

En enzymimmunanalyse til kvantitativ bestemmelse af C3a-fragmentet af komplementproteinet C3 i humant serum eller plasma.

## OPSUMMERING

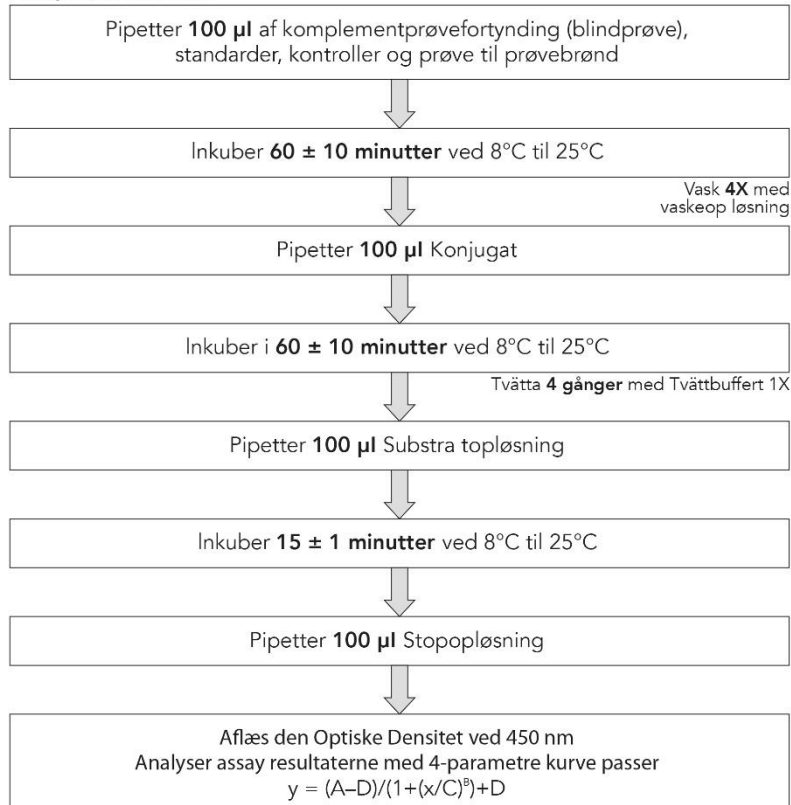
### Klargøring af Reagens og Prøveeksemplar

- Fortyndt vaskeopløsningskoncentrat 1 :20 med deioniseret vand.

### Klargøring af Prøveeksemplar (Plasmaprøve -1 :200; Serumprøve -1 :5000)

- Pipetter prøveopløsning af Fortynding 1 i separate rør eller plader:  
90 µl af hver enkelt plasmaprøve (plasma Fortynding 1)  
490 µl af hver serumprøve (serum Fortynding 1)
- Pipetter prøveopløsning af Fortynding 2 i separate rør eller plader:  
475 µl af hver enkelt plasmaprøve (plasma Fortynding 2)  
495 µl for hver serumprøve (serum Fortynding 2)
- Tø prøverne hurtigt ved inkubation ved 37 °C, indtil ca. 90 % af prøverne er optøet. Opbevar herefter på is.
- Bland forsigtigt hver prøve.
- Overfør 10 µl af hver plasma- eller serumprøve til den korrekte Fortynding 1-blanding af prøvefortynder og bland forsigtigt.
- Overfør følgende mængde af hver Fortynding 1 til den tilsvarende Fortynding 2, og bland forsigtigt.  
25 µl plasma Fo,tynding 1 → 475 µl plasma Fo,tynding 2  
5 µl serum Fo,tynding 1 → 495 µl serum Forlynding 2

### Analyseproceduren





## ANVENDELSESFORMÅL

MicroVue C3a Plus enzymimmunanalyse måler mængden af C3a i humant serum eller plasma.

## RESUMÉ OG FORKLARING

MicroVue C3a Plus Enzym Immunoassay er et 96 brønds, "direct-capture" immunoassay til måling af C3a i humant serum, plasma, og andre biologiske eksperimentielle prøver.

Under normale omstændigheder, er aktivering af den klassiske, alternative og lectin complement pathways, resultat af dannelse af et C5 convertase multi-molekylært enzym, som kløver C3 til C3a og C3b.<sup>1</sup> C3a er et lavmolekylært (ca. 9kD) protein fragment bestående af 77-amino syrer.<sup>2</sup> C3a er hurtigt metaboliseret af serum enzymet carboxypeptidase N til en mere stabil, mindre aktiv, 76-amino syre form, C3a des-Arg.<sup>3</sup> For bekvemmelighed, vil begge former blive refereret som "C3a" i dette dokument.

MicroVue C3a Plus assay'et, giver en hurtig, specifik og kvalitativ procedure for måling af C3a niveauet. Er designet til undersøgelser af den rolle, eller status af terminalen supplement pathway aktivering i en lang række forsknings-indstillinger, og til overvågning af generation af C3a *in vivo* eller *in vitro*. Det er påvist, at C3a øger vaskulær permeabilitet til spasmogen og kemotaktisk tilstand og inducerer afgivelse af farmakologisk aktive mediatorer fra en række celletyper. C3a's rolle i patogenesen af inflammatoriske reaktioner, der ses ved gramnegativ bakteriel sepsis, traume, iskæmisk hjertesygdom, cerebral iskæmi, post dialyse-syndrom og adskillige autoimmune sygdomme (inklusive reumatoid arthritis, systemisk lupus erythematosus (SLE) og akut glomerulonefritis) er veldokumenteret.<sup>4,6-23</sup>

## PROCEDURE PRINCIP

MicroVue C3a Plus enzymimmunanalyse er en tre-trins procedure, der benytter (1) en microassay plade med murine monoklonale antistof specifikt for et neo-epitop på humane C3a, (2) en HRP-konjugeret murine polyklonale antistoffer til C3a regionen C3, og (3) et kromogent substrat.

I trin 1, er Standarder, Kontroller og fortyndet prøver føjet til analyse brønde, der er belagt med et murine monoklonale antistof til C3a. Det monoklonale antistof binder sig til C3a i standarder, kontroller eller prøver. Efter inkubationstid, fjerner en vaskecyklus ubundet materiale.

I trin 2, er horeseradish peroxidase (HRP) konjugeret anti-C3 (C3a) tilsat hver brønd. Det enzymkonjugeret anti-C3 (C3a) binder sig til immobiliserede C3a bundet i det første skridt. Efter inkubationstiden, fjerner en vaskecyklus det ubundet konjugat.

I trin 3, er 3,3', 5,5' tetramethylbenzidin (TMB), klar-til-brug, kromogent substratopløsning, føjet til analyse brøndene. De bundne HRP reagerer med substratet og danner en blå farve. Efter inkubationstiden, er reaktionen stoppet kemisk, hvilket resulterer i et farve skift fra blå til gult, hvilket bekræfter, at reaktionen har fundet sted. Farveintensiteten måles spektrofotometrisk ved  $A_{450}$ . Farveintensiteten af reaktionsblandingen er proportional med koncentrationen af C3a til stede i de Standarder, Kontroller og fortyndede prøver. Resultaterne beregnes ud fra den genererede standardkurve ved logistiske 4-parameteranalyse.

## LEVERET REAGENSER OG MATERIALER

### 96 Assay til C3a kompleks

MicroVue C3a Plus EIA kit indeholder følgende:

<b>A</b>	<b>C3a Plus Standarder</b>	<b>Parts 5140 – 5145</b>	<b>1 hver, 1,5 ml</b>
<b>B</b>	Klar til brug. Indeholder humant serum med tildelt C3a koncentration (ng /ml), protein stabilisatorer		
<b>C</b>			
<b>D</b>			
<b>E</b>			
<b>L</b>	<b>Lav kontrol</b>	<b>Part 5146</b>	<b>1,5 ml</b>
	Klar til brug. Indeholder humant serum med tildelt C3a koncentration (ng /ml), protein stabilisatorer		
<b>N</b>	<b>Høj kontrol</b>	<b>Part 5147</b>	<b>1,5 ml</b>
	Klar til brug. Indeholder humant serum med tildelt C3a koncentration (ng /ml), protein stabilisatorer		
<b>1</b>	<b>Coated Strips</b>	<b>Part 5148</b>	<b>12 hver</b>
	Otte-brønds strips belagt med murine monoklonale antistof i genlukkelig foliepose		
<b>2</b>	<b>Stopopløsning</b>	<b>Part A9947</b>	<b>12 ml</b>
	Indeholder 1N (4%) Syre-Hydrochloric		
<b>3</b>	<b>20X vaskeopløsnings koncentrat</b>	<b>Part A9957</b>	<b>2 hver, 50 ml</b>
	Indeholder fosfat bufferet saltvand (PBS), 1,0% Tween-20®, og 0,035% Proclin® 300		
<b>4</b>	<b>Prøvefortynder</b>	<b>Part 5150</b>	<b>50 ml</b>
	Indeholder en bufferproteinbase med 0,05% ProClin 300		
<b>5</b>	<b>TMB Substrat</b>	<b>Part 5059</b>	<b>12 ml</b>
	Klar til brug. Indeholder 3,3',5,5'-tetramethylbenzidene (TMB) og Hydrogen Peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		
<b>6</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Part 5151</b>	<b>12 ml</b>
	Indeholder Horseradish Peroxidase-conjugeret polyklonal antistof mod C3a		

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

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

## NØDVENDIGE REAGENSER DER IKKE MEDFØLGER

- Timer (60 minutter)
- Plade med 96 brønde til fortynding (VWR REF: 47743-828) eller testrør og racks til prøvefortynding (valgfrit)
- Rene, ubrugte mikrolader til replika-plademetoden
- Gradueret beholder til vaskebufferfortynding
- Vaskeflaske eller andet valideret vaskesystem til immunanalyse
- Mikropipetter og steril pipettespidser disponible
- Reagensbeholdere til tilsætning af konjugat, substrat og stopopløsning til pladen (brug rene, ubrugte beholdere til hvert reagens)
- Justerbar multikanalspipette (8 eller 12 kanaler) eller repeat-mikropipetter (valgfri)
- Pladelæser til optiske densitets aflæsninger ved A<sub>450</sub> mellem 0,0 og 3,0
- Demineraliseret eller destilleret vand

## ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

- Til *in vitro* diagnostisk brug.
- Behandl prøver, som potentielt biologisk skadelige stoffer. Følg 'Universale Forholdsregler' ved håndtering af indholdet af dette kit og alle patient prøver.
- Brug de leverede reagenser som en integreret enhed, inden udløbsdatoen angivet på pakken.
- Opbevar assay reagenser som angivet.

- Brug ikke coatede strips, hvis posen er punkteret.
- Proclin 300 anvendes som konserveringsmiddel. Tilfældig kontakt med eller indtagelse af buffere eller reagenser der indeholder Proclin, kan forårsage irritation af hud, øjne eller mund. Anvend god laboratoriepraksis for at reducere eksponeringen. Søg lægehjælp, hvis der er symptomer.
- Stopopløsnig betragtes som ætsende og kan forårsage irritation. Må ikke indtages. Undgå kontakt med øjne, hud og tøj. Hvis kontakt, skyl straks berørte område med vand. Ved indtagelse, ring til en læge.
- Hver enkelt donor, der anvendes i udarbejdelsen af standarder og kontrol sera af dette produkt er blevet testet af en FDA-godkendt metode, for tilstedeværelse af antistof mod human immundefekt virus (HIV 1 og HIV2) og hepatitis C-virus, såvel som for hepatitis B overflade-antigen. Da ingen testmetode kan give fuldstændig sikkerhed for, at smittefarlige stoffer ikke er til stede, skal disse reagenser behandles på biosikkerhed niveau 2 som anbefalet for alle potentielt infektiøse human serum eller blodprøve i Centers for Disease Control / National Institutes of Health manual "Biosafety i Mikrobiologiske og Biomedical Laboratories."<sup>(24)</sup>
- Brug af multikanal pipetter eller gentage pipetter anbefales.
- For nøjagtig måling af prøver, tilføj prøver og standarder præcist. Pipetter grundigt ved hjælp af kalibreret udstyr.
- Korrekt indsamling og opbevaring af prøveemner er afgørende for nøjagtige resultater (se *MODELLEN HÅNDBEREDNING OG TILBEREDNING*).
- Undgå mikrobiel eller krydskontaminering af prøver eller reagenser.
- Test hver prøve i dublikat.
- Brug ikke en brønd til mere end én test.
- Andre inkuberingstider og temperaturer end dem, der er angivet i afsnittet "Procedure", kan give fejlagtige resultater.
- TMB Substrat skal beskyttes mod lys under opbevaring og inkubation. Undgå kontakt med øjne, hud og tøj. Hvis kontakten er lavet, skylles berørte område med vand.
- Tillad ikke microassay brønde at tørre, når analysen er begyndt.
- Når du fjerner væske fra microassay brønde, skrab eller rør ikke i bunden af brøndene.
- Varmeinaktiveres, hyperlipemic, eller forurenede prøver kan give fejlagtige resultater.
- For at undgå aerosoldannelse under vask, brug et apparat til at suge vask væske i en flaske med blegemiddel til husholdningsbrug.
- En vaskeflaske eller automatisk påfyldning enhed skal bruges til at vaske pladen (*TESTMETODE*, Trin 10). For det bedste resultat, skal du ikke bruge en multikanalpipette at vaske microassay plade med.
- Testning skal udføres i et område med tilstrækkelig ventilation.
- Bortskaf beholdere og ubrugt indhold i henhold til gældende kliniske retningslinjer for bortskaffelse af biologisk farligt materiale.
- Bær egnet beskyttelsestøj, handsker og øjen/ansigtsbeskyttelse ved håndtering af indholdet i dette kit.
- Vask hænderne grundigt efter håndtering.
- For yderligere oplysninger om faresymboler, sikkerhed, håndtering og bortskaffelse af komponenterne i dette kit henvises til sikkerhedsdatabladet (SDS), der findes på [quidel.com](http://quidel.com).

## OPBEVARING

Opbevar det uåbnede kit ved 2°C til 8°C. Bring reagenser og materialer udvalgt til brug til 18°C til 25°C før brug. Læg alle ubrugte brøndstripholdere i opbevaringspose, tilluk posen, og opbevar ved 2°C til 8°C.

## TEGN PÅ USTABILITET ELLER FORRINGELSE AF REAGENSER

Uklarhed eller misfarvning af den Vaskeopløsning, indikerer en forringelse af reagenset. Hvis dette sker, skal opløsningen kasseres.

Uklarhed eller misfarvning af den Fortyndede, indikerer en forringelse af reagenset. Hvis dette sker, skal opløsningen kasseres. Farven på prøvfortynderen kan variere fra lyserød til brun. Dette er normalt og er ikke tegn på forringelse eller ustabilitet.

## PRÆPARATHÅNDTERING OG FORBEREDELSE

Håndtering og bortskaffelse af alle prøver, se "Universal Forholdsregler".

Alle prøvehåndtering skal udføres ved 2°C til 8°C.

### Prøvetagning

Korrekt indsamling, behandling, og opbevaring af prøver er afgørende, da C3a kan genereres i forkert håndteret prøver. K2 EDTA-prøvetagningsrør anbefales for at få optimale resultater fra plasma (Fisher REF: 22-040-161).

Værdier for normale serumprøver vil typisk være højere end dem, der opnås med EDTA behandlet normale plasmaprøver. C3a niveau i EDTA plasma kan derfor mere præcist repræsentere *in vivo* koncentrationer.<sup>(25)</sup> Serum eller EDTA plasma prøver skal indsamles aseptisk, ved hjælp af standard teknikker.<sup>(26)</sup> Prøverne bør testes straks eller opbevares på is i længere tidsrum end to timer, før de analyseres.

Hvis prøven ikke kan testes inden for to timer i henhold til retningslinjer beskrevet ovenfor, bør prøverne fryses ved -70°C eller mindre.

**Prøve Stabiliserende Opløsning** (Nr A9576) kan også bruges til, at forberede human serum og plasma prøver til opbevaring. Korrekt brug af dette produkt, er tilgængelig fra Quidel, der kræves, at prøven blandes 1:1 inden frysning. Yderligere tekniske oplysninger om denne løsning er til rådighed efter anmodning.

### Optøning af frosne prøver

Håndteringstiden for prøver kan minimeres ved at opsætte en fortyndingsplade (eller -rør) og tilsætte den korrekte mængde fortynder (som beskrevet i afsnittet *Prøvefortynding* nedenfor), inden prøverne optøes mhp. evaluering.

Optø frosne prøver hurtigt ved 37°C. Overfør straks optøede prøver til is for at forhindre komplement-aktivering inden fortynding. **Prøverne må højst ligge på is i to timer. Lad ikke prøver stå ved 37°C**, da komplement aktivering kan forekomme. Optø ikke prøver ved stuetemperatur eller på is, da dette kan føre til C3 aktivering og påvirke resultaterne. Prøver bør testes hurtigst muligt efter optøning. Prøverne kan kun nedfryses/optøes én gang, uden det påvirker dem. Hvis prøverne har brug for yderligere frysning for yderligere analyse, anbefaler Quidel frysning af flere portioner af prøverne for, at forhindre flere fryse/tø-cykler.

### Prøve Fortynding

**FORSIGTIG: Behandl alle prøver som potentielt smitsomme. Brug 'Universal Forholdsregler'. Brug ikke varme-inaktiverede, forurenede, eller forkert opbevarede prøver.**

**BEMÆRK: Se PRØVETAGNING OG OPBEVARING for vigtige notater om de rigtige metoder til, at optø frosne prøver. Korrekt håndtering af prøver er afgørende for nøjagtige resultater.**

**KRITISK BEMÆRK: Det er meget vigtigt at udføre prøvetagning og -fortynding korrekt for at undgå komplementaktivering og resulterende dannelse af C3a i prøverne.**

Prøverne **skal** fortyndes, således, at  $A_{450}$  værdier er over LLOQ og ikke overstiger  $A_{450}$  værdien af ULOQ. Prøver med  $A_{450}$  målinger uden for dette interval bør re-analyseres på en ny fortynding.

Bestem antallet (N) af prøver, der skal testes. Sæt etiket på 2 sæt testrør nr. 1 til og med nr. N og notér hvilken prøve, der er i hvert rør. En plade med 96 brønde kan alternativt anvendes til fortynding.

Forbered en passende fortynding (se næste afsnit) af hver prøve med prøvefortynderen. Bland grundigt, men undgå dannelse af skum og bobler. Opbevar eller genbrug ikke fortyndede prøver.

## Fortyndingsmetode

Optimale resultater opnås ved udføre to trin fortyndinger til at forberede hver prøve.

### *Plasma*

Fortynd plasmaprøver 1:200 med den medfølgende prøvefortynder. Dette gøres som følger:

- For hver fortynding pipetteres 90 µl prøvefortynder til fortynding 1 og 475 µl til fortynding 2 i et separat fortyndingsrør eller i en fortyndingsplade.
- Forbered fortynding 1 ved at tilsætte 10 µl af prøven til 90 µl prøvefortynder (plasmafortynding 1 i rør eller plade). Bland forsigtigt.
- Forbered fortynding 2 ved at tilsætte 25 µl af fortynding 1 til 475 µl prøvefortynder (plasmafortynding 2 i rør eller plade). Bland forsigtigt.

### *Serum*

Fortynd serumprøver 1:5000 med den medfølgende prøvefortynder som følger:

- For hver prøve pipetteres 490 µl prøvefortynder til fortynding 1 og 495 µl til fortynding 2 i separate fortyndingsrør eller -plader.
- Forbered fortynding 1 ved at tilsætte 10 µl af prøven til 490 µl prøvefortynder (serumfortynding 1 i rør eller plade). Bland forsigtigt.
- Forbered fortynding 2 ved at tilsætte 5 µl af fortynding 1 til 495 µl prøvefortynder (serumfortynding 2 i rør eller plade). Bland forsigtigt.

## Tilsætning af Fortyndet Prøver til mikrotiter brønde

**Tilsætning af fortyndede prøver til mikrotiter brønde skal være afsluttet indenfor 15 minutter efter anvendelsen af den første prøve.** En af de to metoder kan anvendes til at tilsætte fortyndede prøver, standarder, kontroller og buffer, til brøndene (se trin 6 i *TESTMETODE*). For assay test der har kun nogle få prøver skal testes, kan den fortyndede prøver og andre reagenser tilsættes direkte til deres tildelte brønde med en mikropipette (100 µL/brønd). For små eller store test, specielt større test, anbefaler vi brugen af en multikanalpipette.

Tilsæt standarder, kontroller og fortyndede prøver til microassay brønde, så hurtigt som muligt, en "kopi plade" procedure kan anvendes. Istedet for at tilsætte 100 µL af hver standard, kontrol eller fortyndet prøve til de antistof-coatede brønde individuelt, kan 120 µL til 130 µL af hver løsning tilføjes de enkelte brønde i en blank plade (medfølger ikke) svarende til den endelige EIA ønskede mønster. Efter at alle opløsninger, der skal testes, er blevet tilføjet til microassay brønde i den blanke plade, overfør hurtigt 100 µL fra hver tomme brønd til de antistof-coatede brønde med en multikanal micropipette. For at undgå mulig krydskontaminering, skal pipettespidser skiftes hver gang, der sker en ændring i sammensætningen af prøven, der skal overføres.

**"Kopi plade" procedure kan også anvendes til at tilføje konjugat, substrat, og stopopløsning.**

## REAGENSFORBEREDELSE

**Bring alle reagenser og materialer til 18°C til 25°C før brug.**

Efter fjernelse af de nødvendige reagenser og materialer, returnér ubrugte varer i deres passende lagrings temperaturer (se *OPBEVARING*).

For at opnå optimale resultater, udføre to trin fortyndinger til at forberede hver prøve.

## Standarder og kontroller

Standarder og kontroller kræver ikke fortynding eller forberedelse forud for brug.

## Vaskeopløsning

Bland 20X vaskeopløsning koncentrat ved, at vende flasken flere gange. Hvis 20X vaskeopløsning koncentrat er blevet opbevaret ved 2°C til 8°C, kan krystallerne blive dannet. For at opløse krystaller, varm flasken i en 37°C til 50°C vandbad, indtil alle krystallerne er opløst, bland grundigt. Forbered vaskeopløsning ved fortynding af hele indholdet, med en af de 20X vaskeopløsning koncentrat, op til en liter, med destilleret eller deioniseret vand. Bland grundigt. Vaskeopløsningen er stabil i 30 dage, når den opbevares i en ren beholder ved 2°C til 8°C. Hvis misfarvning eller uklarhed opstår, kasseres reagenset.

## Mikroanalysestrips

Bestem antallet af brønde der er nødvendige for analysen. Det anbefales, at de tomme brønde, kontroller og standarder, testes i duplikat. Fjern overflødige strips og placér dem i opbevaringsposen, tilluk posen, og opbevar ved 2°C til 8°C. Tryk de strips der skal benyttes grundigt ned.

## TESTMETODE

**Læs hele indlægssedlen inden analysen påbegyndes.**

*Se REAGENT FORBEREDELSE og ADVARSLER SAMT FORHOLDSREGLER.*

1. Registrér brønd positioner, der svarer til den tomme prøve, alle prøver, standarder og kontroller samt angivet lot numre fra rørene. Markér det ene hjørne af pladen for orientering af pladen.
2. Sæt etiket på fortyndingspladen/-rørene, så de stemmer overens med alle prøver.
3. Tilsæt prøvefortynder til fortyndingspladen/-rørene (se *Fortyndingsmetode*).
4. Optø prøverne og fortynd straks.
5. Vælg en eller flere brønde til at fungere som tom. Tilsæt 100 µL af prøvefortynder til brønd(e) der bliver anvendt som blank.
6. Tilsæt 100 µL af hver C3a Plus Standard (A, B, C, D, E) i duplikat. **BEMÆRK: Standarder er klar til brug og behøver ikke fortynding.**
7. Tilsæt 100 µL af både C3a Plus Lav kontrol og C3a Plus Høj kontrol i duplikat. **BEMÆRK: Kontrollen er klar til brug og behøver ikke fortynding.**
8. Tilsæt 100 µL af hver fortyndet prøve til sin tildelte microassay brønd. (Se *Prøvefortynding*).
9. Inkubér ved 18°C til 25°C i 60 ± 10 minutter.
10. Vask microassay brønde som følgende:
  - a. Efter inkubation i trin 9 (eller i trin 12 nedenfor) fjern væsken fra hver brønd.
  - b. Tilsæt ca. 300 µL vaskeopløsning til hver brønd med en vaskeflaske, eller automatisk påfyldning enhed.
  - c. Fjern væsken fra hver brønd.
  - d. Gentag trin b-c yderligere tre gange.**
  - e. Efter den fjerde vaskecyklus vendes pladen, og tryk fast på absorberende papir to gange for at fjerne den resterende væske.
11. Ved hjælp af en multikanals eller gentage pipette, dispenser 100 µL af C3a konjugat i hver vasket testbrønd, herunder blindprøvebrønd (r).
12. Inkubér microassay strips ved 18°C til 25°C i 60 ± 10 minutter.
13. Vask microassay brønde efter de 60 minutter inkubation (trin 12), som beskrevet under *TESTMETODE*, trin 10.
14. Umiddelbart efter vaske proceduren, dispenser 100 µL af substratopløsning i hver brønd, herunder tomme.
15. Inkubér microassay strips ved 18°C til 25°C i 15 (± 1) minutter.
16. Tilsæt 100 µL af stopopløsning til hver brønd for, at stoppe den enzymatiske reaktion. Stopopløsningen bør tilføjes til brøndene i samme rækkefølge, og i samme takt som substratopløsning. Bank forsigtigt på pladen for at sprede farveudviklingen jævnt.

**BEMÆRK: Optimale resultater kan opnås ved hjælp af pladelæser's auto-mix funktion (hvis den findes) lige inden aflæsning af pladen.**

17. Absorbans bestemmes ved læsning ved 450 nm ( $A_{450}$  værdi) for hver test og inden for 60 minutter, efter tilsætning af Stopopløsning (trin 16), foretag de nødvendige blank korrektioner.
18. Bestem koncentrationen af prøver og kontroller fra standardkurven.
19. Afhænde de resterende fortyndede prøver og kontroller, og de anvendte mikroanalysestrips (se *ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER*).

## KVALITETSKONTROL

God laboratoriepraksis anbefaler brugen af kontroller for at sikre, at analysen fungerer korrekt. Hvert C3a Plus kit indeholder Lav og Høj-kontroller der kan anvendes til dette formål. Kontrol intervaller er oplyst. Kontrol værdier er beregnet for, at verificere validiteten af kurve og prøveresultater. Hvert laboratorium bør etablere sine egne parametre for acceptable assay grænser. Hvis kontrol værdier IKKE er indenfor de acceptable grænser, bør analyse resultaterne betragtes tvivlsomme, og prøverne skal gentages. Derudover kræver indlægssedlen, at standardkurve genereret med kittets Standarder, opfylder strenge validerings krav. Hvis analysen ikke opfylder disse krav, gentag analysen, eller kontakt Quidel Teknisk Service.

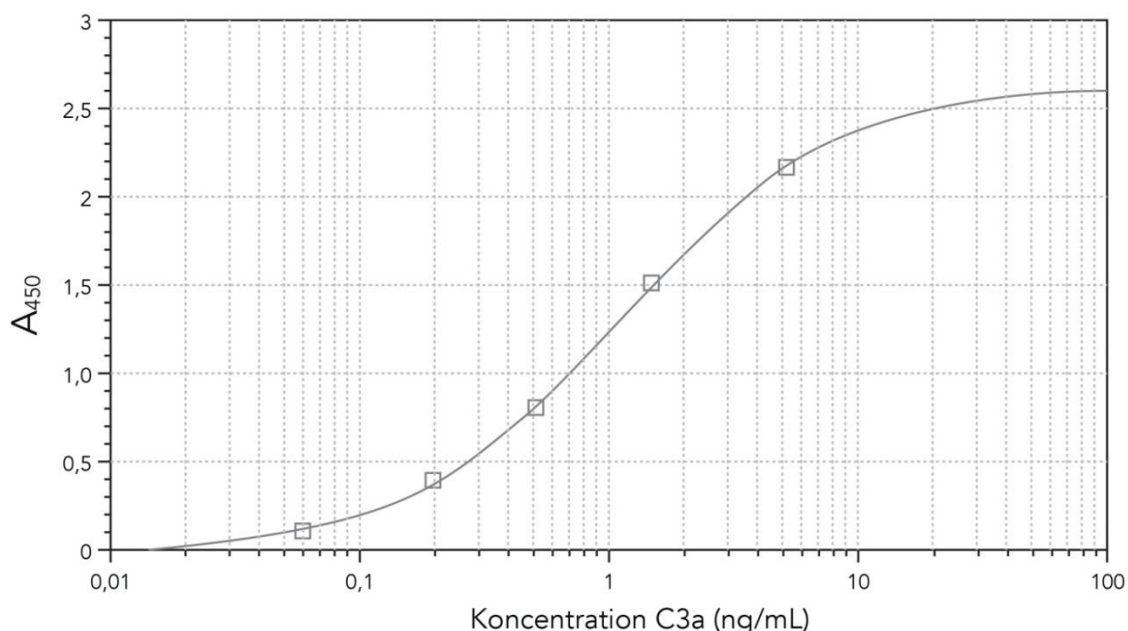
Certificat af Analysen er inkluderet i dette kit, og er meget lot specifikke, og benyttes til, at kontrollere, at de opnåede resultater af dit laboratorium svarer til dem, der opnås ved Quidel Corporation.

## FORTOLKNING AF RESULTATER

### Beregning af resultater

**Brug af standardkurven:** Standardkurven for C3a Plus EIA genereres ved hjælp af tomme brøde  $A_{450}$  værdier for hver standard (på y-aksen), og den tildelte koncentration for hver standard (på x-aksen). Standardkurven skal opfylde valideringskravene. Et eksempel på en typisk standard kurve er vist i Figur 1.

**Figur 1. Repræsentativ Standardkurve**



### Beregning af de faktiske C3a koncentrationer i prøverne

De tildelte koncentrationer på standard og kontrol rørene er i absolutte enheder for C3a. Koncentrationen af C3a i en prøve bestemmes ved at multiplicere den målte koncentration af den relevante prøve fortyndingsfaktoren. For eksempel, hvis en EDTA-plasma prøve er fortyndet 1:200, og den logistiske 4-parameter kurve giver en koncentration på 0,5 ng C3a/ml, så er koncentrationen af C3a i prøven 100 ng C3a/ml (eller  $200 \times 0,5$ ).



For at opnå nøjagtig C3a koncentration bestemmelser for prøverne, der giver  $A_{450}$  værdier større end ULOQ eller værdier mindre end LLOQ, bør prøverne genanalyseres i en anden fortynding, så deres nye  $A_{450}$  værdier vil være inden for disse grænser. I alle gentagne assaysskal C3a standarder og kontroller også testes igen.

## Validering

Bestem den øvre asymptote (D) og korrelationskoefficienten af den afledte, logistiske 4-parameterkurve, der passer til C3a A-, B-, C-, D- og E-standarderne. Værdierne skal ligge inden for de angivne intervaller for at kvalificere analysen:

korrelationskoefficient ( $r^2$ ):	> 0,98
øvre asymptote (D):	≥ 1.49

Se label på vials for det accepterede C3a interval for lav og høj kontrol.

## BEGRÆNSNINGER

MicroVue C3a Plus Enzym Immunoassay har været brugt til, at teste serum eller plasma i K2 EDTA. Andre antikoagulanter har ikke været testet.

## OBSERVERET VÆRDIER

EDTA plasma og serum fra tyve (20) normale og sunde donorer blev testet i MicroVue C3a Plus Enzyme Immunoassay kittet. Resultaterne ses herunder.

	n	Gennemsnit (ng/ml)	Interval (ng/ml)
EDTA Plasma	20	129,6	33,8 til 268,1
Serum	20	240,4	71,0 til 589,2

BEMÆRK: C3a koncentrationer bestemmes for plasma eller serum prøver kan variere mellem laboratorier, og derfor anbefales det, at hvert laboratorium fastlægge sit eget koncentrations interval. Koncentrationerne angivet ovenfor bør alene betragtes som en retningslinje.

## UDFØRELSE AF FORSØGET

### Grænseværdier

**LOD:** Detektionsgrænsen (LOD) for C3a-Plus assayet er 0,012 ng /ml, bestemmes af den øvre 3SD grænse i en nul-standard undersøgelse.

**LLOQ:** Den nedre grænse for kvantificering (LLOQ) af C3a-Plus analysen er 0,023 ng /ml, den laveste koncentration på standardkurven, der opfylder interne kriterier for nøjagtighed og præcision.

**ULOQ:** Den øvre grænse for kvantificering (ULOQ) for C3a-Plus analysen er 2,531 ng/ml, den højeste koncentration på standardkurven, der opfylder de interne kriterier for nøjagtighed og præcision. Fortyndede prøver med en koncentration over denne grænse skal analyseres igen i en højere fortynding.

## Forstyrrende stoffer

Følgende stoffer blev testet i C3a-Plus analyse og ikke fundet at interferere med analysen:

Substans	Koncentration
Albumin	6000 mg/dL
γ Globulin	6000 mg/dL
Bilirubin	20 mg/dL
Hemoglobin	200 mg/dL
Triglycerides	3000 mg/dL
Na + Heparin	3 U/ml
Glucose	1000 mg/dL
Cholesterol	500 mg/dL
EDTA	10 mM
C3 Protein	5 µg/ml
C5 Protein	5 µg/ml
C5a	5 µg/ml

## Præcision

'Indenfor-kørsel' og 'mellem-kørsel' præcision blev bestemt ved metode til påvisning af 20 dublikater af 2 plasmaprøver og 2 serumprøver i 10 forskellige kørsler.

Prøve	C3a	Indenfor kørsel <sup>1</sup>	Mellem kørsler <sup>2</sup>
	(ng/ml)	C.V. (%)	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

<sup>1</sup>n = 20 replicater    <sup>2</sup>n = 10 kørsler

## Linearitet

Linearitet var udført ved seriel fortynding af prøver med prøvediluent, og de sammenlignede observerede værdier sammenholdt med de forventede.

Prøve	Fortyndingsfaktor	Observeret C3a (ng/ml)	Genfindelse (%)
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

## Spiking Inddrivelse

Spiking Inddrivelse blev udført ved at spike prøverne med en kendt kvantitet oprenset C3a og sammenligne de observerede værdier med de forventede værdier.

Prøve	C3a (ng/ml)	Spike (ng/ml)	Resultat (ng/ml)	Inddrivelse (%)
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

## KUNDE HENVENDELSER

For tjenester uden for USA, bedes du kontakte din lokale forhandler. Yderligere oplysninger om Quidel og Quidel's produkter og forhandlere, kan findes på vores hjemmeside [quidel.com](http://quidel.com).

## REFERENCER

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- $\alpha$  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**

**PIA032001DA00 (11/17)**

## ORDLISTE

---

**REF**

Katalognummer



CE-mærket for overensstemmelse

---

**EC REP**

Autoriseret repræsentant i det Europæiske

**LOT**

Batch-code

---



Anvendes inden



Producent

---



Temperaturbegrænsning



Tilsigtet anvendelse

---



Konsultere brugsanvisningen e-mærkning af



Biologisk fare

---

**IVD**

Til *in vitro* diagnostisk anvendelse



Indeholder nok til 96 bestemmelser

---

**CONT**

Inghold/Indeholder

**CONTROL**

Prøve

---