

En enzymimmunanalys för kvantitering av C3a-fragment av komplementprotein C3 i human sera eller plasma

SAMMANDRAG

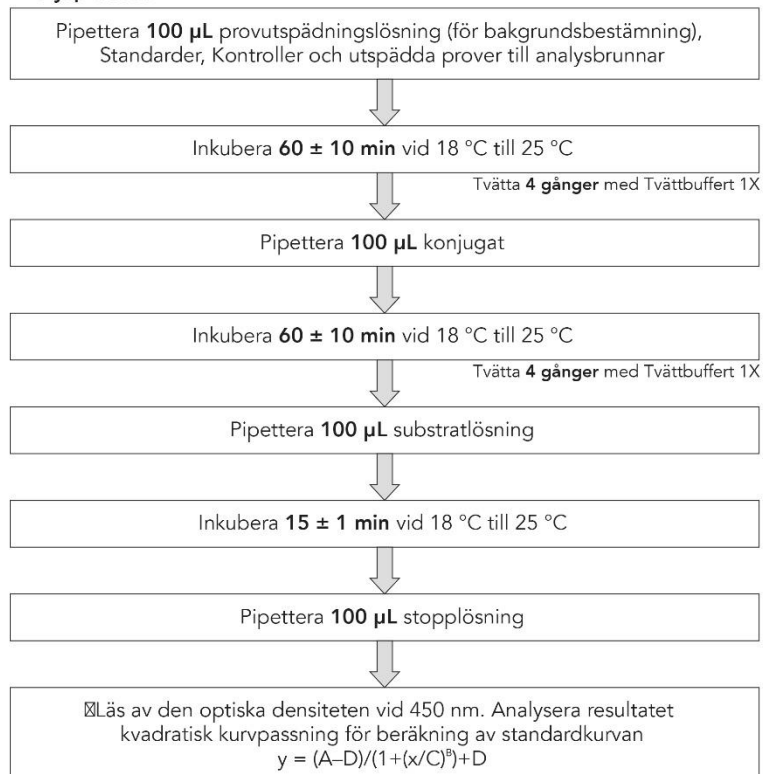
Förberedning av Reagens

- Späd tvättlösningskoncentrat 1:20 med destillerat vatten

Provförberedelse (Plasmaprover-1:200;Serumprover-1:5000)

- Pipettera provspädningsmedel för Spädning 1 i separata spädningsrör eller plattor:
90 µL för varje plasmaprov för plasmaspädningrör 1
490 µL för varje serumprov för serumspädningsrör 1
- Pipettera provspädningsmedel för Spädning 2 i separata spädningsrör eller plattor:
475 µL för varje plasmaprov för plasmaspädningrör 2
495 µL för varje serumprov för serumspädningsrör 2
- Tina proverna snabbt genom att inkubera dem vid 37 °C tills ungefär 90 % av provet är tinat. Placera dem genast på is.
- Blanda varje prov försiktigt.
- Överför 10 µL av varje plasma- eller serumprov till den aktuella spädningsvolymen 1 av provspädningsmedlet och blanda försiktigt.
- Överför 25 µL av varje spätt plasmaprov eller 5 µL av varje spätt serumprov från spädningssubstans 1 till den aktuella spädningsvolymen 2 av provspädningsmedlet och blanda försiktigt.
25 µL spätt plasmaprov 1 > 475 µL spädningsvolymen 2
5 µL spätt serumprov 1 > 495 µL spädningsvolymen 2

Analysprocedur





AVSEDD ANVÄNDNING

MicroVue C3a Plus-enzymimmunanalysen mäter mängden C3a i humant sera eller plasma.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

MicroVue C3a Plus-enzymimmunanalys är en 96-brunnars, direktinfästnings("direct-capture") immunanalys för mätning av C3a i humanserum, -plasma och andra biologiska eller experimentella prover.

Under normala betingelser resulterar aktivering av de klassiska, alternativa eller lektinkomplementvägarna i bildandet av ett multimolekylärt C3-konvertasenzym som är kapabelt att klyva C3 i C3a och C3b.¹ C3a är ett proteinfragment med låg molekylärvikt (ca 9kD) som består av 77 aminosyror.² C3a metaboliseras snabbt av serumenzymet karboxypeptidas N till en mer stabil, mindre aktiv form, bestående av 76 aminosyror, C3a des-Arg.³ För bekvämlighets skull kommer båda dessa former att hänföras till som "C3a" i denna dokumentation.

MicroVue-C3a Plus-analysen, en snabb, mycket specifik och kvantitativ procedur för mätning av C3a-nivåer, är konstruerad för undersökningar av rollen eller statusen hos terminalkomplementvägsaktivering i ett stort antal forskningsmiljöer och för observering av genereringen av C3a *in vivo* eller *in vitro*. C3a har visat sig öka kärlgenomsläpplighet, är spasmogent, kemotaktiskt och inducerar frigöring av farmakologiska aktiva mediatorer från ett antal olika celltyper. Den roll som C3a spelar i patogenesen av inflammatoriska reaktioner med gramnegativ bakteriesepsis, trauma, ischemisk hjärtsjukdom, cerebral ischemi, postdialyssyndrom och flertalet autoimmuna sjukdomar, inklusive reumatoid artrit, lupus erythematosus och akut glomerulonefrit är väldokumenterad.^{4, 6-23}

PRINCIP FÖR TILLVÄGAGÅNGSSÄTTET

MicroVue-C3a Plus-enzymimmunanalys är en trestegsprocedur, där man använder sig av (1) en mikroanalysplatta som är ytbelagd med monoklonal mus-antikropp, specifik för en neo-epitop på humant C3a, (2) en med HRP-konjugat försedd polyklonal mus-antikropp till C3a-delen av C3 samt (3) ett kromogent substrat.

I steget tillsätts standarder, kontroller och utspädda testprover till brunnar som är ytbelagda med en monoklonal mus-antikropp mot C3a. Den monoklonala antikroppen binder till C3a i standarderna, kontrollerna eller proverna. Efter inkubationstid tar en tvättcykel bort allt obundet material.

I steg två tillsätts pepparrotsperoxidase(horse radish peroxidase)(HRP)konjugerad anti-C3(C3a) till varje analysbrunn. Det enzymkonjugerade anti-C3(C3a) binder till det fixerade C3a, som fästs in i steg ett. Efter en inkuberingsperiod avlägsnar en tvättcykel allt obundet konjugat.

I steg tre tillsätts 3,3',5,5' tetrametylbensidin (TMB), en användningsklar, kromogenisk substratlösning, till analysbrunnarna. Det bundna HRP:t reagerar med substratet, vilket ger en blå färg. Efter inkuberingsperiod stoppas reaktionen kemiskt, något som resulterar i en färgväxling från blått till gult, vilket bekräftar att reaktionen har ägt rum. Färgintensiteten mäts spektrofotometriskt vid A₄₅₀. Färgintensiteten hos reaktionsblandningen är proportionell till koncentrationen av befintligt C3a i de utspädda standarderna, kontrollerna och testproverna. Resultaten beräknas från den framtagna standardkurvan med 4-parametern analys.

INGÅENDE REAGENSER OCH MATERIAL

96 analyser för C3a-komplex

MicroVue C3a Plus EIA-kitet innehåller följande:

A C3a Plus-standarder	Art. 5140 – 5145	1 av vardera, 1,5 mL
B Användningsklar. Innehåller humanserum med proteinstabilisatorer med bestämd C3a-koncentration		
C (ng/mL)		
D		
E		
L Låg kontroll	Art. 5146	1,5 mL
Användningsklar. Innehåller humanserum med proteinstabilisatorer med bestämd C3a-koncentration (ng/mL)		
N Hög kontroll	Art. 5147	1,5 mL
Användningsklar. Innehåller humanserum med proteinstabilisatorer med bestämd C3a-koncentration (ng/mL)		
1 Ytbehandlade remsor	Art. 5148	12 av vardera
Åttabrunnsremsor, som är ytbehandlade med en monoklonal antikropp från mus, i en återförslutningsbar foliepåse		
2 Stopplösning	Art. A9947	12 mL
Innehåller 1N (4%) saltsyra		
3 20X tvättlösningskoncentrat	Art. A9957	2 av vardera, 50 mL
Innehåller fosfatbuffrad saltlösning (PBS), 1,0% Tween-20® och 0,035% Proclin® 300		
4 Provsspädningsvätska	Art. 5150	50 mL
Innehåller en buffrad protein bas med 0,05% Proclin 300		
5 TMB-substrat	Art. 5059	12 mL
Användningsklar. Innehåller 3,3',5,5'-tetrametylbensidin (TMB) och väteperoxid (H ₂ O ₂)		
6 Konjugat	Art. 5151	12 mL
Innehåller pepparrotsperoxidaskonjugerad, polyklonal antikropp från mus mot C3a		

Tween-20® är ett registrerat varumärke som ägs av ICI Americas Inc.

ProClin® är ett registrerat varumärke som ägs av Rohm and Haas Company.

ERFORDERLIGA MEN EJ MEDFÖLJANDE MATERIAL

- Timer (60-minuters)
- 96-håls mikrotiterplatta (VWR REF: 47743-828) eller provrör och rack för provspädning (valfritt)
- Rena, oanvända mikroanalysplattor för replikplatteteknik (valfritt)
- Mätbehållare för utspädd tvättbuffert
- Tvättflaska eller annat validerat tvättsystem för immunanalys
- Mikropipetter och sterila engångspipettspetsar
- Reagensbehållare för att tillsätta konjugat, substrat- och stopplösningar till platta (använd rena, oanvända behållare för varje reagens)
- Justerbar multikanalpipett (8 eller 12 kanaler) eller repetermikropipetter
- Plattavläsare som kan läsa av en A₄₅₀-optisk densitet på mellan 0,0 och 3,0
- Avjonat eller destillerat vatten

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- För *in vitro*-diagnostisk användning.
- Behandla proverna som potentiellt riskavfallsmaterial. Följ allmänna försiktighetsåtgärder vid hantering av innehållet i detta kit och eventuella patientprover.

- Använd de tillhandahållna reagenserna som en sammanhängande enhet före det utgångsdatum som finns angivet på förpackningsetiketten.
- Lagra analysreagenserna enligt föreskrift.
- Använd inte de ytbehandlade remsorna, om det har gått hål på påsen.
- ProClin 300 används som ett konserveringsmedel. Tillfällig kontakt med eller förtäring av buffertar eller reagenser som innehåller ProClin kan orsaka irritation på huden, i ögonen eller munnen. Använd god laboratoriepraxis för att reducera exponering. Sök medicinsk vård vid eventuella symptom.
- Stopplösningen anses vara frätande och kan orsaka irritation. Får ej förtäras. Undvik kontakt med ögon, hud och kläder. Vid ev kontakt, skölj omedelbart det drabbade området med vatten. Vid ev förtäring, tillkalla läkare.
- Varje donerad enhet som använts vid framställningen av standarder och kontrollserum i denna produkt har testats med en FDA-godkänd metod beträffande befintlighet av antikropp riktad mot humant immunbristvirus (HIV1 och HIV2) och mot hepatit C-virus, såväl som beträffande hepatit B-tytanten. Eftersom ingen testmetod kan erbjuda en fullständig försäkran om att infektiösa ämnen inte finns, bör dessa reagenser hanteras på biosäkerhetsnivå 2, såsom rekommenderas för eventuellt potentiellt infektiöst humanserum eller –blodprov i manualen "Biosäkerhet på mikrobiologiska och biomedicinska laboratorier" ("Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories"), av "Centers for Disease Control/National Institutes of Health" (USA).²⁴
- Användning av multikanalspipetter eller repeterpipetter rekommenderas för försäkran om tillsättning av reagens på utsatt tid.
- För exakt mätning av prover, tillsätt prover och standarder i exakt mängd. Pipettera noggrant och använd endast kalibrerad utrustning.
- Korrekt insamling och lagring av prover är väsentlig för noggranna resultat (se *HANTERING OCH FÖRBEREDANDE AV PROVER*).
- Undvik mikrobiell eller korskontaminering av prover eller reagenser.
- Testa varje prov i duplikat.
- Använd inte samma mikroanalysbrunn för mer än ett test.
- Användning av andra inkuberingsstider och -temperaturer än de som föreskrivits i Procedur-avsnittet kan ge felaktiga resultat.
- TMB-substratet måste skyddas mot ljus under lagring och inkubation. Undvik kontakt med ögon, hud och kläder. Om kontakt sker, skölj omedelbart det drabbade området med vatten.
- Låt inte mikroanalysbrunnarna torka ut när analysen väl har börjat.
- Vid avlägsnande av vätska från mikroanalysbrunnarna, skrapa inte i eller vidrör botten på brunnarna.
- Värmeinaktiverade, hyperlipemiska eller kontaminerade prover kan ge felaktiga resultat.
- För undvikande av aerosolbildning vid tvättning kan man använda en apparat för att suga ut tvättvätskan i en flaska som innehåller hushållsblekningsmedel.
- En tvättflaska eller automatisk påfyllningsanordning ska användas för att tvätta plattan (*ANALYSPROCEDUR*, steg 10). För bästa resultat, använd inte en multikanalspipett för tvättningen av mikroanalysplattan.
- Hantera avfall beträffande bägare och oanvänt innehåll i enlighet med statliga och lokala föreskrifter.
- Testning ska utföras i utrymmen med tillräcklig ventilation.
- Kassera behållare och oanvänt innehåll i enlighet med gällande nationella och lokala reglerings föreskrifter.
- Använd lämpliga skyddskläder, -handskar och -glasögon/ansiktsskydd vid hantering av kitets innehåll.
- Tvätta händerna grundligt efter hantering.
- För ytterligare information om farosymboler, säkerhet, hantering och bortskaffande av delarna som ingår i denna sats, hänvisas till säkerhetsdatabladet (SDS) på quidel.com.

LAGRING

Lagra öppnat kit vid 2 °C till 8 °C. Värm upp reagenser och material, som valts ut för användning, till 18 °C till 25 °C före användning. Lägg alla oanvända mikroanalysremsor i lagringspåsen, återförslut påsen och lagra vid 2 °C till 8 °C.

INDIKATIONER PÅ INSTABILITET ELLER FÖRSÄMRING PÅ REAGENSER

Grumlighet i eller missfärgning av den utspädda Tvättlösningen indikerar försämring på denna reagens. Om detta inträffar, ska lösningen kasseras.

Grumlighet i eller missfärgning av den utspädda Provspädningsvätska indikerar försämring på denna reagens. Om detta inträffar, ska lösningen kasseras. Färgen på provlösningen kan variera från rosa till brun, vilket är normalt och inte visar på försämring eller instabilitet.

HANTERING OCH FÖRBEREDANDE AV PROVER

Hantera och kasta alla prover med användande av allmänna försiktighetsåtgärder.

Allt provhanteringsarbete ska utföras vid 2 °C till 8 °C.

Insamling av prover

Korrekt insamling, behandling och lagring av prover är viktig, eftersom C3a kan bildas i felaktigt hanterade prover genom *artefaktuell* komplementaktivering. K2 EDTA-insamlingsrör rekommenderas för optimala plasmareultat (Fisher REF: 22-040-161).

Värden för normala serumprover är normalt högre än de som erhålls med EDTA-plasmaprover. C3a-nivåerna i EDTA-plasma kan därför mer exakt representera *in vivo*-koncentrationerna.²⁵

Serum-, EDTA-plasmaprover ska samlas in aseptiskt genom användning av standardtekniker.²⁶ Proverna ska antingen testas omedelbart eller lagras på is i högst två timmar, innan de analyseras.

Om provet inte kan testas inom två timmar enligt de riktlinjer som är specificerade ovan, ska provet frysas vid -70 °C eller lägre.

Provstabiliseringslösning (Artikelnr A9576) kan också användas för att bereda humana serum- och plasmaprover för lagring. Korrekt användning av denna produkt, som endast kan erhållas från Quidel, kräver att provet blandas 1:1 med lösningen före infrysning. Ytterligare teknisk information om lösningen kan erhållas på begäran.

Upptining av frysta prover

För att minimera provhanteringstiden ska du ta fram en mikrotiterplatta (eller rör) och tillsätta aktuell volym av lösningen (vilket beskrivs i avsnittet Provspädning nedan) innan du tinar provet för utvärdering.

Tina frysta prover snabbt i 37 °C tills de är precis upptinade. Lägg omedelbart över upptinade prover på is för att förhindra komplementaktivering före utspädningen. **Låt inte proven ligga på is längre än två timmar. Låt inte proverna ligga kvar i en temperatur på 37 °C**, eftersom detta kan leda till komplementaktivering. Tina inte prover i rumstemperatur eller på is, eftersom detta kan leda till C3-aktivering och påverka resultaten. Proverna ska testas så snart som möjligt efter upptining. Endast endast ett omväxlande frysning och smältning kan göras utan att proverna påverkas. Om prover måste frysas om för ytterligare analys, föreslår Quidel att man fryser in multipla aliquoter av proverna för att undvika fler infrysnings-/upptiningscykler.

Spädning av prover

WARNING: Behandla alla prover som potentiellt smittsamma. Använd allmänna försiktighetsåtgärder.

Använd inte värmeinaktiverade, kontaminerade eller felaktigt lagrade prover.

OBS: Se *Upptining av frysta prover* beträffande viktiga anmärkningar om de rätta metoderna för att tina frysta prover. Rätt hantering av prov är viktig för riktiga resultat.

OBS! Det är viktigt att proven och lösningarna behandlas på korrekt sätt för att undvika komplementaktivering och resulterande C3a-generering i proven.

Proverna **måste** spädas så att de A_{450} -värden som observeras är över LLOQ och inte överstiger A_{450} -värdet för ULOQ. Proverna med A_{450} -avläsningar utanför detta intervall ska analyseras om vid en ny spädning.

Betstäm antalet (N) prover som ska testas. Märk två uppsättningar av provrör med nr 1 till och med provrör nr N, och registrera vilket prov som motsvarar vilket provrör.. En 96-håls mikrotiterplatta kan också användas för att göra spädningarna.

Bered en lämplig spädning (se avsnittet nedan) av varje prov med provspädningsmedlet. Blanda noggrant men undvik skum- och bubbelbildning. Lagra inte eller återanvänd utspädda prover.

Spädningsmetod

För optimalt resultat, gör två spädningar för varje prov.

Plasma

Späd plasmaprov 1:200 i provspädningsmedlet enligt följande:

- Pipettera för varje lösning 90 μL av provspädningsmedlet för spädning 1 och 475 μL för spädning 2 i separata spädningsrör eller plattor.
- Förbered spädning 1 genom att tillsätta 10 μL av det prov som ska testas till 90 μL av provspädningsmedlet (plasmaspädningsrör 1 eller platta). Blanda försiktigt.
- Förbered spädning 2 genom att tillsätta 25 μL av spädning 1 till 475 μL av provspädningsmedlet (plasmaspädningsrör 2 eller platta). Blanda försiktigt.

Serum

Späd serumproven 1:5000 i provspädningsmedlet enligt följande:

- Pipettera för varje testprov 490 μL av provspädningsmedlet för spädning 1 och 495 μL för spädning 2 i separata spädningsrör eller plattor.
- Förbered spädning 1 genom att tillsätta 10 μL av det prov som ska testas till 490 μL av provspädningsmedlet (serumspädningsrör 1 eller platta). Blanda försiktigt.
- Förbered spädning 2 genom att tillsätta 5 μL av spädning 1 till 495 μL av provspädningsmedlet (serumspädningsrör 2 eller platta). Blanda försiktigt.

Tillsättning av utspädda prover till mikrotiterbrunnarna

Tillsättningen av utspädda prover till mikrotiterbrunnarna måste fullgöras inom 15 minuter från appliceringen av det första provet. Vilken som av två metoder kan användas för att tillsätta utspädda prover, standarder, kontroller och buffertar till brunnarna (se steg 6 i *ANALYSPROCEDUR*). Vid små analysomgångar, där endast några få prover testas, kan de utspädda proverna och andra reagenser tillsättas direkt till sina inmärkte brunnar med en mikropipett (100 μL /brunn). Vid små eller stora omgångar, men i synnerhet vid större omgångar, rekommenderar vi användande av en multikanalpipett för tillsättning av prover enligt följande.

För att fylla i standarder, kontroller och utspädda prover i mikroanalysbrunnarna så snabbt som möjligt kan man använda sig av en "replica plating"-procedur. Istället för att man tillsätter 100 μL av var och en av standarderna, kontrollerna eller de utspädda proverna var för sig till de antikroppsinklädda brunnarna, kan 120 μL till 130 μL av varje lösning tillsättas till individuella brunnar på en bakgrunds- platta (ingår ej) som motsvarar det slutliga, efterfrågade EIA- mönstret. Efter att alla lösningar som ska testas har tillsatts till mikroanalysbrunnarna på bakgrundsplattan, ska 100 μL från varje brunn för bakgrundsbestämning snabbt föras över till de antikroppsinklädda brunnarna med användande av en multikanalpipett. För

att undvika eventuell korskontaminering måste pipettspetsarna bytas för varje gång man ändrar sammansättning hos de prover som ska överföras.

“Replica plating”-proceduren kan även användas för att smidigt tillsätta konjugatet, substratet och stopplösningen.

FÖRBEREDNING AV REAGENS

Se till att alla reagenser och material håller 18 °C till 25 °C före användning.

Lägg, efter borttagande av de reagenser och material som behövs, tillbaka de oanvända ingredienserna i sin rätta lagringstemperatur (se *LAGRING*).

Standarder och kontroller

Standarder och Kontroller kräver ingen utspädning eller beredning före användning.

Tvättlösning

Blanda 20X-tvättlösningsskoncentratet genom att vända upp och ner på flaskan ett flertal gånger. Om 20X-tvättlösningsskoncentratet har lagrats vid 2 °C till 8 °C, kan kristaller ha bildats. För att lösa upp kristallerna, värm upp flaskan i ett 37 °C till 50 °C-vattenbad tills alla kristaller har lösts upp och blanda därefter noggrant. Bered tvättlösningen genom att späda hela innehållet från en av flaskorna med 20X-tvättlösningsskoncentrat med upp till en liter destillerat eller avjonat vatten. Blanda noggrant. Tvättlösningen håller sig i 30 dagar, om den lagras i en ren behållare vid 2 °C till 8 °C. Om missfärgning eller grumlighet uppstår, kassera reagensen.

Mikroanalysremsor

Bestäm antalet brunnar som behövs för analysen. Det rekommenderas att brunnarna för bakgrundsbestämning, kontrollerna och standarderna testas i duplikat. Ta bort de remsor som inte behövs och lägg dem i lagringspåsen, återförslut påsen och lägg tillbaka den för lagring vid 2 °C till 8 °C. Fäst de remsor som ska användas i analysen i analysplattans ram.

ANALYSPROCEDUR

Läs hela produktbladet innan analysen påbörjas.

Se FÖRBEREDANDE AV REAGENS OCH VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER.

1. Registrera mikroanalysbrunnarnas positioner i förhållande till brunnen/-arna för bakgrundsbestämning, alla testprover, standarder och kontroller, såväl som de angivna serienummerna från etiketterna på vialerna. Sätt en etikett på ett hörn av mikroanalysplattan för orienteringens skull.
2. Märk mikrotiterplatta/rör så att det stämmer med alla prov som ska testas.
3. Tillsätt provspädningsmedlet till mikrotiterplattan/rören. (Se *Spädning av Prover.*)
4. Tina proven som ska testas och späd dem omedelbart.
5. Välj ut en eller två brunnar för bakgrundsbestämning. Tillsätt 100 µL provspädning till brunnen/-arna som ska användas för bakgrundsbestämning i plattläsaren.
6. Tillsätt 100 µL av varje C3a-standard (A, B, C, D, E) till duplikatbrunnarna. **OBS: Standarderna är klara för användning och behöver ingen utspädning.**
7. Tillsätt 100 µL av både C3a låg kontroll och C3a hög kontroll till duplikatbrunnarna. **OBS: Kontrollerna är klara för användning och behöver ingen utspädning.**
8. Tillsätt 100 µL av varje utspätt prov till dess inmärkte mikroanalysbrunn. (Se *Spädning av Prover.*)
9. Inkubera vid 18 °C till 25 °C i 60 ± 10 minuter.
10. Tvätta mikroanalysbrunnarna på följande sätt:
 - a. Avlägsna vätskan från varje brunn efter inkubationen i steg 9 (eller i steg 12 nedan).
 - b. Tillsätt ca 300 µL tvättlösning till varje brunn med användande av en tvättflaska eller en automatisk påfyllningsanordning.

c. Avlägsna vätskan från varje brunn och knacka kraftigt över det absorberande pappret (iom manuell tvätt används).

d. Upprepa steg b-c ytterligare tre gånger.

e. Efter den fjärde tvättcykeln, vänd upp och ner på plattan och knacka den två gånger hårt mot ett absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande vätska.

11. Använd en multikanals- eller repeterpipett för att tillsätta 100 µL C3a-konjugat till varje tvättad testbrunn inklusive brunnen/-arna för bakgrundsbestämning.
12. Inkubera mikroanalysremsorna vid 18 °C till 25 °C i 60 ± 10 minuter.
13. Tvätta mikroanalysbrunnarna efter 60-minuters-inkuberingen (steg 12), enligt beskrivning under *ANALYSPROCEDUR*, steg 10.
14. Omedelbart efter tvättproceduren ska 100 µL substratlösning tillsättas till varje brunn inklusive brunnen/-arna för bakgrundsbestämning.
15. Inkubera mikroanalysremsorna vid 18 °C till 25 °C i 15 (± 1) minuter.
16. Tillsätt 100 µL stopplösning till varje brunn för att stoppa den enzymatiska reaktionen. Stopplösningen ska tillsättas till brunnarna i samma ordning och i samma takt som substratlösningen har gjorts. Knacka försiktigt på plattan för att sprida färgutvecklingen jämnt.

OBS: Optimala resultat kan uppnås genom användning av plattläsarens auto-mix-funktion (om tillgänglig) precis före avläsning av plattan .

17. Bestäm absorberingsavläsningen vid 450 nm (A_{450} - värde) för varje testbrunn inom 60 minuter efter tillsättandet av stopplösningen (steg 16) genom att göra den nödvändiga bakgrundskorrigeringen.
18. Bestäm koncentrationen av prover och kontroller med hjälp av standardkurvan.
19. Kasta de återstående utspädda proverna och kontrollerna samt de använda mikroanalysremsorna (se *VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER*).

KVALITETSKONTROLL

God laboratoriepraxis rekommenderar användande av kontroller för att säkerställa att analysen sker på ett riktigt sätt. Varje C3a Plus-kit innehåller låga och höga kontroller som kan användas för detta ändamål. Kontrollnivåerna tillhandahålls. Kontrollvärdena är avsedda att verifiera kurvans och provresultatens validitet. Varje laboratorium bör etablera sina egna parametrar för acceptabla analysgränser. Om kontrollvärdena INTE är inom ert laboratoriums acceptansgränser, bör analysresultaten anses diskutabla och provtagningarna bör upprepas. Dessutom kräver produktbladet att standardkurvan som tagits fram med kit-standarderna uppfyller stringenta valideringskrav. Om analysen inte uppfyller dessa krav, upprepa analysen eller kontakta Quidel Teknisk Service.

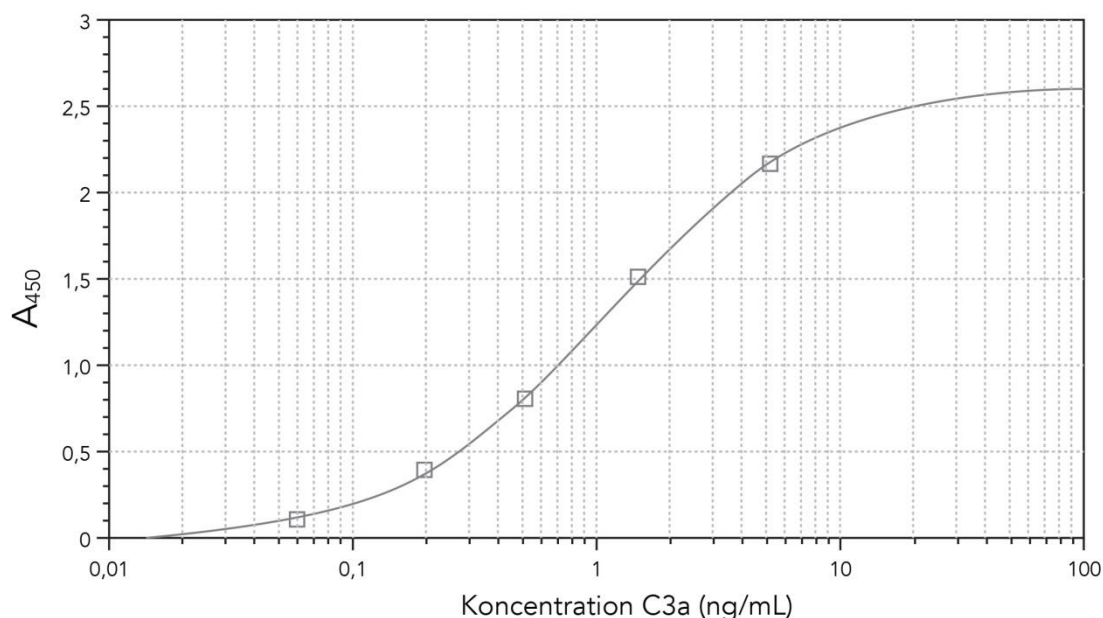
Analyscertifikatet som finns med i detta kit är serienummerspecifikt och ska användas för att verifiera att resultaten som erhållits av ert laboratorium är liknande dem som erhållits på Quidel Corporation.

TOLKNING AV RESULTAT

Beräkning av resultat

Användning av standardkurvan: Standardkurvan för C3a Plus EIA har tagits fram genom att man använt de fråndragna A_{450} -bakgrundsvärdena för varje standard (på y-axeln) och den anvisade koncentrationen för varje standard (på x-axeln). Standardkurvan måste uppfylla valideringskraven. Exempel på en typisk standardkurva visas i Figur 1.

Figur 1
Representativ standardkurva



Beräkning av faktisk C3a-koncentration i prover

Den angivna koncentrationen på analyscertifikatet är uttryckt i absoluta C3a-enheter. Koncentrationen av C3a i ett prov fastställs genom multiplicering av den bestämda koncentrationen med den lämpliga provutspädningsfaktorn. Till exempel, om ett EDTA-plasmaprov späds ut 1:200 för analysen och den 4-parameter logistisk kurva ger en koncentration på 0,5 ng C3a/mL, då är koncentrationen av C3a i provet 100 ng C3a/mL (eller 200 x 0,5).

För att erhålla rätt bestämningar av C3a-koncentration för testprover som ger A₄₅₀-värden som är större än ULOQ-värdet eller som ger värden som är mindre än LLOQ, ska proverna omanalyseras med en annorlunda utspädning, så att deras nya A₄₅₀-värden kommer att vara inom dessa gränser. I alla upprepade analyser måste C3a Plus-standarderna och kontrollerna också testas om.

Validering

Bestäm övre asymptot (D) och korrelationskoefficienten för den härledda 4-parameters logistiska kurvanpassningen för standarderna C3a A-, B-, C-, D-, och E. Värdena måste vara inom de specificerade intervallerna för att kvalificera analysen:

korrelationskoefficient (r^2): > 0,98
övre asymptot (D): $\geq 1,49$

Se analyscertifikatet angående godtagbart intervall för C3a-koncentrationer för låga och höga kontroller.

BEGRÄNSNINGAR

MicroVue C3a Plus-enzymimmunanalysen har använts för att testa prover insamlade som serum eller plasma i K2 EDTA. Andra antikoagulanter har inte testats.

OBSERVERADE VÄRDEN

EDTA-plasma och serum från tjugo (20) uppenbarligen normala, friska donatorer testades i MicroVue C3a Plus enzymimmunanalys-kitet. Resultaten presenteras nedan.

	n	Medel (ng/mL)	Intervall (ng/mL)
EDTA-plasma	20	129,6	33,8 till 268,1
Serum	20	240,4	71,0 till 589,2

OBS: De C3a-koncentrationer som är bestämda för plasma- eller serumprover kan variera mellan laboratorier; därför rekommenderas att varje laboratorium bestämmer sitt eget intervall. De koncentrationer som tillhandahålls ovan ska endast betraktas som en riktlinje.

UTFÖRANDE AV TESTET

Gränser

LOD: Detektionsgränsen (The limit of detection)(LOD) för C3a Plus-analysen är 0,012 ng/mL, bestämd av den övre 3SD-gränsen i en nollstandardstudie.

LLOQ: Den lägre gränsen för kvantifiering (The lower limit of quantitation – LLOQ) för C3a Plus-analysen är 0,023 ng/mL, och utgör den lägsta koncentrationen på standardkurvan som uppfyllde interna kriterier för noggrannhet och precision.

ULOQ: Den övre kvantifieringsgränsen (upper limit of quantification - ULOQ) för C3a-analysen är 2,531 ng/ml, och utgör den högsta punkt på standardkurvan som uppfyllde de interna kriterierna för noggrannhet och precision. Spädda prov med en koncentration över denna gräns ska testas om vid en högre spädning.

Interfererande substanser

Följande substanser testades i C3a Plus-analysen och befanns inte interferera med analysen:

Substans	Koncentration
Albumin	6000 mg/dL
γ Globulin	6000 mg/dL
Bilirubin	20 mg/dL
Hemoglobin	200 mg/dL
Triglycerider	3000 mg/dL
Na + heparin	3 U/mL
Glukos	1000 mg/dL
Kolesterol	500 mg/dL
EDTA	10 mM
C3-protein	5 µg/mL
C5-protein	5 µg/mL
C5a	5 µg/mL

Precision

Intra- och interkörningsprecision bestämdes genom analys av 20 replikat av 2 plasmaprover och 2 serumprover i 10 olika körningar.

Prov	C3a	Intrakörning ¹	Interkörning ²
	(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

¹n = 20 replikat ²n = 10 körningar

Linjäritet

Linjäritet utfördes genom seriespädning av prover med provutspädning och genom att jämföra observerade värden med förväntade värden.

Prov	Utspädningsfaktor	Observerat C3a (ng/mL)	Utbyte (%)
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

Återhämtning – Pik-Återhämtning

Pikåterhämtning utfördes genom att pika prov med en känd kvantitet av renat C3a och jämföra erhållna värden med förväntade värden.

Prov	C3a (ng/mL)	Tillsatt (ng/mL)	Observerad (ng/mL)	Återhämtning (%)
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

SUPPORT

För tjänster utanför USA, vänligen kontakta er lokala distributör. Ytterligare information om Quidel och Quidels produkter och distributörer kan erhållas på vår hemsida på quidel.com.

REFERENSER

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. Schifflerli. 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



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA032002SV00 (09/21)

ORDLISTA

REF

Katalognummer



CE-märkning om överensstämmelse

EC REP

Auktoriserad representant inom europeiska gemenskapen

LOT

Satskod



Använd före



Tillverkare



Temperaturbegränsning



Avsedd användning



Konsultera e-märkning bruksanvisning



Biologisk risk

IVD

För *in vitro*-diagnostik



Innehållet räcker till 96 bestämningar

CONT

Innehåll/innehåller

CONTROL

Kontroll
