, comme décrit ci-dessous, pour ajouter les standards, les contrôles et les échantillons dilués aussi vite que possible dans les puits.

Utiliser une multipette pour ajouter 120 µl à 130 µl de chaque solution dans les puits d'une plaque vierge (non fournie) en respectant le même ordre que la microplaque du kit. Lorsque tous les échantillons à tester ont été ajoutés dans les puits de la plaque vierge, transférer rapidement, à l'aide d'une multipette, 100 µl de chaque puits de cette plaque vierge vers les puits recouverts d'anticorps. Afin d'éviter toute contamination croisée, les embouts de la multipette devront être changés à chaque nouvelle série d'échantillons.

**Cette technique de deuxième plaque peut également être utilisée pour ajouter le conjugué, le substrat et la solution d'arrêt.**

## PRÉPARATION DES RÉACTIFS

**Amener tous les réactifs à 15°C à 27°C avant usage.**

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

## Barrettes de puits

Déterminer le nombre de barrettes nécessaires pour le dosage. Quidel recommande de doser en double les blancs, les standards et les contrôles. Refermer avec soin la pochette contenant le reste des barrettes et la conserver à 2°C à 8°C. Placer les barrettes destinées au dosage sur le support.

## Solution de lavage

Mélanger la solution de lavage concentrée 20X en inversant à plusieurs reprises le flacon. Si la solution de lavage concentrée a été conservée à 2°C à 8°C, on peut observer la formation de cristaux. Pour dissoudre ces cristaux, réchauffer le flacon dans un bain-marie à 37°C à 50°C jusqu'à dissolution, et mélanger soigneusement. Préparer la solution de lavage en diluant le contenu d'un des flacons de solution de lavage concentrée 20X dans de l'eau distillée ou désionisée, afin d'obtenir un volume final de 1 litre. Bien mélanger. La solution de lavage est stable 30 jours à 2°C à 8°C. Éliminer le réactif en cas d'apparition de trouble ou de décoloration.

## Standards et contrôles

Les standards et contrôles sont livrés prêts à l'usage et ne nécessitent ni dilution ni préparation avant usage.

## PROTOCOLE DE DOSAGE

**Lire le protocole en entier avant de commencer le dosage.**

*Voir les paragraphes ATTENTION et PREPARATION DES REACTIFS.*

1. Noter les positions des puits correspondants aux blancs, échantillons, standards et contrôles, ainsi que les numéros de lots indiqués sur les étiquettes des flacons. Repérer un coin de la plaque.
2. Préparer les barrettes de la façon suivante:
  - a. Réhydrater les puits de la microplaque en ajoutant environ 300 µl de solution de lavage dans chacun des puits à l'aide d'une bouteille de lavage ou d'un système automatique.
  - b. Incuber 2 minutes à 15°C à 27°C.
  - c. Aspirer le contenu des puits.
  - d. Ajouter environ 300 µl de solution de lavage dans chaque puits.
  - e. Aspirer le contenu des puits.
  - f. Répéter les étapes d-e encore une fois; 3 lavages au total auront donc été réalisés.**
  - g. Inverser la plaque en la tapotant fermement à 2 reprises sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
3. Sélectionner un ou plusieurs puits pour servir de blanc(s). Ajouter 100 µl de diluant pour échantillons dans ces puits.
4. Ajouter 100 µl de standards, de contrôles ou d'échantillons dilués dans les puits en duplicate assignés. Toute la plaque doit être chargée en moins de 15 minutes.
5. Incuber à 15°C à 27°C pendant 60 ± 5 minutes.
6. Laver les puits cinq fois en suivant cette procédure:
  - a. Aspirer le contenu de chaque puits.
  - b. Ajouter environ 300 µl de solution de lavage dans chaque puits, à l'aide d'une bouteille de lavage ou d'un système automatique.
  - c. Incuber les puits pendant 1 minute à 15°C à 27°C.
  - d. Aspirer le contenu de chaque puits.
  - e. Inverser la plaque en la tapotant fermement sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
  - f. Ajouter environ 300 µl de solution de lavage dans chaque puits.
  - g. Aspirer le contenu de chaque puits.
  - h. Inverser la plaque en la tapotant fermement sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide entre chaque lavage.
  - i. Répéter des étapes f-h quatre temps supplémentaires pour un total de cinq se lavent.**

- j. Après le 5e lavage, inverser la plaque en la tapotant fermement sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.
7. À l'aide d'une multipipette ou d'une pipette automatique, pipeter 100 µl de conjugué C4a dans chaque puits, y compris ceux qui correspondent au(x) blanc(s).
  8. Incuber les barrettes à 15°C à 27°C pendant 60 ± 5 minutes.
  9. Après cette incubation de 60 minutes, répéter l'étape de lavage décrite à l'étape 6.
  10. Immédiatement après ce lavage, pipeter 100 µl de solution de substrat TMB dans tous les puits, y compris ceux qui correspondent au(x) blanc(s).
  11. Incuber les barrettes à 15°C à 27°C pendant 15 ± 1 minutes.
  12. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans tous les puits pour arrêter la réaction enzymatique. Ajouter la solution d'arrêt dans le même ordre et à la même vitesse que lors de l'addition de la solution de substrat.
  13. Tapoter doucement la plaque pour permettre un développement uniforme de la coloration.  
**REMARQUE: Pour des résultats optimaux, utiliser la fonction auto-mix du lecteur de microplaques (si elle existe) juste avant de lire la plaque.**
  14. Lire l'absorption à 450 nm pour chaque puits dans les 30 minutes qui suivent l'addition de la solution d'arrêt (étape 12), en faisant une correction pour les blancs selon le système spectrophotométrique utilisé.
  15. Lire la concentration des échantillons et des contrôles à partir de la courbe standard.
  16. Éliminer le reste des échantillons dilués, contrôles et barrettes utilisées  
(voir le paragraphe ATTENTION)

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le certificat d'analyse inclus dans ce kit est spécifique au lot et doit être utilisé pour vérifier si les résultats obtenus dans votre laboratoire sont semblables à ceux qui ont été obtenus par Quidel Corporation. Les densités optiques sont mentionnées à titre indicatif seulement. Les résultats obtenus dans votre laboratoire peuvent être différents.

Des plages de contrôle de la qualité sont fournies. Les valeurs de contrôle sont destinées à vérifier la validité de la courbe standard et des résultats obtenus pour les échantillons. Chaque laboratoire doit établir ses propres critères de validation. Si les valeurs obtenues NE sont PAS dans les limites acceptables du laboratoire, les résultats seront considérés comme douteux, et un redosage des échantillons devra être effectué.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

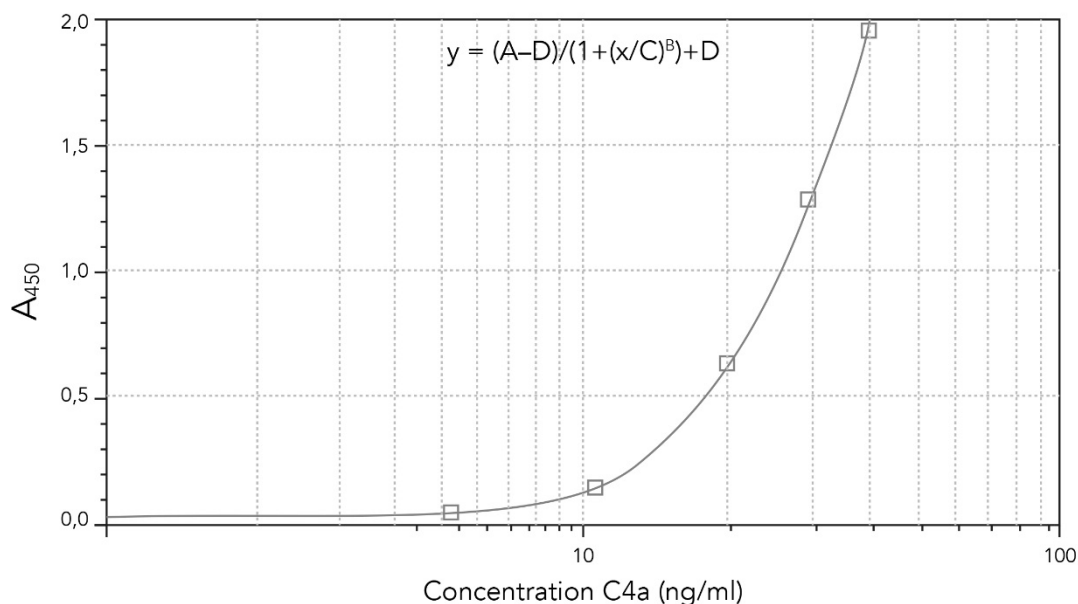
### Exemple courbe standard

La courbe standard du dosage EIA C4a se trace en plaçant sur l'axe des ordonnées les valeurs  $A_{450}$  de chaque standard (dont la valeur du blanc aura été préalablement soustraite) et sur l'axe des ordonnées la concentration correspondante. Après une régression à 4 paramètres, la courbe standard doit répondre aux critères de validation (voir ci-dessous). La plupart des logiciels de lecture de plaques et des ordinateurs peuvent effectuer ces calculs.

Les données peuvent aussi faire l'objet d'un tracé manuel et les valeurs (ng/ml) des échantillons lues directement à partir de la droite de meilleur ajustement de la courbe standard. Un exemple d'une courbe standard typique est illustré dans la Figure 1.



**Figure 1**  
**Exemple de courbe standard**



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

### Calcul de la concentration en C4a des échantillons

La concentration réelle en C4a présente dans chaque échantillon non dilué est calculée en multipliant la concentration (ng/ml) en C4a, calculée à partir de la courbe standard du kit, par le nombre réciproque du facteur de dilution de l'échantillon utilisé.

Si les valeurs  $A_{450}$  d'un échantillon donné sont supérieures aux valeurs du standard le plus élevé (E), les résultats doivent être présentés comme « supérieurs à » la concentration de C4a du standard le plus élevé (E) multiplié par le facteur de dilution de l'échantillon. Si une valeur de concentration en C4a plus précise est requise, l'échantillon doit être redosé avec un facteur de dilution supérieur. Les standards et les contrôles C4a devront également être redosés.

### VALIDATION

---

coefficient de corrélation (r) :  $\geq 0,98$   
Blanc :  $\leq 0,150$

---

Se reporter aux étiquettes des flacons ou au produit de C et A pour connaître les fourchettes de concentration moyennes en C4a acceptables correspondant aux contrôles forte et faible concentrations.

### LIMITATIONS

Le dosage ELISA MicroVue C4a a été utilisé sur des échantillons de sérum ou de plasma recueillis sur EDTA K2 ou K3. Il est déconseillé d'utiliser des plasmas citraté ou hépariné dans le dosage MicroVue C4a car ils engendrent des résultats erronés. Aucun autre anticoagulant n'a été testé.

## VALEURS OBSERVÉES

Du plasma et du sérum EDTA provenant respectivement de 32 et 44 donneurs normaux ont été dosés avec le kit de dosage ELISA MicroVue C4a. Les résultats sont présentés ci-dessous.

Échantillon	n	Moyenne (ng/mL)	Valeurs extrêmes (ng/mL)
Plasma EDTA	32	1694,65	383,50 à 8168,17
Sérum	44	1098	20,92 à 4437,24

REMARQUE: Le comportement de la moyenne et de l'écart type des concentrations de fragments C4a calculé pour les échantillons de plasma ou de sérum peut varier d'un laboratoire à l'autre. Il est donc recommandé que chaque laboratoire calcule les valeurs de concentration de fragments C4a et d'écart type des échantillons.

## CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

### Limites

**LD:** La limite de détection (LD) pour le dosage EIA C4a est égale à 0.29 ng/ml, calculée comme la limite supérieure obtenue pour 3DS dans une étude de précision réalisée à l'aide du standard zéro.

**PPQM:** La plus petite quantité mesurable (PPQM) du dosage EIA C4a est égale à 5,0 ng/ml, la plus petite concentration lue sur la courbe standard en suivant les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) pour l'exactitude et la précision.

**PGQM:** La plus grande quantité mesurable (PGQM) du dosage EIA C4a est égale à 61 ng/ml, la plus grande concentration lue en suivant les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) pour l'exactitude et la précision.

### Substances interférentes

Les substances suivantes ont été testées dans le dosage EIA C4a et se sont avérées ne pas interférer avec le dosage utilisant des échantillons de plasma ou de sérum:

Substance	Concentration
Bilirubine	40 mg/dL
Hémoglobine	200 mg/dL
Triglycérides	3000 mg/dL
Glucose	1000 mg/dL
Cholestérol	500 mg/dL
Albumine	6000 mg/dL
Gammaglobuline	6000 mg/dL
EDTA	10 mM
Héparine	3 U/mL

### Précision

1 échantillon de plasma et 1 échantillon de sérum (précision intra-essai) ont été dosés à 20 reprises; ces mêmes échantillons ont été dosés dans 10 dosages différents (précision inter-essais).

Échantillon	C4a (ng/mL)	C.V. intra-essai <sup>1</sup> (%)	C.V. inter-essais <sup>2</sup> (%)
Plasma EDTA	833.9	3.7%	4.4%
Sérum	1941.5	4.3%	4.0%

<sup>1</sup>n = 20 reprises    <sup>2</sup>n = 10 dosages

## Linéarité

La linéarité a été évaluée en diluant des échantillons avec un diluant pour échantillon et en comparant les valeurs obtenues aux valeurs attendues. Les résultats typiques sont indiqués ci-dessous.

Échantillon	Facteur de dilution	Concentration en C4a (ng/ml) <sup>3</sup> observée	Concentration en C4a (ng/ml) <sup>3</sup> attendue	Récupération (%)
Plasma EDTA	60	35.27	35.27	100%
	80	27.247	26.45	103%
	100	21.678	21.16	102%
	120	18.156	17.64	103%
Sérum	80	23.657	23.657	100%
	95	20.331	19.92	102%
	110	17.743	17.21	103%
	125	15.885	15.14	105%

<sup>3</sup>Facteur de dilution non inclus.

## Récupération

La récupération maximale a été évaluée en ajoutant une quantité déterminée de C4a purifié aux échantillons et en comparant les valeurs obtenues aux valeurs attendues.

Échantillon	C4a (ng/mL)	Ajout (ng/mL)	Résultat (ng/mL)	Récupération (%)
Plasma 1	899.598		1211.02	92%
Plasma 2	996.199	416.91	1288.55	91%
Plasma 3	902.898		1257.25	95%
Sérum 1	1000.298		1526.67	84%
Sérum 2	1522.56	807.258	2090.01	90%
Sérum 3	675.658		1570.40	106%

## ASSISTANCE

Pour une commande ou une question technique, veuillez contacter votre distributeur local. Vous trouverez les informations sur Quidel, ses produits et ses distributeurs sur le site [quidel.com](http://quidel.com).

## RÉFÉRENCES

1. 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. "Gnenration of anaphylatoxins by human  $\beta$ -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](http://quidel.com)

**PIA036001FR00 (04/19)**

## GLOSSAIRE

---

**REF**

Référence catalogue



Conformité Européenne

---

**EC REP**

Représentant autorisé dans  
la Communauté Européenne

**LOT**

Référence du lot

---



Date d'expiration



Fabricant

---



Conditions de stockage



Utilisation prévue

---



Consulter les instructions  
électroniques



Risques biologiques

---

**IVD**

Pour utilisation *in vitro*



Contenu suffisant pour 96 déterminations

---

**CONT**

Contenu

**CONTROL**

Contrôle

---