

En enzymimmunoanalyse for kvantitativ bestemmelse av C3a-fragmentet til det komplementære proteinet C3 i humant serum eller plasma

SAMMENDRAG

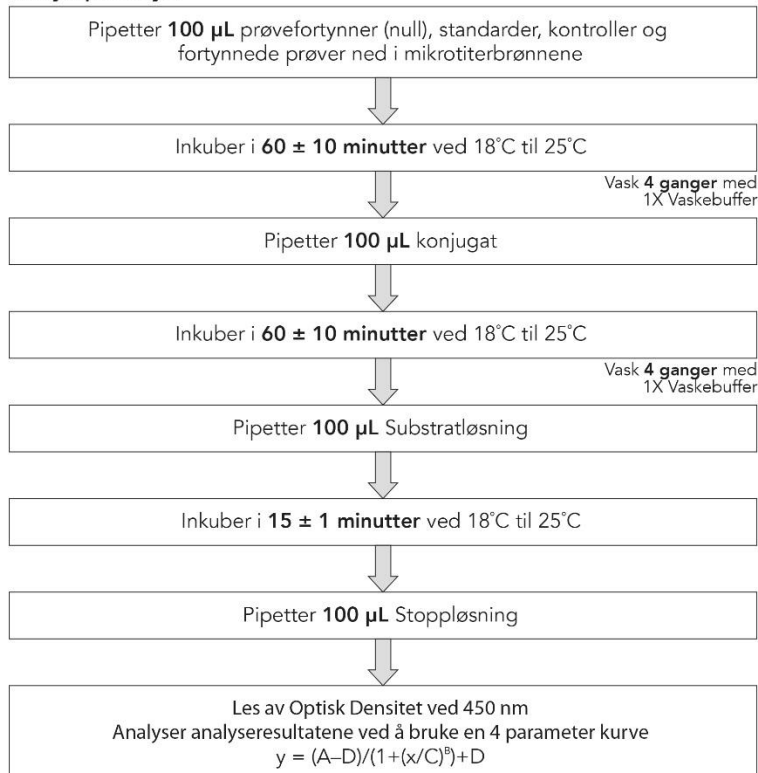
Forberedelse av reagens

- Fortynn den konsentrerte vaskeløsningen 1:20 med ikke- ionisert vann.

Forberedelse av prøve (Plasmaprøve – 1:200; Serumprøve – 1:5000)

- Pipetteprøvefortynner for fortynning 1 i separate rør eller plater
90 µL for hver plasmaprøve (for plasma Fortynning 1)
490 µL fo hver serumprøve (for serum Fortinning 1))
- Pipetteprøvefortynner for fortynning 2 i separate rør eller plater
475 µL for hver plasmaprøve (for plasma Fortynning 2)
495 µL for hver serumprøve (for serum Fortinning 2)
- Tin prøvene raskt ved inkubasjon ved 37 °C til cirka 90 % av prøven er tint. Plasser umiddelbart på is.
- Bland forsiktig hver prøve.
- Overfør 10 µL av hver plasma- eller serumprøve til riktig volum (Fortynning 1) av prøvefortynner, og bland forsiktig.
- Overfør følgende mengder hver fortynning 1 inn riktig fortynning 2 og røres forsiktig:
25 µL plasma Fortynning → 475 µL plasma Fortynning 2
5 µL serum Fortinning → 495 µL serum Fortinning 2

Analyseprosedyre



MicroVue C3a Plus enzymimmunanalysen måler mengden av C3a i humant serum eller plasma.

SAMMENDRAG OG FORKLARING

MicroVue C3a Plus enzymimmunanalysen er en immunanalyse med 96 brønner, for direkte måling av C3a i humant serum, plasma, og andre biologiske eller forsøksprøver.

Under normale forhold fører aktivering av de klassiske, alternative eller lectin komplementbanene til dannelse av et C3 konvertase, multimolekylært enzym som er i stand til å spalte C3 til C3a og C3b.¹ C3a er et proteinfragment på 77 aminosyrer, og har lav molekylvekt (ca. 9kD).² C3a blir raskt omdannet av serumenzymet karboksypeptidase N til en mer stabil og mindre aktiv form på 76 aminosyrer, C3a des-Arg.³ For enkelhets skyld vil begge former bli kalt "C3a" når det gjelder innholdet i dette dokumentet.

MicroVue C3a Plus analysen, en rask og høyst spesifikk og kvantitativ prosedyre for å måle C3a-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 C3a *in vivo* eller *in vitro*. C3a har vist seg å øke vaskulær permeabilitet, å være spasmogen og kjemotaktisk, samt å stimulere frigjøringen av farmakologisk aktive mediatorer fra en rekke celletyper. Rollen til C3a i patogenesen til inflammatoriske reaksjoner funnet i gram-negativ bakteriell sepsis, traume, iskemisk hjertesykdom, cerebral iskemi, postdialysesyndrom og flere autoimmune sykdommer inkludert reumatoid artritt, lupus-erytematose og akutt glomerulonefritt, er godt dokumentert.^{4,6-23}

PROSEDYREPRINSIPP

MicroVue C3a Plus enzymimmunanalysen er en tretrinnsprosedyre som (1) bruker en mikrotiterplate dekket med monoklonalt antistoff fra mus spesifikt for en neo-epitop på humant C3a, (2) et HRP-konjugert polyklonalt antistoff mot C3a-delen av C3, og (3) et kromogent substrat.

I ett trinn, tilsettes Standard, Kontroller og fortynnede testprøver i analysebrønnene som er dekket med murint monoklonalt antistoff mot C3a. Det monoklonale antistoffet binder seg til C3a i Standarder, Kontroller eller prøven. Etter inkubasjonsperiode fjernes eventuelt ubundet materiale med vask.

I to trinn, tilsettes pepperrotperoksidasekonjugert (HRP) anti-C3(C3a) i alle analysebrønnene. Det enzymkonjugerte anti-C3(C3a) binder seg til det fikserte C3a som ble festet i første trinn. Etter inkubasjonsperiode vaskes eventuelt ubundet konjugat vekk.

I tre trinn, 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 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 A_{450} . Fargeintensiteten i reaksjonsblandingen er proporsjonal med konsentrasjonen av C3a som finnes i standardene, kontrollene, og testprøvene. Resultatene beregnes ut fra en standardkurve som bruker 4 parameter analyse.

REAGENSER OG MATERIALER SOM LEVERES

96 Analyser for C3a kompleks

MicroVue C3a Plus EIA-settet inneholder følgende:

A C3a Plus standarder	Del 5140 – 5145	1 hver på 1,5 mL
B Ferdig til bruk. Inneholder humant serum med fastsatt C3a konsentrasjon (ng/mL), protein		
C stabilisatorer		
D		
E		
L Lav kontroll	Del 5146	1,5 mL
Ferdig til bruk. Inneholder humant serum med fastsatt C3a konsentrasjon (ng/mL), protein stabilisatorer		
N Høy kontroll	Del 5147	1,5 mL
Ferdig til bruk. Inneholder humant serum med fastsatt C3a konsentrasjon (ng/mL), protein stabilisatorer		
1 Dekkede strimler	Del 5148	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 Prøvefortynner	Del 5150	50 mL
Inneholder en bufret protein base med 0,05% Proclin 300		
5 TMB substrat	Del 5059	12 mL
Ferdig til bruk. Inneholder 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB) og hydrogenperoksid (H ₂ O ₂)		
6 Konjugat	Del 5151	12 mL
Inneholder pepperrotperoksidase konjugert polyklonalt antistoff mot C3a		

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)
- Fortynningsplate med 96 brønner (VWR REF: 47743-828) eller prøverør og stativer for prøvefortynning (valgfritt)
- Rene, ubrukte mikrotiterplater for replikaplatemetode (valgfritt)
- Måleglass for vaskebufferløsning
- Vaskeflaske eller validert annet utstyr for vasking mikrotiterplater
- Mikropipetter og sterile, engangs pipettespisser
- Reagensreservoarer for tilsetting av konjugat-, substrat- og stoppløsninger til platen (bruk rene, ubrukte reservoarer for hver reagens)
- Justerbar multikanalpipette (8 eller 12 kanaler) eller mikropipetter for flergangsbruk (valgfritt)
- Plateavleser med kapasitet for avlesning av A₄₅₀ optisk densitet mellom 0,0 og 3,0
- Ikke-ionisert eller destillert vann

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

- Til *In vitro*-diagnostisk bruk.
- 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. Utilsiktet 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, skylk 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 sikkerhetshåndtering, 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."²⁴
- 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 *HÅNTERING 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, skylk 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 10). 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 25°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.

Hvis den Prøvefortynner er uklar eller misfarget, tyder det på forringelse av denne reagensen. Hvis dette inntreffer, skal vaskeløsningen kasseres. Fargen på Prøvefortynner kan variere fra rosa til brun, hvilket er normalt og indikerer ikke at produktet er forringet eller ustabil.

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 C3a kan utvikle seg i feilaktig håndtert prøvemateriale ved kunstig aktivert komplement. For optimale plasmaresultater anbefales det å bruke K2 EDTA-prøverør (Fisher REF: 22-040-161).

Det er typisk at verdiene for normale serumprøver er høyere enn de man oppnår med EDTA plasmaprøver. C3a-nivåene i EDTA plasma kan derfor nøyaktigere vise *in vivo*- konsentrasjonene.²⁵

Serum- og EDTA-plasmaprøver bør tas aseptisk ved hjelp av standardteknikker.²⁶ Prøvene bør testes umiddelbart eller oppbevares på is, men ikke lenger enn to timer før de skal analyseres.

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

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

For å minimere prøvehåndteringstid, sett opp en fortynningsplate (eller rør) og tilsett riktig volum av fortynner (som beskrevet i seksjonen *Prøvefortynning* nedenfor) før prøvene tines for evaluering.

Tin frosne hurtig ved 37°C til de er akkurat tint. Legg de tinte prøvene på is med engang for å hindre komplementaktivering før fortynning. **Ikke oppbevar prøvene på is i mer enn to timer. 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 C3 og påvirke resultatene. Prøver må testes så snart som mulig etter at de er tint. Prøvene kan fryses/tines bare én gang 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 *Tining av frosne prøver* for viktig informasjon om riktige måter å tine frossent prøvemateriale på. Nøyaktige resultater er avhengig av at prøvematerialet håndteres riktig.

KRITISK MERKNAD: Det er svært viktig at prøveinnsamling og prøvefortynning utføres korrekt for å unngå komplementaktivering og dermed C3a-generering i prøver.

Prøver **må** fortynnes slik at de A_{450} verdiene man ser er over LLOQ og under ULOQ. Prøver med A_{450} avlesninger utenfor dette området skal analyseres om igjen med en ny fortynning.

Bestem antall (N) prøver som skal testes. Merk 2 sett med prøverør #1 til #N, og før opp hvilken prøve som korresponderer til hvert rør. Alternativt kan en fortynningsplate med 96 brønner brukes til å lage fortynningene.

Gjør klar en passende fortynning (se neste seksjon) av alle prøvene ved å bruke prøvefortynneren. Bland grundig, men unngå at det skummer og blir bobler. Fortynnete prøver skal ikke oppbevares og brukes om igjen.

Fortynningsmetode

For best mulig resultat, utfør en to-trinns fortynning for å tilberede hver prøve.

Plasma

Fortynn plasmaprøvene 1:200 i den medfølgende prøvefortynneren på følgende vis:

- For hver fortynning, pipetter 90 μ L med prøvefortynner for fortynning 1 og 475 μ L for fortynning 2 i separate fortynningsrør eller plater.
- Tilbered fortynning 1 ved å tilsette 10 μ L av testprøven til 90 μ L av prøvefortynneren (røret eller platen med plasmafortynning 1). Bland forsiktig.
- Tilbered fortynning 2 ved å tilsette 25 μ L av fortynning 1 til 475 μ L av prøvefortynneren (røret eller platen med plasmafortynning 2). Bland forsiktig.

Serum

Fortynn serumprøvene 1:5000 i den medfølgende prøvefortynneren på følgende vis:

- For hver testprøve, pipetter 490 μ L med prøvefortynner for fortynning 1 og 495 μ L for fortynning 2 i separate fortynningsrør eller plater.
- Tilbered fortynning 1 ved å tilsette 10 μ L av testprøven til 490 μ L av prøvefortynneren (røret eller platen med serumfortynning 1). Bland forsiktig.
- Tilbered fortynning 2 ved å tilsette 5 μ L av fortynning 1 til 495 μ L av prøvefortynneren (røret eller platen med serumfortynning 2). Bland forsiktig.

Tilsetting av fortynnete prøver i mikrotiterbrønnene.

Tilsetting av fortynnete prøver må være ferdig innen 15 minutter etter tilsetting i den første prøven. En av to metoder kan brukes for å tilsette fortynnete prøver, standarder, kontroller og buffer i brønnene (se trinn 6 i *ANALYSEPROSEDYRE*). For analyser der bare noen få prøver skal testes, kan de fortynnete prøvene og andre reagenser tilsettes direkte i de respektive brønnene med en mikropipette (100 μ L/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 fortynnete prøver i mikrotiterbrønnene så raskt som mulig, kan man bruke en "kopiplate"-prosedyre. I stedet for å tilsette 100 μ L av hver standard, kontroll eller fortynnete prøve i hver enkelt av brønnene som er dekket med antistoff, kan man tilsette 120 μ L til 130 μ L 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 μ L 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 25°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*).

Standarder og Kontroller

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

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.

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.

ANALYSEPROSEDYRE

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. Merk fortynningsplaten/rørene slik at de korresponderer til alle testprøvene.
3. Tilsett prøvefortynner til fortynningsplaten/rørene. (Se *Prøvefortynning*.)
4. Tin testprøvene og fortynn umiddelbart.
5. Velg ut en eller flere brønner som skal tjene som nullbrønn. Tilsett 100 µL av prøvefortynning i de(n) brønn(ene) som skal brukes som nullbrønn for plateavleseren.
6. Tilsett 100 µL av hver C3a Plus standard (A, B, C, D, E) i duplikatbrønnene. **MERK: Standardene er allerede fortynnet og er ferdig til bruk.**
7. Tilsett 100 µL av både C3a Plus lav kontroll og C3a høy kontroll i duplikatbrønnene. **MERK: Kontrollene er allerede fortynnet og er ferdig til bruk.**
8. Tilsett 100 µL av hver fortynnete prøve i de respektive brønnene. (Se *Prøvefortynning*.)
9. Inkuber ved 18°C til 25°C i 60 ± 10 minutter.
10. Vask mikrotiterbrønnene som følger:
 - a. Etter inkubasjonen i trinn 9 (eller i trinn 12 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 tre ganger til.**
 - e. Etter den fjerde vaskeomgangen snus platen opp ned, og slås lett og fast mot tørkepapir to ganger for å fjerne eventuell gjenværende væske (hvis manuell vasking brukes).
11. Ved å bruke en multikanalpipette eller pipette til flergangsbruk fordeles 100 µL av C3a konjugat i alle de vaskede testbrønnene, også nullbrønnen(e).
12. Inkuber mikrotiterstrimlene ved 18°C til 25°C i 60 ± 10 minutter.

13. Vask mikrotiterbrønnene etter 60 minutters inkubasjon (trinn 12), slik som beskrevet under *ANALYSEPROSEDYRE*, trinn 10.
14. Umiddelbart etter vaskeprosedyren fordeles 100 µL av substratløsningen i hver brønn, også nullbrønnen(e).
15. Inkuber mikrotiterstrimlene ved 18°C til 25°C i 15 ± 1 minutter.
16. 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.
17. Bestem absorbansen ved avlesning ved 450 nm (A_{450} verdi) for hver testbrønn innen 60 minutter etter tilsetning av stoppløsningen (trinn 16), og utfør den nødvendige nullkorreksjonen.
18. Bestem konsentrasjonen av prøver og kontroller ut fra standardkurven.
19. 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 C3a Plus inneholder Lave og Høye 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.

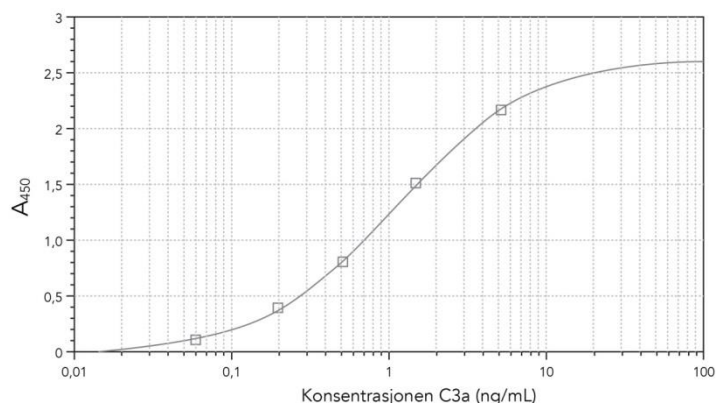
Analysesertifikatet for dette settet er spesifikt for dette varenummeret, og skal brukes for å verifisere at de resultatene som er oppnådd i ditt laboratorium tilsvarer de som er oppnådd ved Quidel Corporation.

FORTOLKNING AV RESULTATER

Beregning av resultater

Bruk av standardkurve: Standardkurven for C3a Plus 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. Et eksempel på en typisk standardkurve er vist i figur 1.

Figur 1
Representativ standardkurve



Beregning av faktisk C3a konsentrasjon i prøver

Den fastsatte konsentrasjonen for standard hetteglassene og kontroll hetteglassene er absolutte enheter for C3a. C3a-konsentrasjonen i en prøve bestemmes ved å multiplisere den fastsatte konsentrasjonen med den angjeldende fortynningsfaktoren for prøven. For eksempel, hvis en EDTA-plasmaprøve fortynnes 1:200 for analysen, og den avledede 4 parameters logistiske kurven viser en konsentrasjon på 0,5 ng C3a/mL, vil konsentrasjonen av C3a i prøven være 100 ng C3a/mL (eller $200 \times 0,5$).

For å oppnå nøyaktige bestemmelser av C3a konsentrasjonen for de prøvene som testes og som viser høyere A_{450} verdier enn ULOQ 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 C3a standarder og kontroller testes om igjen.

Validering

Bestem den øvre asymptoten (D) og korrelasjonskoeffisienten til den avledede 4-parameters logistiske kurvetilpasningen for standardene C3a A, B, C, D og E. Verdiene må ligge innenfor de spesifiserte grensene for at analysen skal kunne godkjennes:

korrelasjonskoeffisient (r^2): $> 0,98$
øvre asymptote (D): $\geq 1,49$

Se på etikettene på hetteglassene for de godkjente grenseverdiene for C3a konsentrasjonene av Lave og Høye kontroller.

BEGRENSNINGER

MicroVue C3a Plus enzymimmunanalysen er blitt brukt til å teste prøver innsamlet som serum eller som plasma i K2 EDTA. Andre antikoagulantia er ikke blitt testet.

MÅLTE VERDIER

EDTA plasma og serum fra tyve (20) tilsynelatende normale, friske blodgivere ble testet i MicroVue C3a Plus enzymimmunanalysesettet. Resultatene vises nedenfor.

	n	Gjennomsnitt (ng/mL)	Konsentrasjonsområde (ng/mL)
EDTA Plasma	20	129,6	33,8 til 268,1
Serum	20	240,4	71,0 til 589,2

MERK: C3a 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 C3a Plus analysen er 0,012 ng/mL, fastsatt ved høyeste 3SD grense i en null-standard studie.

LLOQ: Den laveste grense for kvantifisering (LLOQ) med C3a Plus analysen er 0,023 ng/mL, den laveste konsentrasjonen på standardkurven som oppfyller interne kriterier for nøyaktighet og presisjon.

ULOQ: Den øvre kvantifiseringsgrensen (ULOQ) for C3a-prøven er 2,532 ng/ml, den høyeste konsentrasjonen på standardkurven som oppfyller interne kriterier for nøyaktighet og presisjon. Fortynnede prøver med en konsentrasjon over denne grensen bør testes på nytt ved en høyere fortykning.

Interfererende substanser

Følgende substanser ble testet i C3a Plus analysen og funnet ikke å påvirke analysen:

Substans	Konsentrasjon
Albuminnivå	6000 mg/dL
Gammaglobulin	6000 mg/dL
Bilirubin	20 mg/dL
Hemoglobin	200 mg/dL
Triglyserider	3000 mg/dL
Na + Heparin	3 U/mL
Glukose	1000 mg/dL
Kolesterol	500 mg/dL
EDTA	10 mM
C3 Protein	5 µg/mL
C5 Protein	5 µg/mL
C5a	5 µg/mL

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	C3a (ng/mL)	Samme analyse ¹ C.V. (%)	Mellom analyser ² C.V. (%)
EDTA Plasma	55,80	4,7	14,7
	119,5	5,0	19,6
Serum	533,3	5,3	8,3
	2308	4,5	5,9

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 C3a (ng/mL)	Gjenopprettelse (%)
EDTA Plasma	175	67,88	105,5
	200	64,36	100,0
	225	63,67	98,9
	250	62,99	97,9
	275	65,13	101,2
	300	65,54	101,8
Serum	1250	2097	96,5
	2500	2128	97,9
	5000	2173	100,0
	10000	2160	99,4
	20000	2196	101,1
	40000	2423	111,5

Anriket gjenoppretting

Anriket gjenoppretting ble utført ved å tilsette prøvene en kjent mengde rensset C3a og sammenligne observerte verdier med forventede verdier.

Prøve	C3a (ng/mL)	Anriket (ng/mL)	Result (ng/mL)	Gjenoprettelse (%)
Serum 1	1021		2788	99,7
Serum 2	615,1	1775	2343	98,0
Serum 3	2080		3677	95,4
Plasma 1	53,4		230,5	99,7
Plasma 2	87,4	177,8	240,7	90,8
Plasma 3	118,3		278,8	94,1

ASSISTANSE

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

REFERANSER

1. Markiewski, M. Maciej, Dimitrios Mastellos, Ruxandra Tudoran, Robert A. DeAngelis, Christoph W. Strey, et al. 2004. C3a and C3b Activation Products of the Third Component of Complement (C3) Are Critical for Normal Liver Recovery after Toxic Injury. *The Journal of Immunology*. 173: 747-754. <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/173/2/747>.
2. Hugli, Tony E. 1975. Human Anaphylatoxin (C3a) from the Third Component of Complement. Primary Structure. *Journal of Biological Chemistry*. 250(21):8293-8301.
3. Morgan, Edward L., William O. Weigle and Tony E. Hugli. 1982. Anaphylatoxin-Mediated Regulation of the Immune Response, I. C3a-mediated Suppression of Murine Humoral Immune Responses. *J. Exp. Med.* 155:1412-1426.
4. Hugli, Tony E. and Hans J. Muller-Eberhard. 1978. Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Advances in Immunology*. 26:1-53.
5. Hugli, Tony E. 1986. Biochemistry and Biology of Anaphylatoxins. *Complement*. 3:111-127.
6. Purwar, Rahul, Miriam Wittmann, Jorg Zwirner, Martin Oppermann, et al. 2006. Induction of C3 and CCL2 by C3a in Keratinocytes: A Novel Autocrine Amplification Loop of Inflammatory Skin Reactions. *J. Immunol.* 177: 4444-4450.
7. Mack, W.J., A.F. Ducruet, Z.L. Hickman, M.C. Garrett, et al. 2007. Early plasma complement C3a levels correlate with functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 61(2):255-60; discussion 260-1.
8. Burns, Victoria E., Kate M. Edwards, Christopher Ring, Mark Drayson, and Douglas Carroll. 2008. Complement Cascade Activation After an Acute Psychological Stress Task. *Psychosom Med.* 70:387-396.
9. Marcheix, B., Michel Carrier, Catherine Martel, Marieve Cossette, et al. 2008. Effect of Pericardial Blood Processing on Postoperative Inflammation and the Complement Pathways. *Ann. Thorac. Surg.* 85:530-535. doi: 10.1016/j.athoracsur.207.08.050.
10. Gerasimidis, Thomas, Giorgos Sfyroeras, Giorgos Trellopoulos, Lemonia Skoura, Konstantinos Papazoglou, Konstantinos Konstantinidis, ... Efthimia Parapanisiou. 2005. Impact of Endograft Material on the Inflammatory Response After Elective Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *Angiology*. 56(6):743-753.
11. Hoenich, Nicholas A. and Kostas P. Katopodis. 2002. Clinical characterization of a new polymeric membrane for use in renal replacement therapy. *Biomaterials*. 23:3853-3858.
12. Rinder, Christine S., Henry M. Rinder, Michael J. Smith, Jayne B. Tracey, Jane Fitch, Lan Li, ... Brian R. Smith. 1999. Selective Blockade of Membrane Attack Complex Formation During Simulated Extracorporeal Circulation Inhibits Platelet but not Leukocyte Activation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 118:460-466.

13. Smith, Brian Richard, Henry M. Rinder, and Christine S. Rinder. 2002. Interaction of Blood and Artificial Surfaces. *Thrombosis and Hemorrhage, 3rd Edition*. Chapter 42.
14. Gasche, Yvan, Manuel Pascual, Peter M. Suter, Herve Favre, Jean-Claude Chevrolet and Jurg A. Schifferli. 1996. Complement depletion during haemofiltration with polyacrylonitrile membranes. *Nephrol Dial Transplant*. 11:117-119.
15. Sperling, Claudia, Manfred F. Maitz, Sandra Talkenberger, Marie-Francoise Gouzy, Thomas Groth, and Carsten Werner. 2007. *In vitro* blood reactivity to hydroxylated and nonhydroxylated polymer surfaces. *Biomaterials*. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.041.
16. Frangogiannis, Nikolaos G., C. Wayne Smith, and Mark L. Entman. 2002. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Res*. 53:31-47.
17. Fareed, Jawed, Debra A. Hoppensteadt, Fred Leya, Omer Iqbal, Helmut Wolf, and Roger Bick. 1998. Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes. *Clin Chem*. 44:8(B):1845-1853.
18. Arumugam, Thiruma V., Sung-Chun Tang, Justin D. Lathia, Aiwu Cheng, Mohamed R. Mughal, ... Mark P. Mattson. 2007. Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *PNAS*. 104(35):14104-14109. www.pnas.org doi:10.1073.pnas.0700506104.
19. Van Beek, Johan, Kristina Elward, and Philippe Gasque. 2003. Activation of Complement in the Central Nervous System: Roles in Neurodegeneration and Neuroprotection. *Ann NY Acad Sci*. 992:56-71.
20. Sheerin, N.S. and S.H. Sacks. 2002. Leaked protein and interstitial damage in the kidney: is complement the missing link? *Clin Exp Immunol*. 130:1-3.
21. Bengtsson, A., H. Redl, G. Schlag, K Hogasen, O. Gotze, and T.E. Mollnes. 1998. 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*. 48:509-514.
22. Haas, Pieter-Jan and Jos van Strijp. 2007. Anaphylatoxins: Their Role in Bacterial Infection and Inflammation. *Immunol Res*. 37(3):161-175.
23. Black, Sylvester M., John F. Grehan, Andrew L. Rivard, Barbara A. Benson, Andrea E. Wahner, ... Agustin P. Dalmasso. 2006. Porcine Endothelial Cells and Iliac Arteries Transduced with AdenoIL-4 Are Intrinsically Protected, through Akt Activation, against Immediate Injury Caused by Human Complement. *J. Immunol*. 177:7355-7363.
24. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 2007. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition*. Washington: U.S. Government Printing Office. <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>.
25. Mollnes, T.E., P. Garred, and G. Bergseth. 1988. Effect of time, temperature and anticoagulants on *in vitro* complement activation: Consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clin. Exp. Immunology*. 73:484-488.
26. Centers for Disease Control. 1987. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR*. 36 (suppl. No. 2S):001.

REF A032 – MicroVue C3a Plus EIA Kit

IVD





MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA032001NO00 (11/17)

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



Biologisk risiko

IVD

Til *in vitro* diagnostisk bruk



Inneholder tilstrekkelig i henhold til
96 bestemmelser

CONT

Innhold/Inneholder

CONTROL

Kontroll
