

En enzymimmunanalyse til kvantitativ bestemmelse af C4d-holdige fragmenter af C4 fra den klassiske complement pathway

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

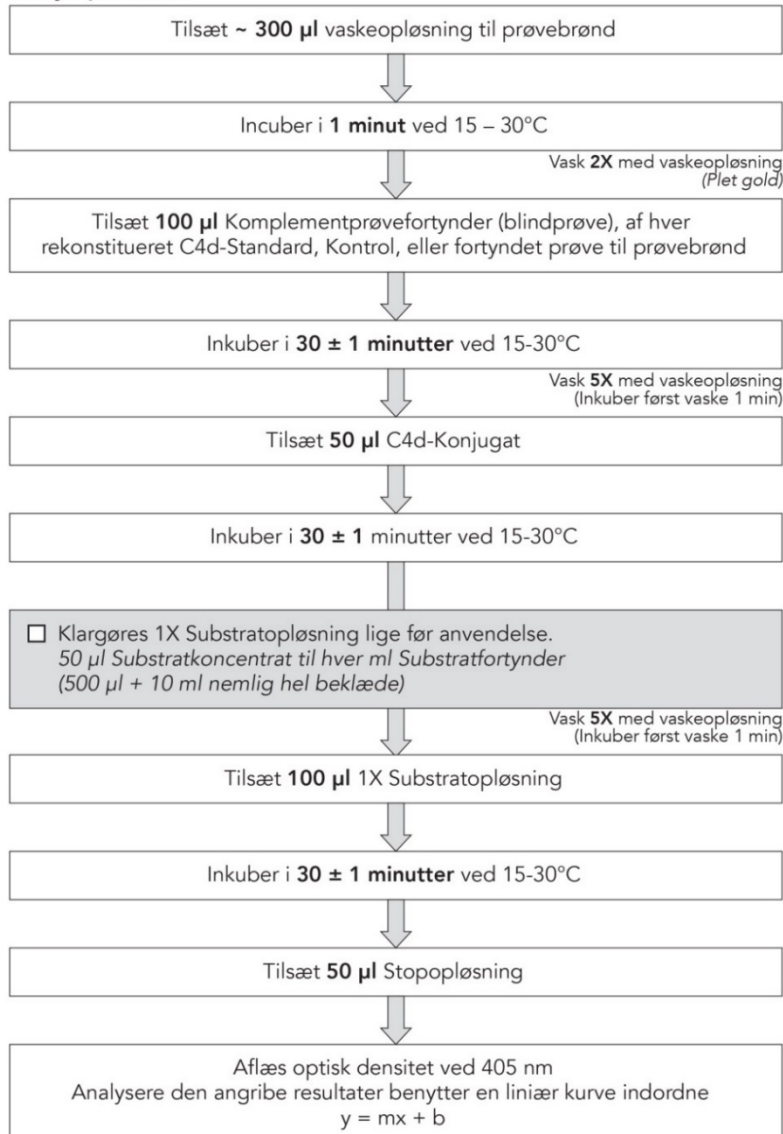
En symbolforklaring kan findes under quidel.com/glossary.

OPSUMMERING

Klargøring af Reagens, Kontrols og Prøveeksemplar

- Fortynd Vaskeopløsningskoncentrat **1:20** med deioniseret vand
- Rekonstruere hver Standard og Kontrol med **2,0 ml** Hydreringsreagens (inkubere 15 minutter, og bland omhyggeligt)
- Fortynd af Prover 1:70 med Komplementprøvefortynder (e.g. 10 μ L + 690 μ L) (tilsæt til prøvebrønd inden 30 minutter)

Analyseprocedure



OPSUMMERING OG FORKLARING

MicroVue C4d Fragment enzymimmunanalyser måler mængden af de C4d-holdige aktiveringsfragmenter i C4 (C4b, iC4b og C4d), der er til stede i humant serum, EDTA-plasma og andre biologiske eller eksperimentelle prøver.

Den fjerde komplementkomponent er et af plasma-proteinerne, som er unikt for den klassiske pathway for komplementaktivering.¹ Klassisk pathway aktivering udløses ved binding af C1q-subkomponenten af C1 til IgG- eller IgM-holdige immunkomplekser. Desuden bindes og aktiveres C1 af mange andre substanser inklusive retrovira, visse bakterier, parasitter, transformerede celler, subcellulære membraner, polyanioner (DNA) og C-reaktivt protein i kompleks med fosforylcholin.² Binding af C1 til disse aktivatorer i den klassiske pathway resulterer i konversion af zymogen C1s sub-komponenten til et aktivt proteolytisk enzym (C1s). C1s spaltes C4 α -kæden ved peptidbinding 77, hvilket resulterer i dannelse af C4a- og C4b-fragmenter med molekylvægte på henholdsvis 9.000 og 191.000. C4a-fragmentet er et af komplement-anaphylatoksinerne.³ C4b-fragmentet har mange vigtige biologiske aktiviteter.^{1,4} Disse aktiviteter omfatter mediering af forstærket fagocytose af komplement-aktiverende mål ved hjælp af hvide blodlegemer (opsonisering) og deltagelse i klassisk pathway C3 og C5 konvertasesammenføjning, der fører til terminal komponentaktivering og efterfølgende komplement-medieret lysning af mål-mikroorganismer og andre celler.

Ekspressionen af de biologiske aktiviteter for C4b er strengt reguleret. Således er C4b's evne til at tage del i klassiske pathway aktiverings- og opsoniseringsreaktioner hæmmet af enkeltsteds-spaltningen af C4b α -kæden af Faktor I.⁵ Denne reaktion kræver enten C4-bindende protein (C4bp)⁶ eller komplementreceptor CR1 som cofaktor.^{7,8} C4bp er et komplementkontrolprotein⁹, og R1 er den C3b/C4b-receptor, der findes på erythrocytter, granulocytter, monocytter og makrofager.⁸ Faktor I spaltning af C4b frembringer inaktiveret C4b, der kaldes iC4b.⁷⁻¹⁰ iC4b kan nedbrydes yderligere af Faktor I, i samarbejde med C4bp eller CR1, til C4c- og C4d-fragmenter.⁶⁻¹⁰ C4c- og C4d-fragmenterne, der kan fremstilles i væskefase såvel som på måloverflader, synes at være de endelige fysiologiske nedbrydningsprodukter af C4b.^{1,6-10}

C4d er kvantificeret i humane serum- og plasmaprøver. Niveauerne for C4d kan, når de er normaliseret med hensyn til forekomsten af endogen C4, være signifikant forhøjet i plasmaprøver, der er taget fra visse patienter med rheumatoid arthritis, arveligt angioødem, systemisk lupus erythematosus eller kronisk urticaria med hypokomplementæmi.^{11,12} C4d-niveauer kan også være forhøjet i legemsvæsker¹³ og plasmaprøver indsamlet fra andre patienter, hos hvem klassisk komplement pathway aktivering vides at forekomme, f.eks. fra patienter med en række humorale autoimmune sygdomme,¹⁴ sepsis, forbrændinger, multiple organtraumer, myokardie-infarkter, arveligt angioødem, glomerulonefritis og akut respiratorisk distress-syndrom. Korrelationen mellem niveauerne for C4d-aktiveringsfragmenter og den kliniske status eller prognose for patienter med disse og andre sygdomme mangler endnu at blive bestemt.

MicroVue C4d Fragment enzymimmunanalysen leverer en hurtig, ikke-radioaktiv, højt specifik og kvantitativ procedure til måling af C4-aktivering. Denne test er således beregnet til undersøgelser, der studerer rolle eller status for den klassiske pathway til komplementaktivering i talrige forsknings- og kliniske opsætninger og til monitorering af generationen af C4d-holdige fragmenter *in vitro* eller *in vivo*.

ANALYSEPROCEDURENS PRINCIP

MicroVue C4d Fragment enzymimmunanalysen til kvantificering af C4d i humant serum, plasma eller eksperimentelle prøver er en tretrinnsprocedure, der anvender (1) en mikroanalyseplade, som er coatet med et monoklonalt muse-antistof, der bindes specifikt til C4d-holdige aktiveringsfragmenter i humant C4, (2) et HRP-konjugeret anti-humant gede-C4d og (3) et kromogent substrat.

I det første trin tilsættes standarder, kontroller og testprøver til mikrobrønde, der er præcoatede med et anti-C4d specifikt monoklonalt antistof. C4d i standarder, kontroller eller prøver vil bindes til det immobiliserede anti-C4d. Efter inkubering fjernes ubundet materiale ved en vaskecyklus.

I det andet trin tilsættes peberrodsperoxydase (HRP) - konjugeret anti-C4d gede-antistof til hver prøvebrønd. Det enzymkonjugerede anti-C4d bindes til C4d, der er fanget af det monoklonale anti-C4d bundet på overfladen af mikrobrøndene. Efter inkubering fjernes ubundet, overskydende materiale ved en vaskecyklus.

I det tredje trin tilsættes et kromogent enzymsubstrat til hver mikrobrønd. Det bundne HRP-konjugat reagerer med substratet, så der dannes en grøn farve. Efter inkubering stoppes enzymreaktionen kemisk, og farveintensiteten måles spektrofotometrisk ved 405 nm. Farveintensiteten på reaktionsblandingen er proportional med koncentrationen af C4d i testprøver, standarder og kontroller.

LEVEREDE MATERIALER OG REAGENSER

96 analyser til C4d Fragment

MicroVue C4d Fragment EIA Kit indeholder følgende:

A C4d-standarder	Del A4638 – A4642	5 x 2 ml
(Frysetørret) Indeholder humant serum indeholdende kendte mængder af C4d-holdige fragmenter i		
E	PBS, proteinstabilisatorer	
H Høje kontroller	Del A9572	2 x 2 ml
(Frysetørret) Indeholder humant serum med C4d-holdige fragmenter fortyndet i PBS, proteinstabilisatorer		
L Lave kontroller	Del A9573	2 x 2 ml
(Frysetørret) Indeholder humant serum med C4d-holdige fragmenter fortyndet i PBS, proteinstabilisatorer		
1 Coatede strips	Del A9567	12 stk.
12 ottebrønnds strips coatet med et monoklonalt muse-antistof, der er specifikt for humant C4d i en foliepose med genluk		
2 Stopopløsning	Del A3673	6 ml
Indeholder 250 mM oxalsyre		
3 20X vaskeopløsningskoncentrat	Del A9957	2 x 50 ml
Indeholder fosfatbufferjusteret saltvand (PBS), 1,0 % Tween-20® og 0,035 % ProClin® 300		
4 Prøvefortynder	Del A3670	50 ml
Indeholder PBS, 0,05 % Tween-20 proteinstabilisatorer, 0,035 % ProClin 300		
5 Substratfortynder	Del A3672	25 ml
Indeholder 0,1 M citratbuffer og 0,05 % H ₂ O ₂		
6 Substrate substratkoncentrat	Del A3671	1,5 ml
Indeholder 0,7 % 2-2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonsyre) diammoniumsalt		
7 C4d-konjugat	Del A9945	2 x 3 ml
Indeholder peroxydase-konjugeret (gede) antihumant C4d i HRP stabiliserende buffer med konserveringsmiddel		
8 Hydreringsreagens	Del A3675	25 ml
Indeholder 0,035 % ProClin 300		

Tween-20® er et varemærke tilhørende ICI Americas Inc.

ProClin® er et registreret varemærke tilhørende Rohm and Haas Company.

NØDVENDIGE, MEN IKKE MEDLEVEREDE MATERIALER

- Timer (60 minutter)
- Regnemaskine eller andet beregningsudstyr til validering af analysen
- Rene, ubrugte mikropalader og/eller testrør og -stativer

- Beholder til vaskebufferfortynding
- Vaskeflaske eller andet vaskesystem til immunanalyse
- Justerbar multikanalpipette (8 eller 12 kanaler) eller repeat-mikropipetter (valgfri)
- Rene pipetter, 1 ml, 5 ml og 10 ml
- Mikropipetter og pipettespidser
- Pladelæser til optiske densitets aflæsninger mellem 0,0 og 2,0
- Deioniseret eller destilleret vand

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

- Kun til anvendelse ved forskning i USA. Må ikke anvendes i diagnostiske procedurer (kun i USA).
- Prøverne skal behandles som potentielt biologisk risikomateriale. Følg gældende retningslinier for omgang med biologisk risikomateriale ved håndtering af dette kit og alle patientprøver.
- Beholdere og ikke anvendt indhold bortskaffes i overensstemmelse med de nationale, regionale og lokale bestemmelser.
- Brug de leverede reagenser som en integreret enhed, inden udløbsdatoen på pakningens etiket.
- Brug egnet beskyttelsestøj, handsker og øjen-/ ansigtssvævn ved håndtering af dette kit.
- Opbevar analysereagenserne som anvist.
- Brug ikke coatede strips, hvis posen er punkteret.
- Test hver prøve i to eksemplarer.
- ProClin 300 anvendes som konserveringsmiddel. Tilfældig kontakt med eller indtagelse af buffer indeholdende ProClin, kan medføre irritation af hud, øjne eller mund. Anvend god laboratoriepraksis så risiko for udsættelse nedsættes. Søg læge, hvis der opleves symptomer.
- Hver donorenhed, der er anvendt i fremstillingen af standarder og kontrolsera i dette produkt, er testet med en FDA-godkendt metode for antistof mod humant immundefekt virus (HIV1 og HIV2) og mod hepatitis C virus samt for hepatitis B overflade-antigen. Eftersom ingen testmetode kan give fuldstændig garanti for fravær af smittefarlige stoffer, skal disse reagenser behandles efter biosikkerhedsniveau 2 som anbefalet for alle potentielt smittefarlige humane serum- eller blodprøver i Centers for Disease Control/National Institutes of Health's vejledning "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2007.
- Brug af multikanalpipetter eller repeat-pipetter anbefales for at sikre en rettidig tilsætning af reagenser.
- Tilsæt prøver og standarder præcist for at sikre en nøjagtig prøveudmåling. Foretag omhyggelig afpipettering og kun ved hjælp af kalibreret udstyr.
- Korrekt indsamling og opbevaring af testprøverne er vigtig for at opnå nøjagtige resultater (se *INDSAMLING OG OPBEVARING AF PRØVER*).
- Undgå mikrobiel eller krydskontaminering af prøver eller reagenser.
- Mikrobrøndene må ikke anvendes til mere end én test.
- Dekontaminer alle prøver, reagenser og materialer ved at gennemvæde i mindst 30 minutter i en 1:10 opløsning af husholdningsblegemiddel (natriumhypoklorit) eller autoklavere ved 121 °C i 30 minutter ved 15 psi.
- Anvendelse af andre inkuberingstider og -temperaturer end dem, der er anført i afsnittet Procedure, kan medføre fejlagtige resultater.
- Substratkoncentratet skal beskyttes mod stærkt eller direkte lys.
- Mikrobrøndene må ikke tørre, når analysen er begyndt.
- Undgå at skrabe eller berøre brøndenes bund, når væsken fjernes fra mikrobrøndene.
- Varmeinaktiverede prøver kan give fejlagtige resultater.
- Hyperlipæmiske eller kontaminerede prøver kan give fejlagtige resultater.
- For at undgå aerosoldannelse under vaskeprocessen, skal der bruges et instrument til at aspirere vaskeopløsningen ned i en flaske med blegemiddel til husholdningsbrug.
- En vaskeflaske eller et automatisk fyldningsudstyr skal bruges til vask af pladen (*ANALYSEPROCEDURE*, Trin 6). Brug, for at få de bedste resultater, ikke en multikanalpipette til vask af mikroanalysepladen.
- Testning skal udføres i et område med tilstrækkelig ventilation.
- 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. Ækvilibrer reagenser og materialer til 15 °C til 30 °C før brug. Anbring alle ubrugte mikroanalysestrips i opbevaringsposen, luk posen til og opbevar ved 2 °C til 8 °C.

TEGN PÅ USTABILITET ELLER FORRINGELSE AF REAGENSERNE

Substratkoncentratet vil variere i farve, fra farveløs til lyse- eller mørkegrøn. Dog skal nyfremstillet substratopløsning være farveløs eller lysegrøn. En mørkegrøn farve indikerer, at reagentet er blevet forringet og derfor skal kasseres, hvorefter en ny opløsning fremstilles i rene glasvarer.

Uklarhed af vaskeopløsningen indikerer, at der er sket en forringelse af det pågældende reagens. Hvis dette forekommer, skal opløsningen kasseres.

PRØVEUDTAGNING- OG OPBEVARING

Håndtering og bortskaffelse af alle prøver skal foregå i overensstemmelse med gældende retningslinier.

Korrekt prøvetagning, behandling og opbevaring af prøverne er afgørende, eftersom C4d er følsomt for proteolyse i ukorrekt indsamlede eller opbevarede prøver.

Normalværdier for serumprøver er lidt højere end de, der opnås for matchede EDTA-plasmaprøver. Niveauerne for C4d i EDTA-plasma repræsenterer måske derfor *in vivo*-koncentrationerne mere præcist.

Serum- eller EDTA-plasmaprøver skal tages aseptisk ved hjælp af standardteknikker. Prøverne skal analyseres straks eller opbevares ved 4 °C eller på is, indtil analysen. Denne korttidsopbevaring på is bør dog ikke overstige fire timer.

Til længere tids opbevaring skal serum eller plasma fryses ved –70 °C eller lavere inden to timer efter prøvetagningen. Frosne prøver skal analyseres hurtigst muligt efter optøning eller opbevares på is, indtil de skal analyseres (og ikke længere end fire timer).

En **Prøvestabiliserende Opløsning** (varenr. A9576) kan også bruges til at tilberede humane serum- og plasmaprøver til opbevaring. Korrekt brug af dette produkt, der kun fås fra Quidel, kræver, at prøven blandes 1:1 med opløsningen inden frysning. Yderligere teknisk information om opløsningen fås ved henvendelse.

Frosne prøver skal analyseres hurtigst muligt efter optøning eller opbevares på is, indtil de skal analyseres (og ikke længere end fire timer). Gentagen frysning og optøning anbefales ikke.

FREMSTILLING AF REAGENS

Lad alle reagenser og materialer antage 15 °C til 30 °C før brug.

Efter at de nødvendige reagenser og materialer er taget fra, stilles de reagenser, der ikke skal anvendes, omgående tilbage til deres opbevaringstemperaturer (Se **OPBEVARING**).

Se Tabel 1 angående de nødvendige mængder af reagenser og materialer pr. antal brønde.

Vaskeopløsning

Bland 20X vaskeopløsningskoncentrat ved at vende flasken på hovedet adskillige gange. Hvis 20X vaskeopløsningskoncentratet er blevet opbevaret ved 2 °C til 8 °C, kan der være dannet krystaller. Krystallerne opløses ved at opvarme flasken i vandbad ved 37 °C til 50 °C, indtil alle krystallerne er opløst,

hvorefter der blandes godt. Vaskeopløsningen tilberedes ved fortynding af hele indholdet af én af flaskerne med 20X vaskeopløsnings-koncentrat op til én liter med destilleret eller deioniseret vand. Blandes grundigt. Vaskeopløsningen er holdbar i 30 dage ved opbevaring i en ren beholder ved 2 °C til 8 °C. Hvis der forekommer misfarvning eller uklarehed, skal reagenset kasseres.

Valg af mikroanalysestrips

Bestem, hvor mange brønde der er nødvendige til analysen. Det anbefales, at blindprøvebrønde, kontroller og standarder testes i duplikat. Fjern stripholderen fra den samlede plade. Fjern de strips, der ikke skal bruges, og læg dem i opbevaringsposen, som forsegles og opbevares ved 2 °C til 8 °C. Fastgør de strips, der skal bruges i analysen.

Rekonstituering af C4d-standard og kontrol

Tilsæt 2,0 ml hydreringsreagens til hver standard (A-E) og til den lave kontrol og den høje kontrol. Lad de rekonstituerede hætteglas rehydreres i mindst 15 minutter ved 15 °C til 30 °C. Bland omhyggeligt. Undgå, at der dannes skum eller luftbobler under blandingen. Rekonstituerede standarder og kontroller er holdbare i 30 dage, når de opbevares ved 2 °C til 8 °C.

Prøvefortynding

FORSIGTIG: Behandl alle prøver i overensstemmelse med gældende retningslinjer. Brug ikke varmeinaktiverede, kontaminerede eller ukorrekt opbevarede prøver.

Tilbered en passende fortynding af hver prøve ved hjælp af komplementprøvefortyndingsmidlet (se Beregning af resultater). En 1:70 fortynding anbefales til normale prøver. Bland godt, men undgå at der dannes skum eller luftbobler. Fortyndede prøver må ikke genbruges eller opbevares.

Tilsætning af fortyndede prøver til mikrotiterbrøndene

De fortyndede prøver, standarder, kontroller og buffer kan tilsættes til brøndene på to måder (se trin 4 i *ANALYSEPROCEDURE*). Ved små analysekørsler hvor kun få prøver skal analyseres, kan de fortyndede prøver og andre reagenser tilsættes direkte til de tildelte brønde med en mikropipette (100 µL/brønd). Til små eller store kørsler, men især større kørsler, anbefaler vi brug af en multikanal-pipette til tilsætning af prøver på følgende måde. (En multikanal-pipette kan bruges til på en praktisk måde at tilsætte såvel konjugat og substrat som stopopløsning.)

For at standarder, kontroller, og fortyndede prøver kan tilsættes til mikrobrøndene så hurtigt som muligt, kan dette foretages ved en replika-udpladningsteknik. I stedet for at tilsætte 100 µL fra hver standard, kontrol eller fortyndet prøve til de enkelte antistof-coatede brønde, kan 120–130 µL fra hver opløsning tilsættes de individuelle brønde på en blindplade (ikke vedlagt), der svarer til det ønskede endelige EIA-mønster. Efter at alle opløsningerne er tilsat mikrobrøndene på blindpladen, skal 100 µL hurtigt overføres fra hver blindprøvebrønd til de antistof-coatede brønde med en multikanalpipette. For at undgå mulig krydskontaminering skal pipettespidserne skiftes, hver gang der overføres prøver med en anden sammensætning.

Fremstilling af substratopløsning

Fremstilles lige inden brug. Bestem den nødvendige volumen af substratopløsning ud fra Tabel 1. (Der skal bruges 1 ml substratopløsning pr. strip eller 125 µL/brønd). Fremstil substratopløsningen ved at tilsætte 50 µL substratkoncentrat til hver ml substratfortynder. Blandes grundigt. Fremstil ikke substratopløsningen før trin 8 i Analyseproceduren. Hvis substratopløsningen bliver mørkegrøn før brug, skal den kasseres og der skal laves en frisk opløsning i en ren beholder.

Tabel 1. Krav Til Reagens

Brønde ¹	8-brøndsstrips	Substratopløsningsvolumen (ml)	Substratkonzentrat (µL)
16	2	2,0	100
24	3	3,0	150
32	4	4,0	200
40	5	5,0	250
48	6	5,0	250
56	7	6,0	300
64	8	7,0	350
72	9	8,0	400
80	10	9,0	450
88	11	9,0	450
96	12	10,0	500

¹Bestem antallet af prøver, der skal analyseres, og læg femten (15) brønde til for de fem standarder samt lave og høje kontroller, der skal analyseres (i duplikat) og én blindprøvebrønd. Det anbefales, at standarder og kontroller analyseres i duplikat i separate mikroanalyse-strips, hvis det er muligt.

ANALYSEPROCEDURE

Læs hele indlægssedlen inden analysen startes.

Se FREMSTILLING AF REAGENS og ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER.

- Notér positionen for de mikrobrønde, der svarer til blindprøvebrøndene, alle prøver, standarder og kontroller, såvel som de anførte lot-numre fra hætteglasetiketterne. Afmærk et af hjørnerne på mikropladen til orientering.
- Klargør mikrostrips til analysen som følger:
 - Rehydrér mikrobrøndene ved at tilsætte ca. 250-300 µL vaskeopløsning til hver brønd med en vaskeflaske eller et automatisk påfyldningsudstyr.
 - Inkuber ved 15 °C til 30 °C i ét minut.
 - Fjern væsken fra hver brønd.
 - Tilsæt ca. 250-300 µL vaskeopløsning til hver brønd.
 - Aspirér indholdet fra hver brønd.
 - Gentag trin d-e en gang til.**
 - Vend pladen om og læg den ovenpå trækpapir, idet der bankes på den, så evt. tilbagebleven væske fjernes. Gentag denne proces to gange.
- Vælg én eller flere brønde til at fungere som blindprøve. Tilsæt 100 µL prøvefortynder til de brønde, der vil blive brugt som blindprøver i pladelæseren.
- Tilsæt 100 µL af hver rekonstitueret C4d-standard (A, B, C, D, E), kontrol eller fortyndet prøve til de tildelte brønde.
- Inkuber ved 15 °C til 30 °C i 30 ± 1 minutter.
- Vask mikrobrøndene som følger:
 - Efter inkuberingen ved trin 5 (eller i trin 8 nedenfor) fjernes væsken fra hver brønd.
 - Tilsæt ca. 300 µL vaskeopløsning til hver brønd med en vaskeflaske eller et automatisk påfyldningsudstyr.
 - Inkuber brøndene i 1 minut ved 15 °C til 30 °C.
 - Fjern væsken fra hver brønd.
 - Tilsæt ca. 300 µL vaskeopløsning til hver brønd.
 - Fjern væsken fra hver brønd.
 - Gentag trin e-f yderligere tre gange.**
 - Efter den femte vaskecyklus vendes pladen om og lægges ovenpå trækpapir, idet der bankes gentagne gange, så tilbagebleven væske fjernes.

7. Med en multikanal- eller repeatpipette dispenseres 50 µL C4d-konjugat i hver vasket prøvebrønd, inklusive brønd(e) beregnet til blindprøve(r).
8. Inkuber mikroanalysestrips ved 15 °C til 30 °C i 30 ± 1 minutter. Fremstil substratopløsningen under denne inkubering (se *FREMSTILLING AF REAGENS*).
9. Vask mikrobrøndene efter de 30 minutters inkubering (trin 8) som beskrevet i *ANALYSEPROCEDURE*, trin 6.
10. Straks efter vaskeproceduren dispenseres 100 µL nyfremstillet substratopløsning ned i hver brønd, inkl. blindprøvebrøndene.
11. Inkuber mikroanalysestrips ved 15 °C til 30 °C i 30 ± 1 minutter.
12. Tilsæt 50 µL stopopløsning til hver brønd, så den enzymatiske reaktion standses. Stopopløsningen skal tilsættes brøndene i samme rækkefølge og ved samme hastighed som substratopløsningen. Bank let på pladen, så farveudviklingen spredes jævnt.
13. Bestem absorptions aflæsningen ved 405 nm (A_{405} -værdi) for hver brønd inden for en time efter tilsætning af stopopløsning (trin 12), idet der foretages de nødvendige blindprøvekorrigeringer.
14. Bestem koncentrationen af prøver og kontroller ud fra standardkurven.
15. Bortskaf de resterende fortyndede prøver og de brugte mikroanalysestrips (se *ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER*).

KVALITETSKONTROL

God laboratorieskik anbefaler brug af kontroller for at sikre, at analysen fungerer korrekt. Hvert C4d kit indeholder høje og lave kontroller, der kan bruges til dette formål. Disse kontroller bør testes mindst én gang for hvert kit. Desuden kræver indlægssedlen, at den standardkurve, der er genereret med kittets standarder, opfylder strenge valideringskrav. Hvis analysen ikke opfylder disse krav, skal den gentages eller Quidel teknisk assistance kontaktes.

Analysecertifikatet i dette kit er lottspecifikt og skal anvendes til at bekræfte, at resultater opnået i dit laboratorium er identiske med dem, der er opnået hos Quidel. De optiske densitetsværdier stilles til rådighed og skal alene anvendes som retningsgivende. Resultater opnået i laboratoriet kan variere.

Der medleveres kvalitetskontrolområder. Kontrol-værdierne har til formål at verificere validiteten af kurve- og prøveresultaterne. Hvert laboratorium skal etablere egne parametre for acceptable analysegrænser. Hvis kontrolværdierne IKKE ligger inden for laboratoriets acceptable grænseværdier, skal analyseresultaterne betragtes som tvivlsomme, og prøverne skal gentages.

FORTOLKNING AF RESULTATER

Beregning af resultater

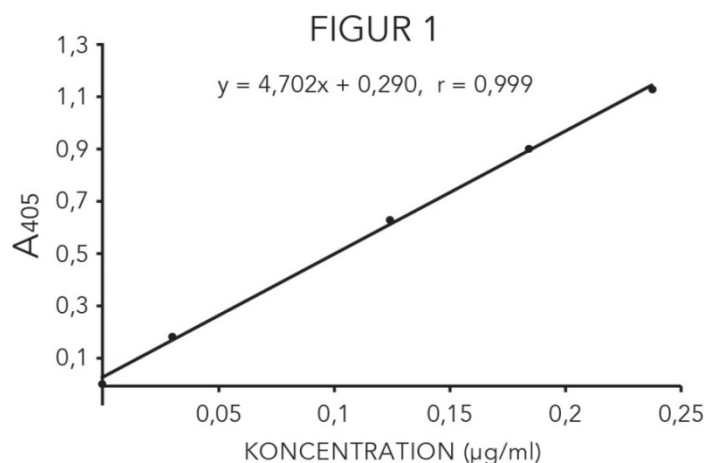
Generelt er en 1:70 fortynding af normalt humant plasma eller serum fundet at fungere optimalt i C4d EIA-kittet. Hele plasma- eller serumprøver kan fortyndes fra 1:40 til 1:100 med fuld og præcis kvantificering af C4d-analytten. Normale plasma- eller serumprøver, der er fortyndet mere end 1:100, kan give A_{405} -værdier mindre end 0,1, hvilket kan give unøjagtige resultater.

Afhængigt af prøvekoncentrationen og forsøgsopstillingen kan det være nødvendigt at fortynde prøverne yderligere (dvs. højere fortyndinger) for at producere A_{405} -værdier inden for området for kit-standarderne for at beregne koncentrationen af C4d-analyt. Alternativt kan C4d-niveauet rapporteres som større end eller lig med det minimalt beregnelige for den enkelte fortynding, der testes.

Brug af standardkurven: Standardkurven for C4d EIA genereres ved at bruge A_{405} -værdierne med blindværdierne fratrukket for hver standard (på y-aksen) og den tildelte koncentration for hver standard (på x-aksen). Efter lineær regression skal den genererede standardkurve opfylde valideringskravene (se nedenfor). De fleste computere og regnemaskiner er i stand til at udføre disse beregninger.

Data kan også indtegnes manuelt i diagrammet, hvoraf værdierne (µg/ml) fra analyseprøverne kan aflæses ud fra standardkurvens best-fit-linie. Et eksempel på en typisk standardkurve er vist i Figur 1.

Repræsentativ standardkurve



Validering

Bestem hældningen, skæringspunktet og korrelations-koefficienten på den udledte best-fit-linie for C4d kit standarder. Værdierne skal ligge inden for de specificerede områder, for at analysen kan kvalificeres.

korrelationskoefficient (r): > 0,95

hældning (m): mellem 3,32 og 6,50

y-skæringspunkt (b): mellem (-)0,056 og 0,063

Se hætteglassenes etiketter vedrørende det acceptable C4d-koncentrationsområde for de lave og høje controller.

BEGRÆNSNINGER

Dette kit er til forskningsformål alene og er ikke beregnet til brug ved diagnostiske procedurer.

MicroVue C4d Fragment enzymimmunanalyse har været anvendt til at undersøge prøver indsamlet som serum eller som plasma i EDTA. Andre antikoagulanter er ikke blevet testet.

VÆRDIEKSEMPLER

Firs (80) EDTA-plasmaprøver (fortyndet 1:70 i prøvefortynder) og fireoghalvtreds (54) serumprøver (fortyndet 1:70 i prøvefortynder) blev testet i MicroVue C4d Fragment enzymimmunanalyse. Områder for plasma-og serumprøver er vist nedenfor.

	n	Gennemsnitlig	Område	
			± 2 SD	± 3 SD
Plasma EDTA	80	3,5	0,7 µg-6,3 µg/ml	0-7,7 µg/ml
Serum	54	4,6	1,2 µg-8,0 µg/ml	0-9,7 µg/ml

TESTENS EFFEKTIVITET

Grænser

LOD: Detektionsgrænsen (LOD) for C4d-analysen er 0,001 µg/ml, bestemt ved den øvre 3SD-grænse i en standardundersøgelse med en standard på nul.

LLOQ: Den nedre grænse for kvantificering (LLOQ) for C4d-analysen er 0,022 µg/ml, den laveste koncentration på standardkurven, der opfylder NCCLS-kriterierne for nøjagtighed og præcision.

Interfererende substanser

Natriumcitrat og tetranatrium-EDTA blev testet i koncentrationer på henholdsvis 1000 mg/dl og 800 mg/dl og fandtes ikke at interferere med analysen.

Præcision

Præcision under kørsel og mellem kørsler blev bestemt ved analyse af 20 replikater af 3 plasmaprøver i 9 forskellige kørsler.

C4d (µg/ml)	Under kørsel ¹ C.V. (%)	Mellem kørsler ² C.V. (%)
4,4	9,7	11,2
4,7	7,4	8,8
7,9	6,1	8,5

¹n=20 replikater ²n=9 kørsler

Linearitet

Linearitet blev udført ved at blande en høj plasmaprøve med en lav plasmaprøve i forskellige forhold for at danne intermediære analytniveauer. Den gennemsnitlige genvinding var 92,7 % med et absolut område på 87,0-99,0 %.

ASSISTANCE

For at afgive en ordre eller for teknisk hjælp bedes du kontakte en Quidel-repræsentant på +1-800-874-1517 (i USA) eller +1-858-552-1100 (uden for USA), mandag til fredag fra 8-17 amerikansk østkysttid. Ordre kan også afgives pr. fax på +1-740-592-9820. For hjælp med e-mail bedes du kontakte customerservice@quidel.com eller technicalsupport@quidel.com.

For serviceydelse uden for USA kontaktes den lokale forhandler. Yderligere information om Quidel, vores produkter og vore distributører kan findes på www.quidel.com.

REFERENCER

1. Müller-Eberhard, H.J. 1975. Complement. *Annu. Rev. Biochem.* 44:697.
2. Cooper, N.R. 1985. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol.* 37:151
3. Gorski, J.P., Hugli, T.E., and Müller-Eberhard, H.J. 1979. C4a: The third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc. Natl. Acad., Sci, (USA)* 76:5299.
4. Bokisch, V.A. and Sobel, A.T. 1974. Receptor for the fourth component of complement on human B lymphocytes and cultured human lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* 140: 1336.
5. Fearon, D.T. 1977. Purification of C3b inactivator and demonstration of its two polypeptide chain structure. *J. Immunol.* 119: 1248.
6. Scharfstein, J., Ferreira, A., Gigli, I., and Nussenzweig, V. 1978. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J. Exp. Med.* 148:207.
7. Medof, M.E., and Nussenzweig, V. 1984 . Control of the function of substrate-bound C4b-C3b by the complement receptor Cr1. *J. Exp. Med.* 159:1669.
8. Ross, G.D., and Medof, M.E. 1985. Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3. *Adv. Immunol.* 37:217.
9. Fujita, T., Gigli, I., and Nussenzweig, V. 1978. Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b Inactivator. *J. Exp. Med.* 148: 1044.
10. Nagasawa, S., Ichihara, C., and Stroud, R.M. 1980. Cleavage of C4b by C3b inactivator: production of a nicked form of C4b, C4b', as an intermediate cleavage product of C4b by C3b inactivator. *J. Immunol.* 125:578.

11. Milgrom, H., Curd, J.G., Kaplan, R.A., Müller-Eberhard, H.J., and Vaughan, J.H. 1980. Activation of the fourth component of complement (C4): assessment by rocket immunoelectrophoresis and correlation with the metabolism of C4. *J. Immunol.* 124:2780.
12. Nitsche J. F., Tucker, E.S., Sugimoto, S., Vaughan, J.H., and Curd, J.G. 1981. Rocket immunoelectrophoresis of C4 and C4d. A simple sensitive method for detecting complement activation in plasma. *Am. J. Clin. Path.* 76:679.
13. Perrin, L.H., Shiraishi, S., Stroud, R.M., and Lambert, P.H. 1975. Detection and quantitation in plasma and synovial fluid of a fragment of human C4 with α mobility generated during the activation of the complement system. *J. Immunol.* 115:32.
14. Tucker, E.S. 1984. Complement activation in autoimmune disease. *J. Clin. Immunol.* 7:310.
15. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
16. Centers for Disease Control/National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. U.S. *Department of Health and Human Services*, 2007.

REF A008 – MicroVue C4d 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

PIA008002DA00 (08/19)

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
