

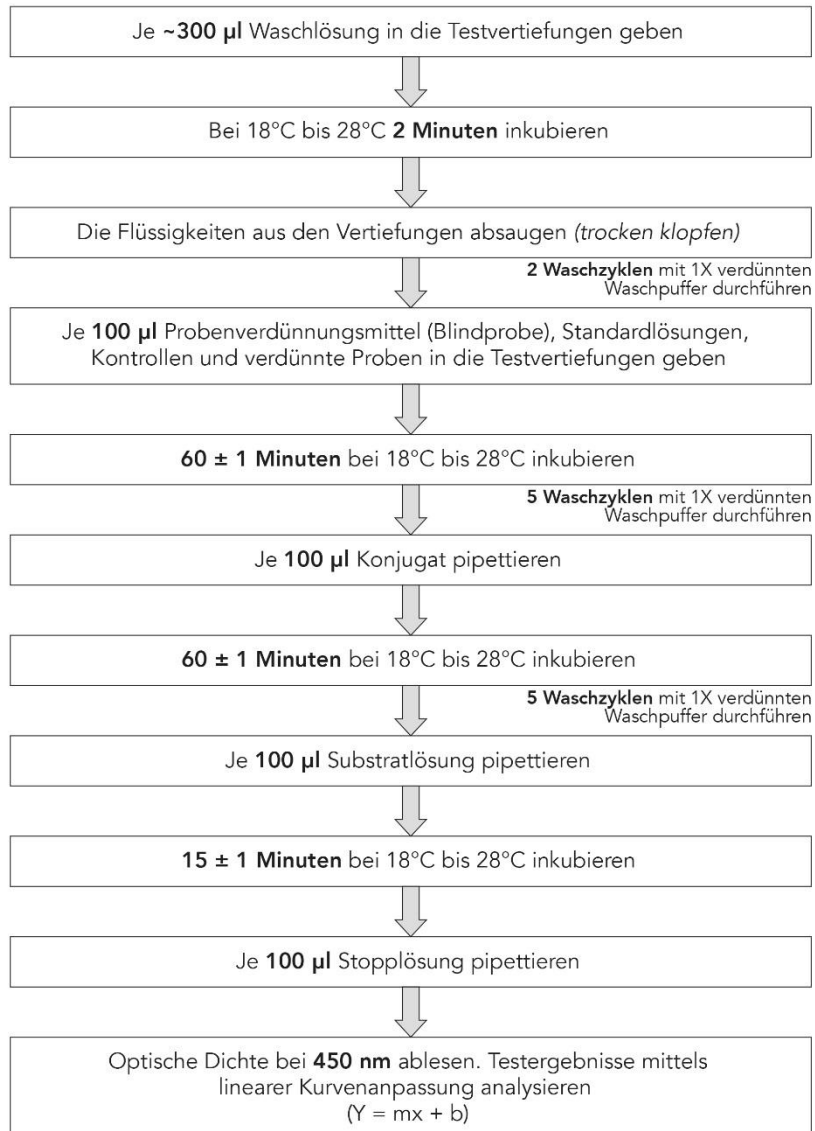
Der MicroVue C5a Enzymimmunoassay misst die Menge von C5a in Humanserum oder -plasma.

ZUSSAMENFASSUNG

Vorbereitung von Reagenzien und Proben

- Konzentrierte Waschlösung im Verhältnis 1:20 mit entionisiertem Wasser verdünnen
- Serumproben im Verhältnis 1:50 mit Probenverdünnungsmittel verdünnen (z. B. 10 µl + 490 µl)
- Plasmaproben im Verhältnis 1:20 mit Probenverdünnungsmittel verdünnen (z. B. 20 µL + 380 µL).

Testverfahren





VERWENDUNGSZWECK

Der MicroVue C5a Enzymimmunoassay misst die Menge von C5a in Humanserum oder -plasma.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Der MicroVue C5a Enzymimmunoassay ist ein "Direct-Capture-Immunoassay" mit 96 Vertiefungen und dient der Messung des C5a in Humanserum oder -plasma.

Unter normalen Bedingungen führt die Aktivierung des klassischen, alternativen oder Lektin-Wegs zur Bildung eines C5-Konvertaseenzym, das C5 in C5a und C5b spaltet.^{1,2} C5b ist ein Hauptbestandteil des terminalen Komplementkomplexes und erfüllt dabei eine Vielzahl an Funktionen. C5a ist ein niedermolekulares (etwa 9kD schweres) Proteinfragment, das aus 74 Aminosäuren besteht.³ C5a wird durch das Serumenzym Carboxypeptidase schnell in eine stabilere und weniger aktive Form, das C5a des-Arg, metabolisiert.^{2,3} Zur Vereinfachung werden in dieser Dokumentation beide Formen als "C5a" bezeichnet.

Der MicroVue C5a Assay stellt ein schnelles, hochspezifisches Verfahren zur quantitativen Messung der C5a-Konzentrationen bereit. Er eignet sich hervorragend für Untersuchungen, die die Rolle oder den Status der terminalen Komplementaktivierung in zahlreichen Forschungsbereichen betreffen sowie für das Monitoring der Bildung von C5a *in vivo* oder *in vitro*.⁴ Als das wirksamste der Komplement-Anaphylatoxine übernimmt C5a eine Reihe an biologischen Funktionen² wie die Mastzellendegranulation, Chemotaxis, die Sequestrierung von Leukozyten und die Zellaktivierung durch Bindung an C5a-Rezeptor² (C5aR oder CD88). In Forschungs-Arbeiten werden erhöhte C5a-Konzentrationen in Flüssigphase und adsorbiertem Zustand mit Hämoinkompatibilität einiger Biomaterialien, insbesondere in extrakorporalen Kreisläufen assoziiert.⁵⁻⁹ Untersuchungen haben auch einen Zusammenhang zwischen C5a-Konzentrationen und der Pathogenese verschiedener Krankheitszustände wie Myokardinfarkt,¹⁰⁻¹⁴ Apoplexie^{15,16} sowie Vascular Leak Syndrome (VLS) und assoziierter Nierenschädigung festgestellt.¹⁷⁻¹⁹ Die Rolle des C5a bei der Krankheitsentwicklung von Malaria²⁰ und anderen Infektionskrankheiten sowie Sepsis²¹⁻²⁴ ist gleichfalls gut dokumentiert.

FUNKTIONSPRINZIP

Dem MicroVue C5a Enzymimmunoassay liegt ein Dreischrittverfahren zugrunde. Zur Durchführung des Assays werden (1) eine mit einem monoklonalen murinen Antikörper beschichtete Mikroassayplatte, der spezifisch ein Neoepitop auf humanem C5a bindet, (2) ein HRP-konjugierter monoklonaler muriner Antikörper gegen die C5a-Region von C5 und (3) ein chromogenes Substrat eingesetzt.

In einem ersten Schritt werden Standardlösungen, Kontrollen und verdünnte Testproben in die Testvertiefungen, die mit einem murinen monoklonalen Antikörper gegen C5a beschichtet sind, gegeben. Der monoklonale Antikörper bindet sich an das C5a in den Standardlösungen, Kontrollen oder Proben. Nach einer Inkubationszeit wird durch einen Waschzyklus ungebundenes Material entfernt.

In einem zweiten Schritt wird an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierter muriner anti-C5(C5a) in jede Vertiefung gegeben. Das enzymkonjugierte anti-C5(C5a) bindet sich an das immobilisierte C5a, das im ersten Schritt eingefangen wurde. Nach einer Inkubationszeit wird durch einen Waschzyklus ungebundenes Material entfernt.

In einem dritten Schritt wird 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), eine gebrauchsfertige chromogene Substratlösung, in die Testvertiefungen gegeben. Die gebundene Meerrettichperoxidase reagiert mit dem Substrat und bildet dabei eine blaue Farbe. Nach einer Inkubationszeit wird die Reaktion chemisch gestoppt, was zu einer Farbänderung von blau zu gelb führt und bestätigt, dass eine Reaktion stattgefunden hat. Die Farbintensität wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Farbintensität der Reaktionsmischung verhält sich proportional zu der C5a-Konzentration, die in den verdünnten

Testproben, Standardlösungen und Kontrollen vorliegt. Die Ergebnisse werden aus der Standardkurve mit Hilfe linearer Regressionsanalyse berechnet.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

96 Tests zur Bestimmung des C5a -Komplexes

Der MicroVue C5a EIA Kit enthält folgende Komponenten:

A	C5a Standardlösungen	Artikelnr. 5131 – 5135	je 1, 1,5 ml
B	Gebrauchsfertig. Enthält Humanserum mit bekannten C5a-Konzentrationen (ng/ml),		
C	Proteinstabilisatoren		
D			
E			
L	Niedrige Kontrolle	Artikelnr. 5136	1,5 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält Humanserum mit bekannter C5a-Konzentration (ng/ml), Proteinstabilisatoren		
H	Hohe Kontrolle	Artikelnr. 5137	1,5 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält Humanserum mit bekannter C5a-Konzentration (ng/ml), Proteinstabilisatoren		
1	Beschichtete Teststreifen	Artikelnr. 5129	je 12
	Streifen à 8 Vertiefungen, beschichtet mit murinem monoklonalen Antikörper in einem wiederverschließbaren Folienbeutel		
2	Stopplösung	Artikelnr. A9947	12 ml
	Enthält 1N (4%) Salzsäure		
3	20fach 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 phosphatgepufferte Salzlösung (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)		
6	Konjugat	Artikelnr. 5130	12 ml
	An Meerrettichperoxidase konjugierter muriner monoklonaler Antikörper gegen C5a		

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)
- Taschenrechner oder anderes Rechenverfahren zum Validieren der Testergebnisse
- Saubere, unbenutzte Mikroassay-Platten und/oder Proberöhrchen und Ständer
- Skalierter Behälter für die Verdünnung des Waschpuffers
- Waschflasche oder anderes für Immunoassays geeignetes Waschsystem
- Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanäle) oder Mehrfachmikropipetten (optional)
- Saubere Pipetten, 1 ml, 5 ml und 10 ml
- Mikropipetten und sterile Einwegpipettenspitzen
- Plattenlesegerät für Extinktionsmessungen über den Bereich von 0,0 bis 3,0
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Zur *In-Vitro*-Diagnostik.
- Nicht zum Verkauf oder zur Anwendung in den USA oder Kanada bestimmt.
- Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln.
- Bei der Arbeit mit diesem Kit und den Patientenproben allgemein gültige 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 guter Laborpraxis beachten, um die Exposition möglichst gering zu halten. Beim Auftreten der ersten 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 der Einnahme Arzt aufsuchen.
- Alle Spendereinheiten, die für die Standardlösungen und Kontrollseren dieses Produkts verwendet werden, wurden mit einer von der FDA zugelassenen Methode auf Antikörper gegen HIV (HIV1 und HIV2), Hepatitis-C-Viren sowie HBsAg untersucht. Da keine Testmethode mit 100%iger 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," 2007, Centers for Disease Control/National Institutes of Health, beschrieben.
- 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 Kreuzreaktion von Proben oder Reagenzien ist zu vermeiden.
- Jede Probe als Doppelbestimmung messen.
- Die Mikroassay-Vertiefungen jeweils nur für einen Test verwenden.
- Wenn die Inkubationszeiten und –temperaturen bei der Testdurchführung von den Vorgaben abweichen, die unter *TESTVERFAHREN* angegeben sind, können falsche Ergebnisse auftreten.
- Das TMB-Substrat muss während der Lagerung und Inkubation vor Licht 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 (siehe *TESTVERFAHREN*, Schritt 8). 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. Reagenzien und Materialien vor dem Gebrauch auf 18°C bis 28°C bringen. Alle nicht benötigten Mikroassay-Teststreifen wieder in den Beutel legen, den Beutel verschließen und bei 2°C bis 8°C lagern.

ANZEICHEN FÜR INSTABILITÄTEN ODER ZERSETZUNGENVORGÄNGE DER REAGENZIEN

Eine Trübung oder Farbveränderung der verdünnten Waschlösung weist auf einen Zersetzungsprozess bei diesem Reagenz hin. In diesem Fall sollte die Lösung entsorgt werden.

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

Entnahme, Bearbeitung und Lagerung der Proben müssen fachgerecht durchgeführt werden, da bei einer unsachgemäßen Handhabung der Proben durch artefaktische Komplementaktivierung C5a gebildet werden kann.

Die Werte von normalen Serumproben sind üblicherweise höher als die von EDTA- oder Zitratplasmaproben. Die C5a-Konzentrationen in EDTA- oder Zitratplasma entsprechen daher u. U. in höherem Maße den *In-Vivo*-Konzentrationen.²⁵

Serum-, EDTA- oder Zitratplasmaproben sollten mit Hilfe eines Standardverfahrens unter keimfreien Bedingungen entnommen werden.⁽²⁶⁾ Die Proben sollten umgehend getestet oder bis zur Testdurchführung für maximal 4 Stunden bei 4°C oder auf Eis gelagert werden.

Kann eine Probe nicht innerhalb von vier Stunden nach den oben beschriebenen Richtlinien getestet werden, sollte sie bei –70°C oder tieferen Temperaturen eingefroren werden.

Humanserum- und Plasmaproben können auch mit einem **Probenstabilisator** (Artikelnr. A9576) präpariert werden. Mit diesem Produkt, das nur von Quidel erhältlich ist, muss die Probe vor dem Einfrieren im Verhältnis 1:1 verdünnt werden. Weitere Informationen zu diesem Probenstabilisator sind auf Anfrage erhältlich.

Auftauen eingefrorener Proben

Gefrorene Proben schnell bei 37°C bis kurz nach dem Auftaupunkt auftauen. Die aufgetauten Proben sofort auf Eis legen (nicht länger als acht Stunden), um Komplementaktivierung vor der Verdünnung zu vermeiden. Proben nicht bei 37°C aufbewahren, da sonst Komplementaktivierung auftreten kann. Proben nicht bei Raumtemperatur oder auf Eis auftauen, da dies zur C5-Aktivierung und damit zur Beeinträchtigung der Ergebnisse führen kann. Proben sollten unmittelbar nach dem Auftauen getestet werden. Bis zu 3 Gefrier-/Auftauzyklen durchgeführt werden, ohne dass die Proben beeinträchtigt werden. Falls Proben zur weiteren Analyse wieder eingefroren werden sollen, empfiehlt Quidel das Einfrieren mehrerer Proben-Aliquote, um wiederholte Gefrier-/Auftauzyklen zu vermeiden.

Probenverdünnung

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

HINWEIS: Wichtige Hinweise zum korrekten Auftauen gefrorener Proben sind unter *PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG* aufgeführt. Die korrekte Handhabung der Proben ist für präzise Ergebnisse unerlässlich. Quidel empfiehlt, normale Plasmaproben mit dem mitgelieferten Probenverdünnungsmittel im Verhältnis 1:20 zu verdünnen; Serumproben sollten im Verhältnis 1:50 verdünnt werden. Proben mit hohen C5a-Konzentrationen müssen u. U. im Verhältnis 1:200 oder stärker verdünnt werden. Die Proben **müssen** so weit verdünnt werden, dass die gemessenen E_{450} -Werte oberhalb der LLOQ (unteren Quantifikationsgrenze) liegen und den E_{450} -Wert von Standardlösung E des C5a-Kits nicht überschreiten. Proben, deren E_{450} -Werte außerhalb dieses Bereichs liegen, sollten in einem anderen Verdünnungsverhältnis neu getestet werden.

Die Anzahl (N) der zu testenden Proben bestimmen. Die Probenröhrchen 1 bis N beschriften und die Probedaten jedes Probenröhrchens schriftlich festhalten. Alle Proben mit Verdünnungsmittel auf ein geeignetes Verhältnis verdünnen (siehe vorherigen Absatz). Gründlich mischen, dabei jedoch die Bildung von Schaum und Blasen vermeiden. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden.

Hinzugeben der verdünnten Proben in die Mikrotiter-Vertiefungen

Die Zugabe der verdünnten Proben in die Mikrotiter-Vertiefungen muss innerhalb von 15 Minuten abgeschlossen sein. Eine der beiden nachfolgenden Methoden kann für die Zugabe der verdünnten Proben, Standardlösungen, Kontrollen und Puffer in die Vertiefungen verwendet werden (siehe Schritt 6 des *TESTVERFAHRENS*). In kleinen Testläufen, bei denen nur wenige Proben getestet werden, können die verdünnten Proben und anderen Reagenzien direkt in die zugeteilten Vertiefungen mit einer Mikropipette (100 μ L/Vertiefung) zugegeben werden. Bei großen Testläufen empfehlen wir den Gebrauch einer Mehrkanalpipette, um die Proben wie folgt zuzugeben.

Um die Standardlösungen, Kontrollen und verdünnten Proben so schnell wie möglich in die Vertiefungen zu geben, kann die „Replica-Plating“-Methode angewendet werden. Statt 100 μ L jeder Standardlösung, Kontrolle oder verdünnter Probe einzeln in die antikörperbeschichteten Vertiefungen zu geben, können 120-130 μ L jeder Lösung in die einzelnen Vertiefungen einer unbeschichteten Mikrotiterplatte (nicht im Lieferumfang enthalten) entsprechend dem gewünschten EIA-Endmuster gegeben werden. Nachdem alle zu testenden Lösungen in die Mikroassay-Vertiefungen der unbeschichteten Platte gegeben worden sind, zügig 100 μ L von jeder unbeschichteten Vertiefung in die antikörperbeschichteten Vertiefungen mit Hilfe einer Mehrkanalmikropipette transferieren. Um die Möglichkeit einer Kreuzkontamination zu vermeiden, müssen die Pipettenspitzen jedes Mal gewechselt werden, wenn sich die Zusammensetzung der zu übertragenden Proben verändert.

Das „Replica-Plating“-Verfahren ist auch für Zugabe von Konjugat, Substrat und Stopplösung geeignet.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien und Materialien vor dem Test auf 18°C bis 28°C bringen.

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

1. Standardlösungen und Kontrollen

Standardlösungen und Kontrollen müssen vor Verwendung nicht verdünnt oder zubereitet werden

2. Waschlösung

Die 20fach konzentrierte Waschlösung durch mehrfaches Umdrehen der Flasche mischen. Wenn die 20fach konzentrierte Waschlösung bei 2°C bis 8°C gelagert wurde, haben sich u. U. Kristalle gebildet. Zum Auflösen dieser Kristalle die Flasche in ein 37°C bis 50°C warmes Wasserbad stellen, bis sich alle Kristalle aufgelöst haben, und den Inhalt der Flasche anschließend sorgfältig mischen. Die Waschlösung vorbereiten, indem der gesamte Inhalt einer 20fach konzentrierten Waschlösungsflasche mit entionisiertem oder destilliertem Wasser auf 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.

3. Bereitstellen der Mikroassay-Teststreifen

Die für den Test erforderliche Anzahl der Teststreifen bestimmen. Es wird empfohlen, Blindvertiefungen, Kontrollen und Standardlösungen in Doppelbestimmungen zu testen. Die nicht benötigten Teststreifen entnehmen und in den Beutel legen. Den Beutel wieder verschließen und bei 2°C bis 8°C aufbewahren. Die für den Test zu verwendeten Teststreifen im Testplattenrahmen befestigen

TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

Siehe hierzu VORBEREITUNG DER REAGENZIEN und WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN.

1. Die Positionen der Blindvertiefungen, 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 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung zugegeben wird.
 - b. Zwei Minuten bei 18°C bis 28°C inkubieren.
 - c. Die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen.
 - d. Etwa 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung 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 kräftig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
3. Eine oder mehrere Vertiefungen als Blindvertiefung auswählen. 100 µL des Probenverdünnungsmittels in diejenige(n) Vertiefung(en) geben, die zur Bestimmung des Nullwertes des Plattenlesegeräts verwendet werden sollen (die sogenannten Blindvertiefungen).
4. Je 100 µL der C5a Standardlösungen (A, B, C, D und E) in die Doppelvertiefungen geben. **HINWEIS: Die Standardlösungen sind bereits verdünnt und können ohne weitere Vorbereitungen eingesetzt werden.**
5. Je 100 µL der niedrigen und der hohen C5a-Kontrolle in die Doppelvertiefungen geben. **HINWEIS: Die Kontrollen sind bereits verdünnt und können ohne weitere Vorbereitungen eingesetzt werden.**
6. Je 100 µL der verdünnten Proben in die entsprechenden Mikroassay-Vertiefungen geben (siehe *PROBENVERDÜNNUNGEN*).
7. Bei 18°C bis 28°C für 60 ± 1 Minuten inkubieren.
8. Die Mikroassay-Vertiefungen wie folgt waschen:
 - a. Nach der Inkubation von Schritt 7 (oder Schritt 10 - siehe unten) die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - b. Mit einer Waschflasche oder einem automatisierten Dosiergerät etwa 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - c. Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - d. Die Schritte b-c weitere vier Mal wiederholen.**

- e. Die Platte nach dem fünften Waschschrift umdrehen und zweimal vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
9. Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette jeweils 100 µL des C5a-Konjugats in jede gewaschene Testvertiefung, auch in die Blindvertiefung(en), geben.
 10. Die Mikroassay-Teststreifen bei 18°C bis 28°C für 60 ± 1 Minuten inkubieren.
 11. Die Mikroassay-Vertiefungen nach der 60-minütigen Inkubation (Schritt 10) wie in Schritt 8 unter *TESTVERFAHREN* beschrieben waschen.
 12. Unmittelbar nach dem Waschschrift je 100 µL Substratlösung in jede Vertiefung, auch in die Blindvertiefung(en), geben.
 13. Die Mikroassay-Teststreifen bei 18°C bis 28°C für 15 (± 1) Minuten inkubieren.
 14. Je 100 µL Stopplösung zum Stoppen der enzymatischen Reaktion in jede Vertiefung geben. Die Zugabe der Stopplösung in die Vertiefungen sollte in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgen wie bei der Zugabe der Substratlösung. Die Platte vorsichtig antippen, damit sich die Farbentwicklung gleichmäßig verteilt. **HINWEIS: Optimale Ergebnisse werden durch die Anwendung der automatischen Mischfunktion (falls vorhanden) direkt vor dem Ablesen der Mikroassay-Platte erreicht.**
 15. Innerhalb von 60 Minuten nach Zugabe der Stopplösung (Schritt 14) die Extinktion der Testvertiefungen bei 450 nm bestimmen (E_{450} -Wert) und eine Blindwertkorrektur vornehmen.
 16. Die Konzentration der Proben und Kontrollen anhand der Standardkurve bestimmen.
 17. Die übrigen verdünnten Proben und Kontrollen sowie die benutzten Mikroassay-Teststreifen entsorgen. (siehe *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*).

QUALITÄTSKONTROLLE

Gemäß guter Laborpraxis sollten Kontrollen verwendet werden, um die Richtigkeit der Testergebnisse zu gewährleisten. Zu diesem Zweck enthält jedes C5a-Kit hohe und niedrige Kontrollen. Die im Rahmen der Qualitätskontrolle zu verwendenden Bereiche sind angegeben. Die Kontrollwerte haben die Aufgabe, die Gültigkeit der Kurve und der Probenergebnisse zu bestätigen. Jedes Labor sollte eigene Kriterien für akzeptable Testlimits erstellen. Wenn die Kontrollwerte NICHT innerhalb des Akzeptanzbereichs Ihres Labors liegen, sollten die Testergebnisse in Frage gestellt und die Proben erneut getestet werden. Zudem wird in der Packungsbeilage vorausgesetzt, dass die mit den Standardlösungen des Testkits erstellte Standardkurve, strengen Validierungsanforderungen gerecht wird. Erfüllt der Test diese Anforderungen nicht, den Test wiederholen oder den technischen Kundendienst von Quidel verständigen.

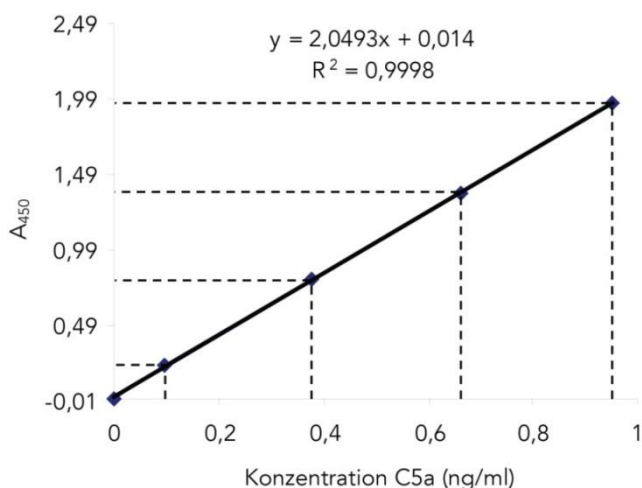
Das diesem Testkit beiliegende Analysezertifikat ist chargenspezifisch und soll sicherstellen, dass die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse denen der Quidel Corporation entsprechen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Berechnung der Ergebnisse

Verwendung der Standardkurve: Die Standardkurve des C5a EIA wird mit den Blindwert-korrigierten E_{450} -Werten der verschiedenen Standardlösungen (auf der y-Achse) und den bekannten Konzentrationen der Standardlösungen (auf der x-Achse) erstellt. Die Standardkurve muss den Validierungsanforderungen gerecht werden. Diese Berechnungen werden von den meisten Rechnern und Taschenrechnern unterstützt. Ein Beispiel einer typischen Standardkurve ist in Abbildung 1 dargestellt.

Abbildung 1
Typische Standardkurve



Probe	E ₄₅₀	ng/ml
Standardlösung A	-0,001	0
Standardlösung B	0,225	0,095
Standardlösung C	0,789	0,378
Standardlösung D	1,369	0,661
Standardlösung E	1,965	0,953
r = 0,9998	m = 2,0493	b = 0,014

Berechnung der tatsächlichen C5a-Konzentration in den Proben

Bei den Konzentrationen, die auf den Fläschchen der Standardlösungen und Kontrollen angegeben sind, handelt es sich um absolute Konzentrationen des C5a-Komplexes. Die in einer Probe vorliegende C5a-Konzentration wird berechnet, indem die gemessene Konzentration mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Probe multipliziert wird. Wurde z. B. für eine EDTA-Plasmaprobe, die für den Test im Verhältnis 1:20 verdünnt wurde, anhand der Regressionsgeraden eine Konzentration von 0,5 ng C5a/ml ermittelt, dann entspricht dies einer C5a-Konzentration in der Probe von 10 ng C5a/ml (oder 20 x 0,5).

Um für Proben mit E₄₅₀-Werten, die über dem E₄₅₀-Wert der C5a-Standardlösung E (oder unter dem E₄₅₀-Wert der LLOQ) liegen, genaue C5a-Konzentrationen zu erhalten, sollten die Proben mit einem anderen Verdünnungsverhältnis erneut getestet werden, so dass ihre neuen E₄₅₀-Werte innerhalb dieser Grenzwerte liegen. Bei allen Testwiederholungen müssen auch die C5a-Standardlösungen und Kontrollen gemessen werden.

Validierung

Die Steigung, den Schnittpunkt mit der y-Achse und den Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden bestimmen, die für die C5a-Standardlösungen A, B, C, D und E berechnet wurden. Die Werte müssen innerhalb der folgenden Bereiche liegen, damit der Test gültig ist:

korrelationskoeffizient (r): > 0,98
steigung (m): 1,14-2,50
y-schnittpunkt (b): (-)0,0145 bis (+)0,0532

Der zulässige C5a-Konzentrationsbereich ist für die niedrigen und hohen Kontrollen auf den Fläschchen angegeben.

GRENZEN DER METHODE

Der MicroVue C5a Enzymimmunoassay wurde zum Testen von Proben eingesetzt, die als Serum oder Plasma in EDTA und Zitrat vorlagen. Andere Antikoagulanzen wurden nicht untersucht.

GEMESSENE WERTE

EDTA-Plasma- und Serumproben von zwanzig (20) augenscheinlich normalen, gesunden Spendern wurden mit dem MicroVue C5a Enzymimmunoassay getestet. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

	n	Mittelwert (ng/ml)	Bereich (ng/ml)
EDTA-Plasma	20	20,65	0,37 bis 74,33
Serum	20	50,09	13,37 bis 179,23

ACHTUNG: Die C5a-Konzentrationen, die in Plasma- oder Serumproben gemessen werden, können von Labor zu Labor variieren. Daher wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Bereich bestimmt. Die oben aufgeführten Konzentrationen sollten nur als Richtwerte dienen.

LEISTUNGSMERKMALE DES TESTS

Grenzen

Nachweisgrenze: Die Nachweisgrenze (LOD) des C5a-Tests liegt bei 0,01 ng/ml und wurde im Rahmen einer Nullstandardstudie an der 3fachen Standardabweichung festgelegt.

Untere Bestimmungsgrenze: Die untere Quantifikationsgrenze (LLOQ) des C5a Assays liegt bei 0,050 ng/ml. Dies entspricht der niedrigsten Konzentration der Standardkurve, die den NCCLS-Kriterien für Genauigkeit und Präzision noch gerecht wird.

Störsubstanzen

Die folgenden Substanzen wurden mit den angegebenen Konzentrationen getestet. Sie stellen keine Störung für den C5a Assay dar:

Substanz	Konzentration
Bilirubin	40 mg/dl
Hämoglobin	500 mg/dl
Triglyzerid	3000 mg/dl
Na + Heparin	14 U/ml
C5-Protein	80 mg/l
Glukose	1000 mg/dl
Cholesterol	500 mg/dl

Eine nachweisliche Störung bei der Quantifikation im Assay trat bei unverdünnten Proben mit Albuminkonzentrationen > 118,6 mg/dl oder Gammaglobulinkonzentrationen > 8,9 mg/dl auf. Derartige Proben sind entsprechend weiter zu verdünnen. .

Präzision

Die Präzision „in der Serie“ und „von Serie zu Serie“ wurde für 20 Replikate von 2 Plasmaproben und 2 Serumproben in 10 verschiedenen Testserien ermittelt.

Probe	C5a (ng/ml)	in der Serie ¹ C.V. (%)	von Serie zu Serie ² C.V. (%)
EDTA-Plasma	12,34	3,8	9,9
	1,41	3,9	13,0
Serum	30,13	3,6	7,1
	21,92	3,5	7,8

¹n = 20 replikate ²n = 10 testserien

Linearität

Die Linearität wurde ermittelt, indem eine serielle Verdünnungsreihe der Proben erstellt wurde und die gemessenen Werte mit den erwarteten Werten verglichen wurden.

Probe	Verdünnungsfaktor	Gefundenes C5a (ng/ml) ³	Erwartetes C5a (ng/ml) ³	Wiederfindung (%)
EDTA-Plasma	10	1,214	1,266	96%
	20	0,667	0,633	105%
	40	0,343	0,317	108%
	80	0,164	0,158	103%
	160	0,077	0,079	98%
	320	0,035	0,040	88%
Serum	25	0,873	0,864	99%
	50	0,465	0,432	93%
	100	0,236	0,216	92%
	200	0,115	0,108	94%
	400	0,054	0,054	100%
	800	0,024	0,027	113%

³Verdünnungsfaktor nicht eingerechnet

KUNDENDIENST

Auskunft über das Serviceangebot außerhalb der USA erhalten Sie von Ihrer Vertretung vor Ort. Zusätzliche Informationen zu Quidel, den Produkten und Vertretungen finden Sie auf der Website quidel.com.

LITERATUR

1. Tack, Brian F., Sam C. Morris, and James W. Prahl. "Fifth component of human complement: purification from plasma and polypeptide chain structure." *Biochemistry* 18(8) (1979): 1490-1497.
2. Guo, Ren-Feng and Peter A. Ward. "Role of C5a in Inflammatory Responses." *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005): 821-852.
3. Hugli, T. E. "Biochemistry and biology of anaphylatoxins." *Complement* 3(3) (1986): 111-127.
4. Yancey, K. B. "Biological properties of human C5a: selected *in vitro* and *in vivo* studies." *Clin. Exp. Immunol.* 71 (1988): 207-210.
5. Hoenich, Nicholas A. and Kostas P. Katopodis. "Clinical characterization of a new polymeric membrane for use in renal replacement therapy." *Biomaterials* 23(18) (2002): 3853-3858.
6. Christine S. Rinder et al. "Selective blockade of membrane attack complex formation during simulated extracorporeal circulation inhibits platelet but not leukocyte activation." *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 118(3) (1999): 460-466.

7. Smith, Brian Richard, Henry M. Rinder, and Christine S. Rinder. "Interaction of Blood and Artificial Surfaces." *Thrombosis and Hemorrhage*, 3rd ed. Eds. J. Loscalzo and A. I. Schafer. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 865-885.
8. Yvan Gasche et al. "Complement depletion during haemofiltration with polyacrylonitrile membranes." *Nephrol. Dial. Transplant* 11 (1996): 117-119.
9. Claudia Sperling et al. "In vitro blood reactivity to hydroxylated and non-hydroxylated polymer surfaces." *Biomaterials* 2007, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.041.
10. Frangogiannis, Nikolaos G., Wayne C. Smith, and Mark L. Entman. "The inflammatory response in myocardial infarction." *Cardiovascular Res.* 53 (2002): 31-47.
11. Walter S. Speidl et al. "Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis." *Euro. Heart Journal* 26 (2005): 2294-2299.
12. Langlois, Paul F. and Maria S. Gawryl. "Detection of the terminal complement complex in patient plasma following acute myocardial infarction." *Atherosclerosis* 70 (1988): 95-105.
13. Jawed Fareed et al. "Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes." *Clin. Chem.* 48(8) (1998): 1845-1853.
14. Antti P. Vakeva et al. "Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: Role of the Terminal Complement Components and inhibition by anti C5 therapy." *Circulation.* 97 (1998): 2259-2267.
15. Thiruma V. Arumugam et al. "Intravenous immunoglobulin (IVIg) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death." *PNAS* 104(35) (2007): 14104-14109. doi:10.1076/pnas.0700.506.104.
16. Van Beek, Johan, Kristina Elward, and Philippe Gasque. "Activation of Complement in the Central Nervous System: Roles in Neurodegeneration and Neuroprotection." *Ann. NY Acad. Sci.* 992 (2003): 56-71.
17. Sheerin, N. S. and S. H. Sacks. "Leaked protein and interstitial damage in the kidney: is complement the missing link?" *Clin. Exp. Immunol.* 130 (2002): 1-3.
18. T. R. Welch et al. "C5a is important in the tubulointerstitial component of experimental immune complex glomerulonephritis." *Clin. Exp. Immunol.* 130 (2002): 43-48.
19. Thomas Muller et al. "Detection of renal allograft rejection by complement components C5a and TCC in plasma and urine." *J. Lab. Clin. Med.* 129 (1997): 62-71.
20. A. Conroy et al. "C5a Enhances Dysregulated Inflammatory and Angiogenic Responses to Malaria *In vitro*: Potential Implications for Placental Malaria." *PLoS ONE* 4(3) 2009: e4953. doi:10.1371/journal.pone.0004953.
21. A. Bengtsson et al. "Anti-TNF Treatment of Baboons with Sepsis Reduces TNF- α IL-6 and IL-8, but not the Degree of Complement Activation." *Scand. J. Immunol.* 48 (1998): 509-514.
22. Haas, Pieter-Jan and Jos van Strijp. "Anaphylatoxins: Their Role in Bacterial Infections and Inflammation." *Immunol. Res.* 37(3) (2007): 161-175.
23. Ren-Feng Guo et al. "In vivo regulation of neutrophil apoptosis by C5a during sepsis." *J. Leukoc. Biol.* 80(6) (2006): 1575-1583.
24. Ward, Peter A. "Role of the complement in experimental sepsis." *J. Leukoc. Biol.* 83(3) (2008): 467-470.
25. Mollnes, T. E., P. Garred, and G. Bergseth. "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. Immunol.* 73(3) (1988): 484-488.
26. Centers for Disease Control. "Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings." *MMWR.* 1987 36 (suppl. No. 2S):001.

REF A025 – MicroVue C5a EIA Kit

IVD





MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PIA025001DE00 (02/17)

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

IVD

Zur *In-vitro*-Diagnostik



Inhalt ist ausreichend für 96 Bestimmungen

CONT

Inhalt/Enthält

CONTROL

Kontrolle
