

Enzym-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung des C3a-Fragments des Komplementproteins C3 in Humanserum oder Plasma.

ZUSAMMENFASSUNG

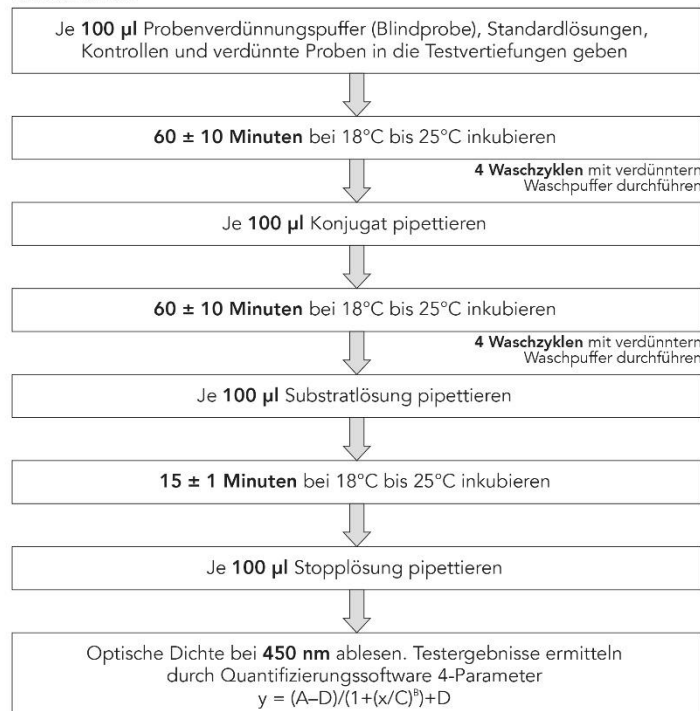
Vorbereitung von Reagenzien

- Konzentrierte Waschlösung im Verhältnis 1:20 mit entionisiertem Wasser verdünnen

Vorbereitung von Proben (Plasmaprobe – 1:200; Serumprobe – 1:5000)

- Probenverdünnungspuffer für Verdünnung-1 in separate Röhren oder Platten pipettieren
90 µl für jede Plasmaprobe
490 µl für jede Serumprobe
- Probenverdünnungspuffer für Verdünnung-2 in separate Röhren oder Platten pipettieren
475 µl für jede Plasmaprobe
495 µl für jede Serumprobe
- Proben schnell bei 37 °C auftauen, bis ungefähr 90 % der Probe aufgetaut ist. Sofort auf Eis legen.
- Jede Probe vorsichtig mischen.
- Von jeder Plasma- oder Serumprobe 10 µl in die entsprechende Menge Probenverdünnungspuffer für Plasma oder Serum für Verdünnung-1 pipettieren und vorsichtig mischen.
- Von jeder Verdünnung-1 die folgenden Volumina in die entsprechende Menge Verdünnungspuffer (Verdünnung-2) pipettieren und vorsichtig mischen.
25 µl Plasmaprobe Verdünnung-1 → 475 µl Verdünnungspuffer
5 µl Serumprobe Verdünnung-1 → 495 µl Verdünnungspuffer

Testverfahren





VERWENDUNGSZWECK

Der MicroVue C3a Plus Enzym-Immunoassay bestimmt die Konzentration von C3a in Humanserum oder plasma.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Der MicroVue C3a Plus Enzymimmunoassay ist ein "Direct-Capture-Immunoassay" und dient der Messung des C3a in Humanserum, -plasma und anderen biologischen oder experimentellen Proben.

Unter normalen Bedingungen führt die Aktivierung des klassischen, alternativen oder Lektin-Wegs zur Bildung eines C3-Konvertase-multi-molekular-enzym, das C3 in C3a und C3b spaltet.¹ C3a ist ein niedermolekulares (etwa 9kD schweres) Proteinfragment, das aus 77 Aminosäuren besteht.² C3a wird durch das Serumenzym Carboxypeptidase N schnell in eine stabilere und weniger aktive Form, das C3a des-Arg, metabolisiert.³ Zur Vereinfachung werden in dieser Dokumentation beide Formen als "C3a" bezeichnet.

Der MicroVue C3a Plus Assay ist ein schnelles, hochspezifisches Verfahren zur quantitativen Messung der C3a-Konzentrationen bereit. Er eignet sich hervorragend für Untersuchungen, die die Rolle oder den Status der terminalen Komplementaktivierung in zahlreichen Forschungsbereichen betreffen sowie für das Monitoring der Bildung von C3a *in vivo* oder *in vitro*. C3a erhöht nachweislich die Gefäßpermeabilität, wirkt spasmogen und chemotaktisch und regt eine Reihe von Zelltypen zur Abgabe von pharmakologisch aktiven Mediatoren an. Die Rolle von C3a in der Pathogenese von Entzündungsreaktionen bei gram-negativer bakterieller Sepsis, Trauma, ischämischer Herzkrankheit, zerebraler Ischämie, post Dialysesyndrom und anderen Autoimmunerkrankungen (einschließlich rheumatoider Arthritis, Lupus erythematodes und akuter Glomerulonephritis) ist dokumentiert.^{4, 6-23}

FUNKTIONSPRINZIP

Der MicroVue C3a Plus Enzymimmunoassay ist ein Dreischrittverfahren zugrunde. Zur Durchführung des Assays werden (1) Mikrotiterplatte, beschichtet mit monoklonalen murinen Antikörpern (spezifisch für das Neoepitop von humanen C3a), (2) ein HRP-konjugierter polyklonaler Antikörper gegen die C3a-Region von C3 und (3) ein chromogenes Substrat.

In Schritt 1 werden Standardlösungen, Kontrollen und verdünnte Testproben in die Testvertiefungen, die mit einem murinen monoklonalen Antikörper gegen C3a beschichtet sind, gegeben. Der monoklonale Antikörper bindet das C3a in den Standardlösungen, Kontrollen oder Proben. Nach Inkubation wird durch Waschen ungebundenes Material entfernt.

In Schritt 2 wird an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierter anti-C3(C3a) in jede Vertiefung gegeben. Das enzymkonjugierte anti-C3(C3a) bindet sich an das immobilisierte C3a, das im ersten Schritt gebunden wurde. Nach Ablauf der Inkubation wird durch Waschen ungebundenes Material entfernt.

In Schritt 3 wird 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), eine gebrauchsfertige chromogene Substratlösung, in die Testvertiefungen gegeben. Die gebundene Meerrettichperoxidase reagiert mit dem Substrat und bildet dabei eine blaue Farbe. Nach Ablauf der Inkubation wird die Reaktion chemisch gestoppt, was zu einer Farbänderung von blau zu gelb führt und bestätigt, dass eine Reaktion stattgefunden hat. Die Farbintensität wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Farbintensität der Reaktionsmischung verhält sich proportional zu der C3a-Konzentration, die in den verdünnten Standardlösungen, Kontrollen und Testproben vorliegt. Die Ergebnisse werden aus der Standardkurve mit 4-Parameter-analyse berechnet.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

96 Tests zur Bestimmung des C3a-Komplexes

Der MicroVue C3a Plus EIA Kit enthält folgende Komponenten:

A	C3a Plus Standardlösungen	Artikelnr. 5140 – 5415	je 1, 1,5 ml
B	Gebrauchsfertig. Enthält Humanserum mit bekannten C3a-Konzentrationen (ng/ml),		
C	Proteinstabilisatoren		
D			
E			
L	Niedrige Kontrolle	Artikelnr. 5146	1,5 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält Humanserum mit bekannter C3a-Konzentration (ng/ml), Proteinstabilisatoren		
N	Hohe Kontrolle	Artikelnr. 5147	1,5 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält Humanserum mit bekannter C3a-Konzentration (ng/ml), Proteinstabilisatoren		
1	Beschichtete Teststreifen	Artikelnr. 5148	je 12
	Streifen à 8 Vertiefungen, beschichtet mit murinem monoklonalen Antikörper in einem wiederverschließbaren Folienbeutel		
2	Stopplösung	Artikelnr. A9947	12 ml
	Enthält 1N (4%) Salzsäure		
3	20fach konzentrierte Waschlösung	Artikelnr. A9957	je 2, 50 ml
	Enthält phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 1,0% Tween-20® und 0,035% Proclin® 300		
4	Probenverdünnungspuffer	Artikelnr. 5150	50 ml
	Enthält eine gepufferte Proteinbasis mit 0,05% ProClin 300		
5	TMB Substrat	Artikelnr. 5059	12 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)		
6	Konjugat	Artikelnr. 5151	12 ml
	An Meerrettichperoxidase konjugierter polyklonaler Antikörper gegen C3a		

Tween-20® ist eine eingetragene Marke der ICI Americas Inc.

ProClin® ist eine eingetragene Marke der Rohm and Haas Company.

NICHT MITGELIEFERTE, BENÖTIGTE MATERIALIEN

- Stoppuhr (Bereich von 60 Minuten)
- Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (VWR REF: 47743-828) oder Teströhrchen und Ständer für Probenverdünnung (optional)
- Saubere, unbenutzte Mikrotiterplatte für Doppelplattenverfahren (optional)
- Messbehälter für die Verdünnung des Waschpuffers
- Waschflasche oder ein anderes für Immunoassays geeignetes validiertes Waschsystem
- Mikropipetten und sterile Einwegpipettenspitzen
- Reagenzreservoirs für die Zugabe von Konjugat, Substrat und Stopplösung auf die Platte (für jedes Reagenz ein sauberes, unbenutztes Reservoir verwenden)
- Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanal) oder Mehrfachmikropipetten
- Plattenlesegerät für Extinktionsmessungen (E₄₅₀-Wert) für den Bereich von 0,0 bis 3,0
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Für die *In-Vitro*-Diagnostik.
- Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln. Bei der Arbeit mit diesem Kit und den Patientenproben allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Die Testreagenzien wie angegeben lagern.
- Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
- ProClin 300 wird als Konservierungsmittel verwendet. Der unbeabsichtigte Kontakt mit Pufferlösungen oder Reagenzien, die ProClin enthalten, bzw. deren Einnahme kann zu Reizungen der Haut, der Augen oder des Mundes führen. Die Anforderungen guter Laborpraxis beachten, um die Exposition zu verhindern. Beim Auftreten der ersten Symptome einen Arzt aufsuchen.
- Die Stopplösung ist ätzend und kann Reizungen verursachen. Nicht einnehmen. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen. Im Fall der Einnahme Arzt aufsuchen.
- Human Material von Blutspendern, die für die Standardlösungen und Kontrollseren dieses Produkts verwendet werden, wurden mit einer von der FDA zugelassenen Methode auf Antikörper gegen HIV (HIV1 und HIV2), Hepatitis-C-Viren sowie HBsAg untersucht. Da keine Testmethode mit 100%iger Sicherheit garantieren kann, dass keine infektiösen Substanzen vorliegen, sollten diese Reagenzien wie alle potenziell infektiösen Humanserum- oder Blutproben gemäß Biosafety Level 2 behandelt werden. Dementsprechende Empfehlungen sind im Handbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," Centers for Disease Control/National Institutes of Health, beschrieben.⁽²⁴⁾
- Für ein zügiges und effizientes Dosieren der Reagenzien wird der Gebrauch von Mehrkanal- oder Mehrfachpipetten empfohlen.
- Um korrekte Messungen zu gewährleisten, beim pipettieren der Proben und Standardlösungen genau arbeiten. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen und nur kalibrierte Geräte verwenden.
- Für korrekte Ergebnisse müssen die Proben fachgerecht entnommen und aufbewahrt werden (siehe *PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG*).
- Eine mikrobielle Kontamination oder Kreuzkontamination von Proben oder Reagenzien ist zu vermeiden.
- Jede Probe als Doppelbestimmung messen.
- Die Mikrotiterplatte Vertiefung jeweils nur für einen Test verwenden.
- Wenn die Inkubationszeiten und –temperaturen bei der Testdurchführung von den Vorgaben abweichen, die unter *TESTVERFAHREN* angegeben sind, können falsche Ergebnisse auftreten.
- Das TMB-Substrat muss während der Lagerung und Inkubation vor Licht geschützt werden. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen.
- Die Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
- Beim Entfernen von Flüssigkeiten aus den Vertiefungen den Boden der Vertiefungen nicht ankratzen oder berühren.
- Hitzeinaktivierte, hyperlipämische oder kontaminierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
- Um beim Waschen die Bildung von Aerosolen zu vermeiden, eine Vorrichtung verwenden, mit der die Waschflüssigkeit in eine Flasche mit haushaltsüblichem Bleichmittel gesaugt wird.
- Zum Waschen der Platte eine Waschflasche oder ein automatisiertes Dosiergerät verwenden (siehe *TESTVERFAHREN*, Schritt 10). Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikrotiterplatte verwenden.
- Testverfahren in Bereichen mit angemessener Belüftung durchführen.
- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.
- Bei der Handhabung der Kitkomponenten geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
- Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt (SDB) auf quidel.com, um weitere Informationen zu Gefahrensymbolen, Sicherheit, Handhabung und Entsorgung der Komponenten in diesem Kit zu erhalten.

LAGERUNG

Kit bei 2°C bis 8°C aufbewahren. Reagenzien und Materialien vor dem Gebrauch auf 18°C bis 25°C bringen. Alle nicht benötigten Mikrotiterplatt-Teststreifen wieder in den Beutel legen, den Beutel verschließen und bei 2°C bis 8°C lagern.

ANZEICHEN FÜR INSTABILITÄT ODER ZERSETZUNG DER REAGENZIEN

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

Eine Trübung oder Farbveränderung der Probenverdünnungspuffer weist auf einen Zersetzungsvorgang bei diesem Reagenz hin. In diesem Fall sollte die Lösung entsorgt werden. Die Farbe des Probenverdünnungspuffers kann von Rosa bis Braun variieren, was jedoch normal ist und nicht auf Zersetzung oder Instabilität hinweist.

ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Bei der Handhabung und der Entsorgung aller Proben die allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Alle Bearbeitungsvorgänge der Proben sollten bei 2°C bis 8°C durchgeführt werden.

Probennahme

Entnahme, Bearbeitung und Lagerung der Proben müssen fachgerecht durchgeführt werden, da bei einer unsachgemäßen Handhabung der Proben durch artefaktische Komplementaktivierung C3a gebildet werden kann. Für optimale Ergebnisse bei Plasma werden K2-EDTA-Blutabnehmeröhrchen empfohlen (Fisher REF: 22-040-161).

Die Werte von normalen Serumproben sind üblicherweise höher als die von EDTA-plasmaproben. Die C3a-Konzentrationen in EDTA-plasma entsprechen daher u. U. in höherem Maße den *In-Vivo*-Konzentrationen.²⁵

Serum-, EDTA-plasmaproben sollten mit Hilfe eines Standardverfahrens unter keimfreien Bedingungen entnommen werden.²⁶ Die Proben sollten umgehend getestet oder bis zur Testdurchführung für maximal 2 Stunden auf Eis gelagert werden.

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

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

Auftauen eingefrorener Proben

Vor dem Auftauen der Proben für den Test eine Verdünnungsplatte (oder Röhrchen) vorbereiten, und die entsprechende Menge an Probenerdünnungspuffer hinzufügen (wie unten im Abschnitt „*Probenverdünnung*“ beschrieben). Der Zeitraum zwischen dem Auftauen und Verarbeiten der Proben sollte minimal sein.

Gefrorene Proben schnell bei 37°C bis kurz nach dem Auftaupunkt auftauen. Die aufgetauten Proben sofort auf Eis legen, um Komplementaktivierung vor der Verdünnung zu vermeiden. **Die Proben nicht länger als zwei Stunden auf Eis lassen. Proben nicht bei 37°C aufbewahren**, da sonst Komplementaktivierung auftreten kann. Proben nicht bei Raumtemperatur oder auf Eis auftauen, da dies zur C3-Aktivierung und damit zur Beeinträchtigung der Ergebnisse führen kann. Proben sollten unmittelbar nach dem Auftauen getestet werden. Nur ein einziger Gefrier/Auftauzyklus kann ohne die Beschädigung der Proben

durchgeführt werden. Falls Proben zur weiteren Analyse wieder eingefroren werden sollen wird das Einfrieren mehrerer Proben-Aliquote empfohlen um wiederholte Gefrier-/Auftauzyklen zu vermeiden.

Probenverdünnung

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

HINWEIS: Wichtige Hinweise zum korrekten Auftauen gefrorener Proben sind unter *ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN* aufgeführt. Die korrekte Handhabung der Proben ist für präzise Ergebnisse unerlässlich.

HINWEIS: Es ist sehr wichtig, dass die Probenentnahme und -verdünnung ordnungsgemäß ausgeführt wird, um eine Komplementaktivierung und die daraus resultierende Bildung von C3a auszuschließen.

Die Proben **müssen** so weit verdünnt werden, dass die gemessenen E_{450} -Werte oberhalb der LLOQ (unteren Quantifikationsgrenze) liegen und den E_{450} -Wert ULOQ (obere Bestimmungsgrenze) nicht übersteigt. Proben, deren E_{450} -Werte außerhalb dieser Bereiche liegen, sollten in einem anderen Verdünnungsverhältnis neu getestet werden.

Die Anzahl (N) der zu testenden Proben bestimmen. Zwei Sätze von Probenröhrchen 1 bis N beschriften und die Probendaten jedes Probenröhrchens schriftlich festhalten. Alternativ dazu kann eine Verdünnungsplatte mit 96 Vertiefungen zur Herstellung der Verdünnungen verwendet werden.

Alle Proben mit Probenverdünnungspuffer auf ein geeignetes Verhältnis verdünnen (siehe folgenden Abschnitt). Gründlich mischen, dabei jedoch die Bildung von Schaum und Blasen vermeiden. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden.

Verdünnungsmethode

Um optimale Ergebnisse zu erhalten, zwei Verdünnungen für die Aufbereitung jeder Probe wie folgt vorbereiten:

Plasmaproben

Mit dem Probenverdünnungspuffer 1:200 verdünnen wie folgt:

- Für jede Verdünnung mit der Pipette 90 μ L Probenverdünnungspuffer für Verdünnung 1 und 475 μ L für Verdünnung 2 in separate Verdünnungsröhrchen oder -platten geben.
- Für Verdünnung 1: 10 μ L der Testprobe zu 90 μ L Probenverdünnungspuffer geben (Röhrchen oder -platten für Plasmaverdünnung 1). Vorsichtig mischen.
- Für Verdünnung 2: 25 μ L der Verdünnung 1 zu 475 μ L Probenverdünnungspuffer geben (Röhrchen oder -platten für Plasmaverdünnung 2). Vorsichtig mischen.

Serumproben

Mit dem Probenverdünnungspuffer 1:5000 verdünnen wie folgt:

- Für jede Testprobe mit der Pipette 490 μ L Probenverdünnungspuffer für Verdünnung 1 und 495 μ L für Verdünnung 2 in separate Verdünnungsröhrchen oder -platten geben.
- Für Verdünnung 1: 10 μ L der Testprobe zu 490 μ L des Probenverdünnungspuffer geben (Röhrchen oder -platten für Serumverdünnung 1). Vorsichtig mischen.
- Für Verdünnung 2: 5 μ L der Verdünnung 1 zu 495 μ L Probenverdünnungspuffer geben (Röhrchen oder -platten für Serumverdünnung 2). Vorsichtig mischen.

Verdünnte Proben in Mikrotiterplattevertiefungen pipettieren

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

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

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

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien und Materialien vor dem Test auf 18°C bis 25°C bringen.

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

Standardlösungen und Kontrollen

Standardlösungen und Kontrollen müssen vor Verwendung nicht verdünnt oder zubereitet werden.

Waschlösung

Die 20fach konzentrierte Waschlösung durch mehrfaches Umdrehen der Flasche mischen. Wenn die 20fach konzentrierte Waschlösung bei 2°C bis 8°C gelagert wurde, haben sich u. U. Kristalle gebildet. Zum Auflösen dieser Kristalle die Flasche in ein 37°C bis 50°C warmes Wasserbad stellen, bis sich alle Kristalle aufgelöst haben, und den Inhalt der Flasche anschließend sorgfältig mischen. Die Waschlösung vorbereiten, indem der gesamte Inhalt der 20fach konzentrierten Waschlösungsflasche mit entionisiertem oder destilliertem Wasser auf 1 Liter verdünnt wird. Gründlich mischen. Die Waschlösung ist bei Aufbewahrung in einem sauberen Behälter bei 2°C bis 8°C für 30 Tage haltbar. Das Reagenz beim Auftreten von Verfärbungen oder Trübungen entsorgen.

Bereitstellen der Mikrotiterplatte-Teststreifen

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

TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

Siehe hierzu *VORBEREITUNG DER REAGENZIEN* und *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*.

1. Die Positionen der Leerwerte, Proben, Standardlösungen und Kontrollen sowie die auf den Flaschenetiketten angegebenen Chargennummern schriftlich festhalten. Die Ausrichtung der Mikrotiterplatte durch die Markierung einer Plattenecke kennzeichnen.
2. Die Verdünnungsplatte/-Röhrchen für alle Testproben entsprechend beschriften.
3. Probenverdünnungspuffer in die Verdünnungsplatte/ Röhrchen geben (siehe *Probenverdünnungen*).
4. Die Testproben auftauen und sofort verdünnen
5. Eine oder mehrere Vertiefungen für die Leerwerte auswählen. 100 µL des Probenverdünnungspuffers in diejenige(n) Vertiefung(en) geben, die zur Bestimmung des Nullwertes des Plattenlesegeräts verwendet werden sollen (die sogenannten Leerwerte).
6. Je 100 µL der C3a Standardlösungen (A, B, C, D und E) in die Doppelvertiefungen geben. **HINWEIS: Die Standardlösungen sind bereits verdünnt und können ohne weitere Vorbereitungen eingesetzt werden.**
7. Je 100 µL der niedrigen und der hohen C3a-Kontrolle in die Doppelvertiefungen geben. **HINWEIS: Die Kontrollen sind bereits verdünnt und können ohne weitere Vorbereitungen eingesetzt werden.**
8. Je 100 µL der verdünnten Proben in die entsprechenden Vertiefungen geben (siehe *Probenverdünnungen*).
9. Bei 18°C bis 25°C für 60 ± 10 Minuten inkubieren.
10. Die Vertiefungen wie folgt waschen:
 - a. Nach der Inkubation von Schritt 9 (oder Schritt 12 - siehe unten) die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - b. Mit einer Waschflasche oder einem automatisierten Dosiergerät etwa 300 µL Waschlösung in jede Vertiefung geben. Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikrotiterplatte verwenden.
 - c. Die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen entfernen.
 - d. Die Schritte b-c weitere drei Mal wiederholen.**
 - e. Die Platte nach dem vierten Waschschrift umdrehen und zweimal vorsichtig auf absorbierendem Papier ausklopfen, um Restflüssigkeiten zu entfernen.
11. Mit einer Mehrkanal- oder Mehrfachpipette jeweils 100 µL des C3a-Konjugats in jede gewaschene Testvertiefung, auch für die Leerwerte, geben.
12. Die Mikrotiterplatte-Teststreifen bei 18°C bis 25°C für 60 ± 10 Minuten inkubieren.
13. Die Vertiefungen nach der 60-minütigen Inkubation (Schritt 12) wie in Schritt 10 unter *TESTVERFAHREN* beschrieben waschen.
14. Unmittelbar nach dem Waschschrift je 100 µL Substratlösung in jede Vertiefung, auch für die Leerwerte, geben.
15. Die Mikrotiterplatte-Teststreifen bei 18°C bis 25°C für 15 (± 1) Minuten inkubieren.
16. Je 100 µL Stopplösung zum Stoppen der enzymatischen Reaktion in jede Vertiefung geben. Die Zugabe der Stopplösung in die Vertiefungen sollte in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgen wie bei der Zugabe der Substratlösung. Die Platte vorsichtig antippen, damit sich die Farbentwicklung gleichmäßig verteilt.
HINWEIS: Optimale Ergebnisse werden durch die Anwendung der automatischen Mischfunktion (falls vorhanden) direkt vor dem Ablesen der Mikroassay-Platte erreicht.
17. Innerhalb von 60 Minuten nach Zugabe der Stopplösung (Schritt 16) die Extinktion der Testvertiefungen bei 450 nm bestimmen (E_{450} -Wert) und eine Leerwertkorrektur vornehmen.
18. Die Konzentration der Proben und Kontrollen anhand der Standardkurve bestimmen.
19. Die übrigen verdünnten Proben und Kontrollen sowie die benutzten Mikrotiterplatte-Teststreifen entsorgen. (siehe *WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN*).

QUALITÄTSKONTROLLE

Gemäß guter Laborpraxis sollten Kontrollen verwendet werden, um die Richtigkeit der Testergebnisse zu gewährleisten. Zu diesem Zweck enthält jedes C3a Plus-Kit niedrige und hohe Kontrollen. Die im Rahmen der Qualitätskontrolle zu verwendenden Bereiche sind angegeben. Die Kontrollwerte haben die Aufgabe, die Gültigkeit der Kurve und der Probenergebnisse zu bestätigen. Jedes Labor sollte eigene Kriterien für akzeptable Testlimits erstellen. Wenn die Kontrollwerte NICHT innerhalb des Akzeptanzbereichs Ihres Labors liegen, sollten die Testergebnisse in Frage gestellt und die Proben erneut getestet werden. Zudem wird in der Packungsbeilage vorausgesetzt, dass die mit den Standardlösungen des Testkits erstellte Standardkurve, strengen Validierungsanforderungen gerecht wird. Erfüllt der Test diese Anforderungen nicht, den Test wiederholen oder den technischen Kundendienst von Quidel verständigen.

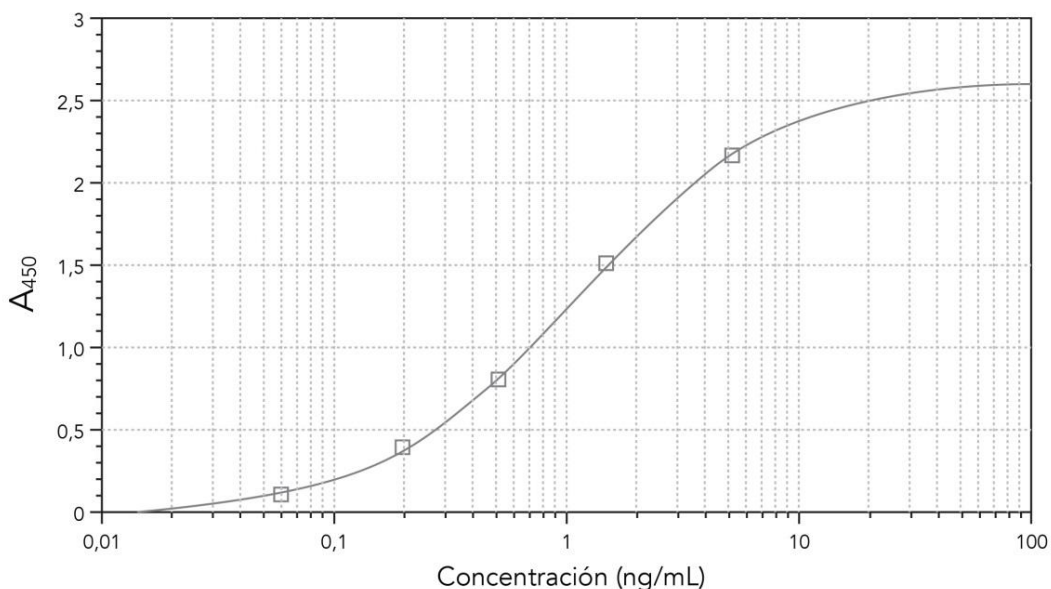
Das diesem Testkit beiliegende Analysezertifikat ist chargenspezifisch und soll sicherstellen, dass die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse denen von Quidel Corporation entsprechen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Berechnung der Ergebnisse

Verwendung der Standardkurve: Die Standardkurve des C3a Plus EIA wird mit dem Leerwert-korrigierten E_{450} -Werten der verschiedenen Standardlösungen (auf der y-Achse) und den bekannten Konzentrationen der Standardlösungen (auf der x-Achse) erstellt. Testergebnisse ermitteln durch Quantifizierungssoftware 4-Parameter. Die Standardkurve muss den Validierungsanforderungen gerecht werden. Ein Beispiel einer typischen Standardkurve ist in Abbildung 1 dargestellt.

Abbildung 1
Typische Standardkurve



Berechnung der tatsächlichen C3a-Konzentration in den Proben

Bei den Konzentrationen, die auf den Fläschchen der Standardlösungen und Kontrollen angegeben sind, handelt es sich um absolute Konzentrationen des C3a. Die in einer Probe vorliegende C3a-Konzentration wird berechnet, indem die gemessene Konzentration mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Probe multipliziert wird. Wurde z. B. für eine EDTA-Plasmaprobe, die für den Test im Verhältnis 1:200 verdünnt wurde, anhand der 4-PL Kurve eine Konzentration von 0,5 ng C3a/ml ermittelt, dann entspricht dies einer C3a-Konzentration in der Probe von 100 ng C3a/ml (oder $200 \times 0,5$).

Um für Proben mit E_{450} -Werten, die über dem E_{450} -Wert der C3a-ULOQ oder unter dem E_{450} -Wert der LLOQ liegen, genaue C3a-Konzentrationen zu erhalten, sollten die Proben mit einem anderen

Verdünnungsverhältnis erneut getestet werden, so dass ihre neuen E_{450} -Werte innerhalb dieser Grenzwerte liegen. Bei allen Testwiederholungen müssen auch die C3a-Standardlösungen und Kontrollen gemessen werden.

Validierung

Die obere Asymptote (D) und den Korrelationskoeffizienten der abgeleiteten 4-Parameter-Logistikkurve für die C3a-Standards A, B, C, D und E bestimmen. Die Werte müssen innerhalb der folgenden Bereiche liegen, damit der Test gültig ist:

Korrelationskoeffizient (r^2): $> 0,98$
Obere Asymptote (D): ≥ 1.49

Der zulässige C3a-Konzentrationsbereich ist für die niedrigen und hohen Kontrollen auf den Fläschchen angegeben.

GRENZEN DER METHODE

Der MicroVue C3a Plus Enzymimmunoassay wurde zum Testen von Proben eingesetzt, die als Serum oder Plasma in K2 EDTA. Andere Antikoagulanzen wurden nicht untersucht.

GEMESSENE WERTE

EDTA-Plasma- und Serumproben von zwanzig (20) gesunden Blutspendern wurden mit dem MicroVue C3a Plus Enzym-immunassay getestet. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

	n	Mittelwert (ng/ml)	Bereich (ng/ml)
EDTA-Plasma	20	129,6	33,8 bis 268,1
Serum	20	240,4	71,0 bis 589,2

ACHTUNG: Die C3a-Konzentrationen, die in Plasma- oder Serumproben gemessen werden, können von Labor zu Labor variieren. Daher wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Bereich bestimmt. Die oben aufgeführten Konzentrationen sollten nur als Richtwerte dienen.

LEISTUNGSMERKMALE DES TESTS

Grenzen

LOD: Die Nachweisgrenze („Limit of Quantitation“ - LOD) des C3a Plus-Assays liegt bei 0,012 ng/ml und wurde im Rahmen einer Nullstandardstudie an der 3fachen Standardabweichung festgelegt.

LLOQ: Die untere Quantifikationsgrenze („Lower Limit of Quantitation“ - LLOQ) des C3a Plus Assays liegt bei 0,023 ng/ml. Dies entspricht der niedrigsten Konzentration der Standardkurve, die den internen Kriterien für Genauigkeit und Präzision noch gerecht wird.

ULOQ: Die obere Bestimmungsgrenze („Upper Limit of Quantitation“ - ULOQ) des C3a-Plus Assays liegt bei 2,531 ng/ml. Dies entspricht der höchsten Konzentration der Eichkurve, die den internen Kriterien für Genauigkeit und Präzision noch gerecht wird. Verdünnte Proben mit einer Konzentration oberhalb dieses Grenzwerts sollten mit einer höheren Verdünnung erneut getestet werden.

Störsubstanzen

Die folgenden Substanzen wurden mit den angegebenen Konzentrationen getestet. Sie stellen keine Störung für den C3a Plus Assay dar:

Substanz	Konzentration
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
Insgesamt C3	5 µg/ml
Insgesamt C5	5 µg/ml
C5a	5 µg/ml

Präzision

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

Probe	C3a (ng/ml)	in der Serie ¹ C.V. (%)	von Serie zu Serie 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 replikate ²n = 10 testserien

Linearität

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

Probe	Verdünnungsfaktor	Gefundenes C3a (ng/ml)	Wiederfindung (%)
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

Wiederfindung

Die maximale Wiedergewinnung (engl. „spike recovery“) wurde dadurch ermittelt, dass Proben mit einer bekannte Menge gereinigtem C3a versetzt und die gemessenen mit den erwarteten Werten verglichen wurden.

Probe	C3a (ng/ml)	Zugabe (ng/ml)	Resultat (ng/ml)	Wiederfindung (%)
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

KUNDENDIENST

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

LITERATURVERWEISE

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.2007.08.050.
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

PIA032001DE00 (11/17)

GLOSSAR

REF

Katalog-Nr.



CE-Konformitätskennzeichnung

EC REP

Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft

LOT

Chargencode



Verwenden bis



Hersteller



Temperaturbegrenzung



Verwendungszweck



Consult E-Beschriftung
Gebrauchsanweisung beachten



Biogefährdung

IVD

Zur *In-vitro*-Diagnostik



Inhalt ist ausreichend für 96 Bestimmungen

CONT

Inhalt/Enthält

CONTROL

Kontrolle
