

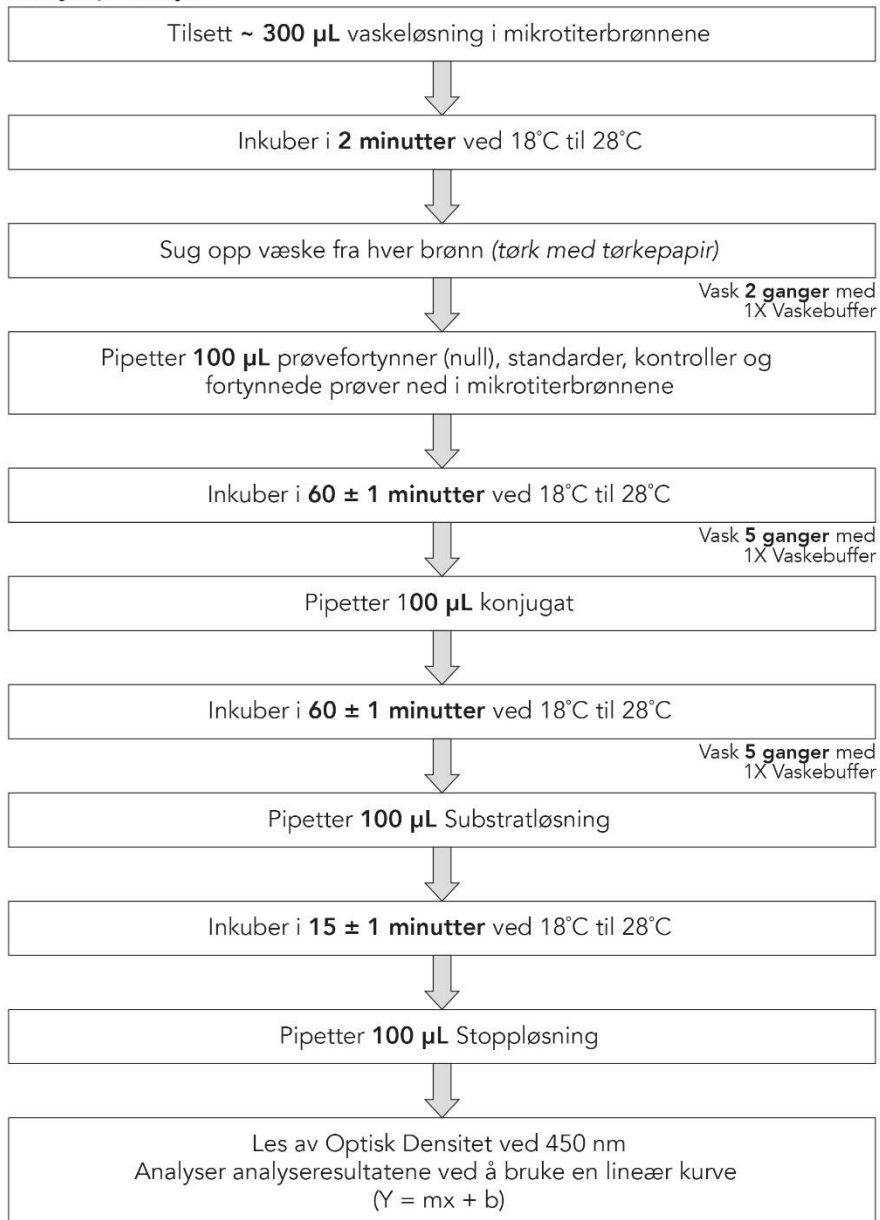
MicroVue C5a-enzymimmunananalysen måler mengden C5a i humant serum

SAMMENDRAG

Forberedelse av reagens og prøve

- Fortynn den konsentrerte vaskeløsningen 1:20 med ikke- ionisert vann.
- Fortynn serumprøver 1:50 med komplement prøvefortynner (f. eks. 10 μL + 490 μL).
- Fortynn plasmaprøver 1:20 med komplement prøvefortynner (f. eks. 20 μL + 380 μL).

Analyseprosedyre





BRUKSOMRÅDE

MicroVue C5a-enzymimmunanalysen måler mengden C5a i humant serum eller plasma.

SAMMENDRAG OG FORKLARING

MicroVue C5a-enzymimmunanalysen er en immunanalyse med 96 brønner, for direkte måling av C5a i humant serum eller plasma.

Under normale forhold fører aktivering av de klassiske, alternative eller lectin komplementbanene til dannelse av et C5 konvertase, multimolekylært enzym som er i stand til å spalte C5 til C5a og C5b.^{1,2} C5b er en viktig bestanddel i det terminale komplementkomplekset og har mange forskjellige funksjoner i denne sammenheng. C5a er et proteinfragment på 74 aminosyrer, og har lav molekylvekt (ca. 9kD).³ C5a blir raskt omdannet av serumenzymet karboksypeptidase til en mer stabil og mindre aktiv form på 73 aminosyrer, C5a des-Arg.^{2,3} For enkelhets skyld vil begge former bli kalt "C5a" når det gjelder innholdet i dette dokumentet.

MicroVue C5a analysen, som er en rask og høyst spesifikk og kvantitativ prosedyre for å måle C5a-nivåer, er beregnet til bruk for undersøkelse av hvilken rolle eller status aktivering av den terminale komplementbane har, i tallrike forskningsmiljøer, og for å undersøke utvikling av C5a *in vivo* eller *in vitro*.⁴ Som det mest potente av komplement anafylatoksinene har C5a en biologisk vertsfunksjon² som omfatter degranulering av mastceller, kjemotaksis isolasjon av hvite blodlegemer, aktivering av celler gjennom binding til C5a- reseptoren² (C5aR eller CD88). Forskning har forbundet forhøyede nivåer av C5a i flytende fase eller adsorbent, med hemoinkompatibilitet for noen typer biomateriale, spesielt i ekstrakorporale kretsløp.⁵⁻⁹ Forskning har også forbundet C5a med patogenese ved en rekke sykdomstilstander som for eksempel hjerteinfarkt¹⁰⁻¹⁴, slag^{15,16}, samt vaskulært lekkasjesyndrom med nyreskade¹⁷⁻¹⁹. C5a's rolle i patogenesen ved malaria²⁰ og andre smittsomme sykdommer, samt sepsis,²¹⁻²⁴ er også vel dokumentert.

PROSEDYREPRINSIPP

MicroVue C5a enzymimmunanalysen er en tretrinnsprosedyre som (1) bruker en mikrotiterplate dekket med monoklonalt antistoff fra mus spesifikt for en neo-epitop på humant C5a, (2) et HRP-konjugert murint monoklonalt antistoff mot C5a-delen av C5, og (3) et kromogent substrat.

I det første trinnet tilsettes standard, kontroller og fortynnede testprøver i analysebrønnene som er dekket med murint monoklonalt antistoff mot C5a. Det monoklonale antistoffet binder seg til C5a i standarder, kontroller eller prøven. Etter en inkubasjonsperiode fjernes eventuelt ubundet materiale med vask.

I det andre trinnet tilsettes pepperrotperoksidasekonjugert (HRP) murint anti-C5(C5a) i alle analysebrønnene. Det enzymkonjugerte anti-C5(C5a) binder seg til det fikserte C5a som ble festet i første trinn. Etter en inkubasjonsperiode vaskes eventuelt ubundet konjugat vekk.

I det tredje trinnet tilsettes 3,3',5,5' tetrametylbenzidin (TMB), som er en kromogen substratløsning ferdig til bruk, i analysebrønnene. Det bundne HRP reagerer med substratet og danner en blå farge. Etter en inkubasjonsperiode stoppes reaksjonen kjemisk, noe som fører til at fargen endrer seg fra blå til gul. Dette bekrefter at reaksjonen har funnet sted. Fargeintensiteten måles spektrofotometrisk ved A₄₅₀. Fargeintensiteten i reaksjonsblandingen er proporsjonal med konsentrasjonen av C5a som finnes i testprøvene, standardene og kontrollene. Resultatene beregnes ut fra en standardkurve som bruker lineær regresjonsanalyse.

REAGENSER OG MATERIALER SOM LEVERES

96 Analyser for C5a kompleks

MicroVue C5a EIA-settet inneholder følgende:

A C5a standarder	Del 5131 – 5135	1 hver på 1,5 ml
B Ferdig til bruk. Inneholder humant serum med fastsatt C5a konsentrasjon (ng/ml), protein		
C stabilisatorer		
D		
E		
L Lav kontroll	Del 5136	1,5 ml
Ferdig til bruk. Inneholder humant serum med fastsatt C5a konsentrasjon (ng/ml), protein stabilisatorer		
H Høy kontroll	Del 5137	1,5 ml
Ferdig til bruk. Inneholder humant serum med fastsatt C5a konsentrasjon (ng/ml), protein stabilisatorer		
1 Dekkede strimler	Del 5129	12 hver
åttebrønners strimler dekket med et murint monoklonalt antistoff i en foliepose som kan forsegles		
2 Stoppløsning	Del A9947	12 ml
Inneholder 1N (4%) saltsyre		
3 20X vaskeløsningskonsentrat	Del A9957	2 hver på 50 ml
Inneholder fosfatbufret saltløsning (PBS), 1,0% Tween-20®, and 0,035% Proclin® 300		
4 Komplementprøvefortynner	Del A3670	50 ml
Inneholder PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% proteinstabilisatorer, 0,035% Proclin 300		
5 TMB substrat	Del 5059	12 ml
Ferdig til bruk. Inneholder 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB)		
6 Konjugat	Del 5130	12 ml
Inneholder pepperrotperoksidase konjugert murint monoklonalt antistoff mot C5a		

Tween-20® er et registrert varemerke fra ICI Americas Inc.
ProClin® er et registrert varemerke fra Rohm and Haas Company.

NØDVENDIG MATERIALE SOM IKKE LEVERES

- Signalur (for 60 minutter)
- Kalkulator eller annen datametode til å validere analysresultater
- Rene, ubrukte mikrotiterplater og/eller prøverør og stativ
- Måleglass for vaskebufferløsning
- Vaskeflaske eller annet utstyr for vasking mikrotiterplater
- Justerbar multikanalpipette (8 eller 12 kanaler) eller mikropipetter for flergangsbruk (valgfritt)
- Rene pipetter, 1 ml, 5 ml, og 10 ml
- Mikropipetter og sterile, engangs pipettespisser
- Plateavleser med kapasitet for avlesning av A_{450} optisk densitet mellom 0,0 og 3,0
- Ikke-ionisert eller destillert vann

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

- For in vitro-diagnostisk bruk.
- Ikke for salg eller bruk i USA eller Canada.
- Håndter prøvemateriale som potensielt smittefarlig.
- Følg generelle forholdsregler når du håndterer innholdet i dette settet og alle pasientprøvene.
- Bruk de reagensene som er levert som en vesentlig del før utløpsdatoen som er angitt på pakningen.
- Oppbevar analysereagensene slik som anvist.

- Ikke bruk dekkede strimler hvis det er gått hull på posen.
- ProClin 300 brukes som konserveringsmiddel. Utsiktet kontakt med eller inntak av buffere eller reagenser som inneholder ProClin kan forårsake irritasjon i huden, øynene eller munnen. Bruk god laboratoriepraksis for å redusere faren for å bli utsatt. Kontakt lege hvis du får symptomer.
- Stoppløsningen betraktes som etsende og kan forårsake irritasjon. Må ikke tas inn. Unngå kontakt med øyne, hud og klær. Hvis det allikevel skjer, skyl umiddelbart det berørte området med vann. Kontakt lege hvis du har fått det i deg.
- Hver blodgiverenhet som er brukt til fremstilling av standarder og kontrollsera i dette produktet ble testet med en FDA-godkjent metode for påvisning av antistoff mot humant immunsviktvirus (HIV1 og HIV2) og mot hepatitt C-virus, samt for hepatitt B overflateantigen. Siden ingen testmetode helt kan garantere fullstendig fravær av smittefarlige stoffer, skal disse reagensene håndteres med grad 2 for biologisk sikkerhåndtering, slik som anbefalt for alt potensielt smittefarlig humant serum eller blodprøver i "Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual" "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2007.
- For å sikre tidsnok fordeling av reagenser anbefales bruk av multikanal pipetter eller pipetter for flergangsbruk.
- For å oppnå nøyaktig måling av prøvene, må prøver og standarder tilsettes nøyaktig. Pipetter forsiktig med kalibrert utstyr.
- For å oppnå nøyaktige resultater er riktig innsamling og oppbevaring av prøvemateriale svært viktig (se *HÅNDTERING OG FORBEREDELSE AV PRØVEMATERIALE*).
- Unngå mikrobiell eller krysskontaminering av prøvemateriale og reagenser.
- Test hver prøve i duplikat.
- Ikke bruk en mikrotiterbrønn for mer enn en test.
- Hvis man bruker andre inkubasjonstider og temperaturer enn de som er oppgitt i prosedyreavsnittet, kan det gi feilaktige resultater.
- TMB-substratet må beskyttes mot lys under oppbevaring og inkubasjon. Unngå kontakt med øyne, hud og klær. Hvis du allikevel får det på deg, skyl umiddelbart med vann.
- Ikke la mikrotiterbrønnene tørke når analysen har begynt.
- Ikke skrap eller rør bunnen av mikrotiterbrønnene når du fjerner væske.
- Prøver som er inaktivert ved oppvarming, er hyperlipemiske eller er forurenset kan gi feilaktige resultater.
- For å unngå at det dannes aerosol under vaskingen bør man bruke utstyr til å suge vaskeløsningen opp i en flaske som inneholder husholdningsblekemiddel.
- Man bør bruke en vaskeflaske eller automatisk fyllingsutstyr for å vaske platene (*ANALYSEPROSEDYRE*, trinn 8). For å oppnå best resultater skal man ikke bruke en multikanals pipette for å vaske mikrotiterplatene.
- Testing skal utføres i et område med god ventilasjon.
- Kast beholdere og ubrukt innhold i henhold til føderale, statlige og lokale myndighetskrav.
- Bruk egnede verneklær, hansker og beskyttelse for øyne og ansikt når du håndterer innholdet i dette settet.
- Vask hendene grundig etter håndtering.
- Hvis du ønsker mer informasjon om faresymboler, sikkerhet, håndtering og kassering av komponentene i dette settet, se sikkerhetsdatabladet på quidel.com.

OPPBEVARING

Et uåpnet sett skal oppbevares ved 2°C til 8°C. Reagenser og materiale som skal brukes må komme opp i 18°C til 28°C før bruk. Legg alle ubrukte mikrotiterstrimler i oppbevaringsposen, forsegl den igjen og oppbevar den ved 2°C til 8°C.

TEGN PÅ USTABILITET ELLER FORRINGELSE AV REAGENSER

Hvis den fortynnede vaskeløsningen er uklar eller misfarget, tyder det på forringelse av denne reagensen. Hvis dette inntreffer, skal vaskeløsningen kasseres.

HÅNDTERING OG FORBEREDELSE AV PRØVEMATERIALE

Håndter og kast alt prøvemateriale ved å følge generelle forholdsregler.

All håndtering av prøvemateriale skal foregå ved 2°C til 8°C.

Innsamling av prøvemateriale

Riktig innsamling, forberedelse og oppbevaring av prøvemateriale er viktig siden C5a kan utvikle seg i feilaktig håndtert prøvemateriale ved kunstig aktivert komplement.

Det er typisk at verdiene for normale serumprøver er høyere enn de man oppnår med EDTA eller citrerte, normale plasmaprøver. C5a-nivåene i EDTA eller citrert plasma kan derfor nøyaktigere vise *in vivo*-konsentrasjonene.²⁵

Serum-, EDTA-, eller citrerte plasmaprøver bør tas aseptisk ved hjelp av standardteknikker.⁽²⁶⁾ Prøvene bør testes umiddelbart eller oppbevares ved 4°C eller legges på is, men ikke lenger enn fire timer før de skal analyseres.

Hvis prøvematerialet ikke kan analyseres innen fire timer i overensstemmelse med de retningslinjer som er nevnt ovenfor, skal prøvematerialet fryses ved -70°C eller lavere.

En **Prøvestabiliserende Løsning** (artikkel nr. A9576) kan også brukes for å klargjøre humane serum- og plasmaprøver for oppbevaring. Riktig bruk av dette produktet, som bare kan fås fra Quidel, krever at prøven blandes 1:1 med løsningen før den fryses ned. Ytterligere teknisk informasjon om løsningen kan man få ved forespørsel.

Tining av frosne prøver

Tin frosne hurtig ved 37°C til de er akkurat tint. Legg de tinte prøvene på is med engang (men ikke lenger enn åtte timer) for å hindre komplementaktivering før fortykning. Ikke la prøvene ligge ved 37°C, da komplementaktivering kan forekomme. Ikke tin prøver ved romtemperatur eller på is da dette kan føre til aktivering av C5 og påvirke resultatene. Prøver må testes så snart som mulig etter at de er tint. Prøvene kan fryses/tines opp til 3 ganger uten at det påvirker dem. Hvis prøvene skal fryses igjen for senere analyser, foreslår Quidel å dele opp prøvene i flere deler for å unngå gjentatt frysing og tining.

Fortynning av prøver

ADVARSEL: Håndter alt prøvemateriale som potensielt smittefarlig. Følg generelle forholdsregler. Ikke bruk prøvemateriale som er inaktivert ved oppvarming, forurenset eller oppbevart feilaktig.

MERK: Se INNSAMLING og OPPBEVARING AV PRØVEMATERIALE for viktig informasjon om riktige måter å tine frossent prøvemateriale på. Nøyaktige resultater er avhengig av at prøvematerialet håndteres riktig.

Quidel foreslår at normale plasmaprøver fortyknes 1:20 i den prøvefortynningsløsningen som er levert; serumprøver bør fortyknes 1:50. En fortykning på 1:200, eller mer kan være nødvendig for en prøve med høye C5a-verdier. Prøver **må** fortyknes slik at de A_{450} verdiene man ser er over LLOQ og ikke er høyere enn A_{450} verdien for C5a standard E. Prøver med A_{450} avlesninger utenfor dette området skal analyseres om igjen med en ny fortykning.

Bestem antall (N) prøver som skal testes. Merk reagensglassene #1 til og med #N, og noter hvilken prøve som hører til hvert enkelt glass. Gjør klar en passende fortykning (se foregående avsnitt) av alle prøvene ved å bruke prøvefortynningsløsningen. Bland grundig, men unngå at det skummer og blir bobler. Fortynnede prøver skal ikke oppbevares og brukes om igjen.

Tilsetting av fortynnede prøver i mikrotiterbrønnene.

Tilsetting av fortynnede prøver må være ferdig innen 15 minutter etter tilsetting i den første prøven. En av to metoder kan brukes for å tilsette fortynnede prøver, standarder, kontroller og buffer i brønnene (se trinn 6 i *ANALYSEPROSEDYRE*). For små analyser der bare noen få prøver skal testes, kan de fortynnede prøvene og andre reagenser tilsettes direkte i de respektive brønnene med en mikropipette (100 µL/brønn). For små eller store analyser, men spesielt for store analyser, anbefaler vi at man bruker en multikanalpipette for tilsetting av prøver, slik som beskrevet i det følgende.

For å fordele standarder, kontroller og fortynnede prøver i mikrotiterbrønnene så raskt som mulig, kan man bruke en "kopiplate"-prosedyre. I stedet for å tilsette 100 µL av hver standard, kontroll eller fortynnede prøve i hver enkelt av brønnene som er dekket med antistoff, kan man tilsette 120-130 µL av hver løsning i hver enkelt brønn på en tom plate (ikke levert) som stemmer overens med det endelige EIA-mønsteret som man ønsker. Etter at alle løsningene som skal testes er fordelt i mikrotiterbrønnene på den tomme platen, overfører man raskt 100 µL fra hver nullbrønn til de brønnene som er dekket med antistoff ved å bruke en multikanalpipette. For å unngå mulig kryssforurensning må pipettespissene byttes hver gang sammensetningen av prøvene som skal overføres, er en annen.

Det er også praktisk å bruke "kopiplate"-prosedyren for å fordele konjugat, substrat og stoppløsning.

KLARGJØRING AV REAGENSER

La alle reagenser og utstyr komme opp i 18°C til 28°C før bruk.

Etter å ha tatt ut reagenser og utstyr som skal brukes legges det ubrukte materialet tilbake for oppbevaring i riktig temperatur (se *OPPBEVARING*).

1. Standarder og Kontroller

Det er ikke nødvendig å fortynne eller klargjøre standarder og kontroller før bruk.

2. Vaskeløsning

Bland den 20X konsentrerte vaskeløsningen ved å snu flasken opp ned flere ganger. Hvis den 20X konsentrerte vaskeløsningen har vært oppbevart ved 2°C til 8°C, kan det ha dannet seg krystaller. For å løse opp krystallene legges flasken i et vannbad på 37°C til 50°C til alle krystallene er oppløst. Deretter blandes innholdet grundig. Klargjør vaskeløsningen ved å fortynne hele innholdet i en av flaskene med den 20X konsentrerte vaskeløsningen opp til en liter med destillert eller ikke-ionisert vann. Bland grundig. Vaskeløsningen er holdbar i 30 dager hvis den oppbevares i en ren beholder ved 2°C til 8°C. Hvis reagensen blir misfarget eller uklar, skal den kastes.

3. Velge mikrotiterstrimler

Bestem antall strimler som kreves for analysen. Det anbefales at tomme brønner, kontroller og standarder testes i duplikat. Fjern de strimlene som ikke brukes og legg dem i oppbevaringsposen, forsegl den igjen og legg den til oppbevaring ved 2°C til 8°C. Fest de strimlene som skal brukes under analysen i platerammen.

ANALYSE PROSEDYRE

Les hele pakningsvedlegget før du begynner med analysen.

Se *KLARGJØRING AV REAGENSER og ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER*.

1. Noter plasseringene på mikrotiterbrønnene som tilsvarer nullbrønn(er), av alle prøver som skal testes, standarder og kontroller, samt varepartinumrene som er angitt på hetteglassetikettene. Merk av et hjørne på mikrotiterplaten til orientering.
2. Klargjør mikrotiterstrimlene på følgende måte:

- a. Hydratiser mikrotiterbrønnene igjen ved å tilsette ca. 300 µL vaskeløsning i hver brønn ved å bruke en vaskeflaske eller automatisk fyllingsutstyr.
 - b. Inkuber ved 18°C til 28°C i to minutter.
 - c. Fjern væsken fra alle brønnene.
 - d. Tilsett ca. 300 µL vaskeløsning i hver brønn.
 - e. Fjern væsken fra alle brønnene.
 - f. Gjenta trinn d-e en gang til slik at det blir totalt tre vaskeomganger.**
 - g. Snu platen opp ned og slå den lett og fast mot tørkepapir to ganger for å fjerne eventuell gjenværende væske.
3. Velg ut en eller flere brønner som skal tjene som nullbrønn. Tilsett 100 µL av prøvfortynning i de(n) brønn(ene) som skal brukes som nullbrønn for plateavleseren.
 4. Tilsett 100 µL av hver C5a standard (A, B, C, D, E) i duplikatbrønnene. **MERK: Standardene er allerede fortynnet og er ferdig til bruk.**
 5. Tilsett 100 µL av både C5a lav kontroll og C5a høy kontroll i duplikatbrønnene. **MERK: Kontrollene er allerede fortynnet og er ferdig til bruk.**
 6. Tilsett 100 µL av hver fortynnete prøve i de respektive brønnene. (Se *PRØVEFORTYNNING*).
 7. Inkuber ved 18°C til 28°C i 60 ± 1 minutter.
 8. Vask mikrotiterbrønnene som følger:
 - a. Etter inkubasjonen i trinn 7 (eller i trinn 10 nedenfor) fjernes væsken fra alle brønnene.
 - b. Tilsett ca. 300 µL vaskeløsning i hver brønn ved å bruke en vaskeflaske eller automatisk fyllingsutstyr.
 - c. Fjern væsken fra alle brønnene.
 - d. Gjenta trinn b-c fire ganger til.**
 - e. Etter den femte vaskeomgangen snus platen opp ned, og slås lett og fast mot tørkepapir to ganger for å fjerne eventuell gjenværende væske.
 9. Ved å bruke en multikanalpipette eller pipette til flergangsbruk fordeles 100 µL av C5a konjugat i alle de vaskede testbrønnene, også nullbrønnen(e).
 10. Inkuber mikrotiterstrimlene ved 18°C til 28°C i 60 ± 1 minutter.
 11. Vask mikrotiterbrønnene etter 60 minutters inkubasjon (trinn 10), slik som beskrevet under *ANALYSEPROSEDYRE*, trinn 8.
 12. Umiddelbart etter vaskeprosedyren fordeles 100 µL av substratløsningen i hver brønn, også nullbrønnen(e).
 13. Inkuber mikrotiterstrimlene ved 18°C til 28°C i 15 ± 1 minutter.
 14. Tilsett 100 µL stoppløsning i hver brønn for å stoppe den enzymatiske reaksjonen. Stoppløsningen skal tilsettes brønnene i samme rekkefølge og med samme fordelingshastighet som substratløsningen. Slå forsiktig på platen slik at fargeutviklingen fordeler seg jevnt. **MERK: Man kan oppnå optimale resultater hvis man bruker plateavleserens automatiske blandefunksjon (hvis den finnes) like før man leser av platen.**
 15. Bestem absorbanse ved avlesning ved 450 nm (A_{450} verdi) for hver testbrønn innen 60 minutter etter tilsetting av stoppløsningen (trinn 14), og utfør den nødvendige nullkorreksjonen.
 16. Bestem konsentrasjonen av prøver og kontroller ut fra standardkurven.
 17. Kast det som er igjen av fortynnete prøver, kontroller og brukte mikrotiterstrimler (se *ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER*).

KVALITETSKONTROLL

God laboratoriepraksis anbefaler bruk av kontroller for å sikre at analysen gir riktige svar. Hvert sett med C5a inneholder høye og lave kontroller som kan brukes til dette formålet. Grenseverdiene for kontrollen foreligger. Det er meningen at kontrollverdiene skal brukes til å bekrefte validiteten av kurven og prøveresultatene. Hvert laboratorium bør sette opp sine egne parametre for akseptable analysegrenser. Hvis kontrollverdiene IKKE er innenfor ditt eget laboratoriums godkjente grenser, bør analyseresultatene betraktes som tvilsomme og prøvene bør gjentas. I tillegg til dette krever pakningsvedlegget at den standardkurven som er utviklet med settets standarder klart overensstemmer med valideringskravene.

Hvis analysen ikke tilfredsstillende disse kravene skal analysen gjøres om igjen, eller kontakt Quidel for teknisk assistanse.

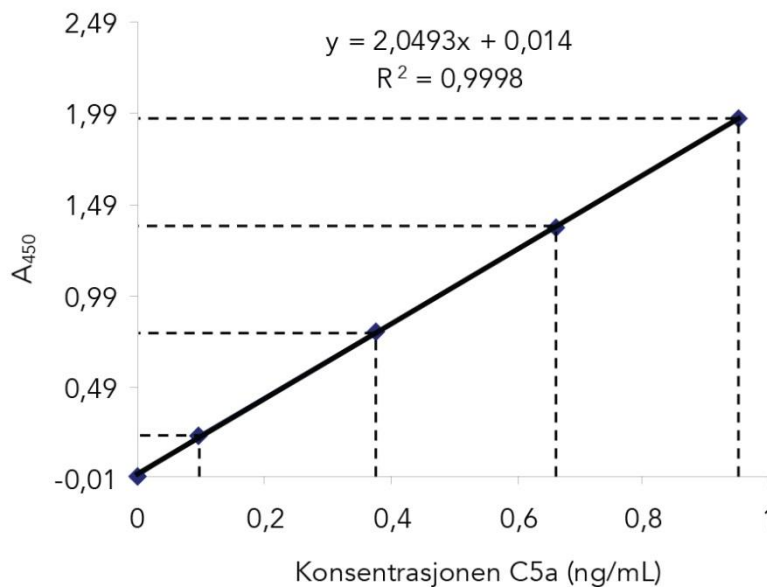
Analysesertifikatet for dette settet er spesifikt for dette varenummeret, og skal brukes for å verifisere at de resultatene som er oppnådd i ditt laboratorium tilsvarer de som er oppnådd ved Quidel Corporation.

FORTOLKNING AV RESULTATER

Beregning av resultater

Bruk av standardkurve: Standardkurven for C5a EIA har man fått ved å bruke A_{450} nullverdiene som er trukket fra for hver standard (på y-aksen) og den fastsatte konsentrasjonen for hver standard (på x-aksen). Standardkurven må oppfylle valideringskravene. De fleste datamaskiner og kalkulatorer kan utføre disse beregningene. Et eksempel på en typisk standardkurve er vist i figur 1.

Figur 1
Representativ standardkurve



Prøve	A_{450}	ng/ml
Standard A	-0,001	0
Standard B	0,225	0,095
Standard C	0,789	0,378
Standard D	1,369	0,661
Standard E	1,965	0,953
$r = 0,9998$	$m = 2,0493$	$b = 0,014$

Beregning av faktisk C5a konsentrasjon i prøver

Den fastsatte konsentrasjonen for standard hetteglassene og kontroll hetteglassene er absolutte enheter for C5a kompleks. C5a-konsentrasjonen i en prøve bestemmes ved å multiplisere den fastsatte konsentrasjonen med den angjeldende forfynningsfaktoren for prøven. For eksempel, hvis en EDTA-plasmaprøve forfynnes 1:20 for analysen, og den lineære regresjonskurven viser en konsentrasjon på 0,5 ng C5a/ml, vil konsentrasjonen av C5a i prøven være 10 ng C5a/ml (eller $20 \times 0,5$).

For å oppnå nøyaktige bestemmelser av C5a konsentrasjonen for de prøvene som testes og som viser høyere A_{450} verdier enn verdien for C5a standard E (eller som viser lavere A_{450} verdier enn LLOQ) bør

prøvene analyseres om igjen med en annen fortykning slik at de nye A_{450} verdiene faller innenfor disse grensene. I alle gjentatte analyser må også C5a standarder og kontroller testes om igjen.

Validering

Bestem helningen, krysningspunktet og korrelasjonskoeffisienten for den avledede linjen som passer best med C5a A, B, C, D, og E standardene. Verdiene må ligge innenfor de spesifiserte grensene for at analysen skal kunne godkjennes:

korrelasjonskoeffisient (r):	> 0,98
helning (m):	1,14-2,50
y-krysningspunkt (b):	(-)0,0145 til (+)0,0532

Se på etikettene på hetteglassene for de godkjente grenseverdiene for C5a konsentrasjonene av lave og høye kontroller.

BEGRENSNINGER

MicroVue C5a enzymimmunanalysen er blitt brukt til å teste prøver innsamlet som serum eller som plasma i EDTA og citrat. Andre antikoagulantia er ikke blitt testet.

MÅLTE VERDIER

EDTA plasma og serum fra tyve (20) tilsynelatende normale, friske blodgivere ble testet i MicroVue C5a enzymimmunanalysesettet. Resultatene vises nedenfor.

	n	Gjennomsnitt (ng/ml)	Konsentrasjonsområde (ng/ml)
EDTA Plasma	20	20,65	0,37 til 74,33
Serum	20	50,09	13,37 til 179,23

MERK: C5a konsentrasjonene som er fastsatt for plasma- eller serum-prøver kan variere mellom laboratorier; derfor anbefales det at hvert laboratorium fastsetter sine egne grenseverdier. Konsentrasjonene som er vist ovenfor skal bare anses som retningslinjer.

TESTENS YTEEVNE

Grenser

LOD: Grensen for påvisning (LOD) med C5a analysen er 0,01 ng/ml, fastsatt ved høyeste 3SD grense i en null-standard studie.

LLOQ: Den laveste grense for kvantifisering (LLOQ) med C5a analysen er 0,050 ng/ml, den laveste konsentrasjonen på standardkurven som oppfyller NCCLS kriterier for nøyaktighet og presisjon.

Interfererende substanser

Følgende substanser ble testet i C5a analysen og funnet ikke å påvirke analysen:

Substans	Konsentrasjon
Bilirubin	40 mg/dL
Hemoglobin	500 mg/dL
Triglyserider	3000 mg/dL
Na + Heparin	14 U/ml
C5 Protein	80 mg/L
Glukose	1200 mg/dL
Kolesterol	500 mg/dL

Prøver med et albuminkonsentrasjoner > 118,6 mg/mL eller gammaglobulin > 8,9 mg/dL har vist seg påvirke analysens kvantifiseringsevne og må fortynnes i overensstemmelse med det.

Presisjon

Presisjon innen samme analyse og mellom analyser ble fastsatt ved vurdering av 20 dobbelttester av 2 plasmaprøver og 2 serumprøver i 10 forskjellige analyseomganger.

Prøve	C5a (ng/ml)	Samme analyse ¹ C.V. (%)	Mellom analyser 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 dobbelttester ²n = 10 omganger

Linearitet

Linearitet ble utført ved å fortynne serier av prøver med prøvefortynner og sammenligne verdiene med forventede verdier.

Prøve	Fortynningsfaktor	Målt C5a (ng/ml) ³	Forventet C5a (ng/ml) ³	Gjenopprettelse (%)
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%
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%

³Fortynningsfaktor ikke inkludert

ASSISTANSE

For service utenfor USA, vennligst ta kontakt med din lokale forhandler. Ytterligere informasjon om Quidel og Quidels produkter finnes på vår webside www.quidel.com.

REFERANSER

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

PIA025001NO00 (02/17)

ORDLISTE

REF

Katalognummer



CE-merking for samsvar

EC REP

Autorisert representant
i EU

LOT

Partikode



Bruk innen



Produsent



Temperaturbegrensning



Bruksområde



Se e-merking instruksjonene før bruk

IVD

Til *in vitro* diagnostisk bruk



Inneholder tilstrekkelig i henhold til
96 bestemmelser

CONT

Innhold/Inneholder

CONTROL

Kontroll
