

**Dosaggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa del frammento C4a della proteina C4 del complemento nel siero o plasma umani**

Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per esportazione. Non destinato alla vendita o all'uso negli Stati Uniti o in Canada.

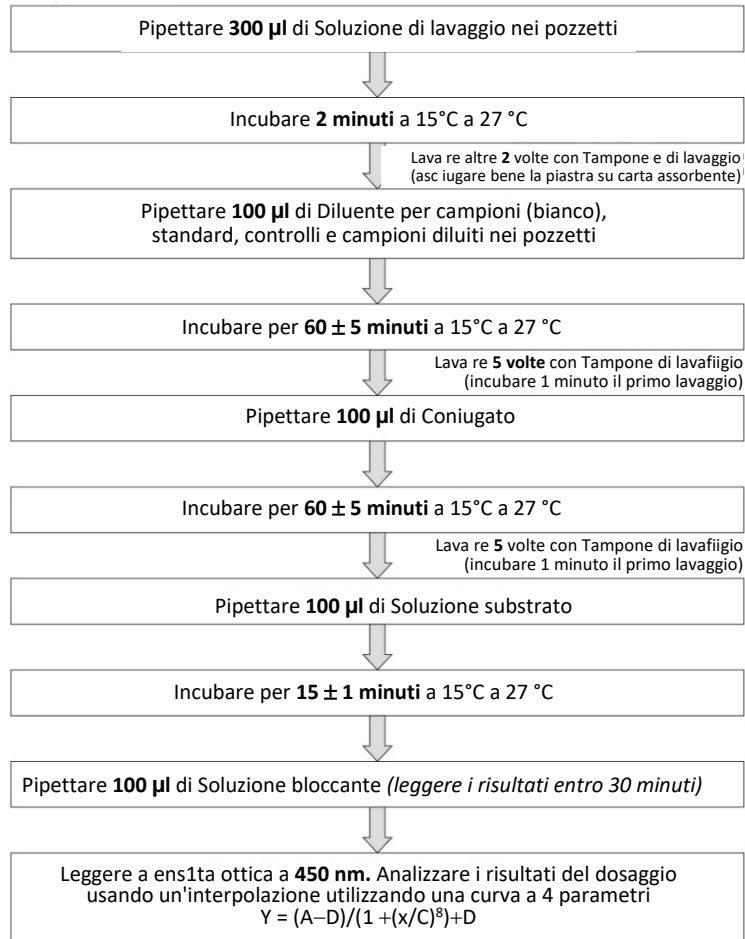
Alla pagina [quidel.com/glossary](http://quidel.com/glossary) è disponibile un glossario dei simboli.

## SOMMARIO

### Preparazione di reagenti, standard, controlli e campioni

- Diluire il Concentrato del tampone di lavaggio 1:20 con acqua deionizzata
- Diluire i campioni di plasma 1:40 con Diluente per campioni (per es. 10 µl di campione + 390 µl di diluente)
- Diluire i campioni di siero 1:80 con Diluente per campioni (per es. 10 µl di campione + 790 µl di diluente)

### Procedura di dosaggio





## SCOPO DEL TEST

Il kit di dosaggio immunoenzimatico MicroVue C4a misura la quantità del frammento C4a del complemento, un frammento di attivazione della proteina C4 del complemento, nel plasma e nel siero umani o di primati. La misurazione di C4a nel plasma o nel siero umano fornisce prova del coinvolgimento della via del complemento classica o della lectina.

## RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Il dosaggio immunoenzimatico MicroVue C4a è un immunodosaggio a cattura diretta su micropiastra a 96 pozzetti per la misurazione di C4a nel siero, nel plasma e in altri campioni biologici o sperimentali di origine umana o di primati. In condizioni normali, l'attivazione delle vie del complemento classica o della lectina porta a scissione della proteina C4 del complemento in C4a e C4b da parte della proteasi C1s. C4a viene rapidamente scisso nella sua forma più stabile, meno attiva, C4a-des Arg da parte della carbossipeptidasi N, un enzima sierico endogeno. Di conseguenza, la quantificazione di C4a-des Arg dovrebbe fornire una misurazione affidabile dell'attivazione della via del complemento classica o della lectina, verificatasi nei campioni del dosaggio.<sup>1-4</sup>

Il dosaggio MicroVue C4a, una procedura rapida, altamente specifica e quantitativa per la determinazione dei livelli di C4a, è stato ideato per indagini circa la funzione o lo stato di attivazione della via del complemento in numerosi contesti di ricerca, e per il monitoraggio della generazione di C4a *in vivo* o *in vitro*. Rispetto a C3a e C5a, C4a è la più debole delle anafilatossine; tuttavia, di fatto riveste un ruolo nel determinare alterazioni della permeabilità vascolare, nell'indurre contrazione della muscolatura liscia e nel rilasciare istamina dai mastociti e dai basofili. Si ritiene che C4a abbia un ruolo in svariate malattie autoimmuni tra cui l'artrite reumatoide, la SLE e la glomerulonefrite acuta.<sup>5-15</sup> Di recente è stato implicato come marcatore della malattia di Lyme sia nella forma acuta che cronica.<sup>16-17</sup>

## PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il dosaggio immunoenzimatico MicroVue C4a per la quantificazione di C4a nel plasma o siero umano è una procedura in tre fasi che utilizza (1) una micropiastra coattata con un anticorpo monoclonale murino che si lega specificamente a C4a umano, (2) un anticorpo monoclonale anti-C4a umano coniugato con perossidasi di rafano (HRP) e (3) un substrato cromogenico.

Nella fase 1, standard, controlli e campioni sono aggiunti ai pozzetti del microdosaggio pre-coattati con uno specifico anticorpo monoclonale anti-C4a. C4a, ma non C4 o altri prodotti di attivazione del complemento, presente nei campioni si legherà all'anticorpo monoclonale anti-C4a immobilizzato. Dopo l'incubazione, un ciclo di lavaggio rimuove il materiale non legato.

Nella fase 2, ad ogni pozzetto del test è aggiunto anticorpo monoclonale anti-C4a umano coniugato con perossidasi di rafano (HRP). L'anticorpo anti-C4a umano coniugato all'enzima si lega a C4a catturato nei pozzetti del microdosaggio. Dopo l'incubazione un ciclo di lavaggio rimuove il coniugato in eccesso, non legato.

Nella fase 3, ad ogni pozzetto del microdosaggio è aggiunto un substrato enzimatico cromogenico. Il coniugato legato a HRP reagisce con il substrato, formando un colore blu. Dopo l'incubazione la reazione enzimatica viene interrotta chimicamente, il colore si trasforma in giallo e l'intensità del colore viene misurata per via spettrofotometrica a 450 nm. L'intensità del colore della miscela di reazione è proporzionale alla concentrazione di C4a presente nei campioni, negli standard e nei controlli.

## REAGENTI E MATERIALI FORNITI

96 dosaggi per il frammento C4a della proteina C4 del complemento

Il kit di dosaggio immunoenzimatico MicroVue C4a contiene quanto segue:

- |   |                           |                          |
|---|---------------------------|--------------------------|
| <b>A Standard di C4a</b>  | <b>Codici 5204 – 5208</b> | <b>1,5 ml ciascuno</b>   |
| <b>B Pronti all'uso. Ognuno contiene proteina C4a umana nativa purificata con una concentrazione proteica assegnata (ng/ml), stabilizzanti proteici</b> |                           |                          |
| <b>C</b>  |                           |                          |
| <b>D</b>  |                           |                          |
| <b>E</b>  |                           |                          |
| <b>L Controllo basso di C4a</b>   | <b>Codice 5209</b>        | <b>1,5 ml</b>            |
| Pronto all'uso. Contiene proteina C4a umana nativa purificata con una concentrazione assegnata (ng/ml), stabilizzanti proteici                          |                           |                          |
| <b>H Controllo alto di C4a</b>  | <b>Codice 5210</b>        | <b>1,5 ml</b>            |
| Pronto all'uso. Contiene proteina C4a umana nativa purificata con una concentrazione assegnata (ng/ml), stabilizzanti proteici                          |                           |                          |
| <b>1 Piastra per microdosaggio</b>  | <b>Codice 5198</b>        | <b>12x8 pozzetti</b>     |
| Strisce a otto pozzetti coattate con un anticorpo monoclonale murino specifico per C4a umano in una busta richiudibile                                  |                           |                          |
| <b>2 Soluzione bloccante</b>  | <b>Codice A9947</b>       | <b>12 ml</b>             |
| Contiene acido cloridrico 1 N (4%)  |                           |                          |
| <b>3 Soluzione di lavaggio concentrata 20X</b>  | <b>Codice A9957</b>       | <b>2 ciascuno, 50 ml</b> |
| Contiene soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), TWEEN-20® 1,0% e ProClin® 300 0,035%   |                           |                          |
| <b>4 Diluente per campioni del complemento</b>  | <b>Codice A3670</b>       | <b>50 ml</b>             |
| Contiene PBS, TWEEN-20 0,05%, stabilizzanti proteici 2,5%, ProClin 300 0,035%   |                           |                          |
| <b>5 Substrato TMB</b>  | <b>Codice 5059</b>        | <b>12 ml</b>             |
| Pronto all'uso. Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidene (TMB) e perossido di idrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )                                   |                           |                          |
| <b>6 Coniugato</b>  | <b>Codice 5211</b>        | <b>12 ml</b>             |
| Contiene anticorpo monoclonale anti-C4a umano coniugato con perossidasi di rafano, sospeso in tampone HRP stabilizzante e con conservanti               |                           |                          |

TWEEN® è un marchio registrato di Croda Americas LLC.

ProClin® è un marchio registrato di Dow Chemical Company (Dow) o di una società affiliata di Dow.

## MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Temporizzatore (intervallo di tempo di 60 minuti)
- Micropiastre pulite, non ancora usate, piastra di diluizione a 96 pozzetti e/o provette e rack
- Contenitore per la diluizione del tampone di lavaggio
- Bottiglia per il lavaggio o altro sistema convalidato per il lavaggio di un saggio immunologico
- Micropipette e punte monouso per pipetta, sterili
- Pipetta multicanale regolabile (8 o 12 canali) o micropipette a ripetizione
- Pipette pulite da 1 ml, 5 ml e 10 ml
- Reservoir per i reagenti per aggiungere alla piastra coniugato, substrato e soluzioni bloccanti (per ciascun reagente usare reservoir puliti e non ancora utilizzati)
- Lettore per piastre in grado di effettuare letture di A<sub>450</sub> tra 0,0 e 3,0
- Acqua deionizzata o distillata

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Trattare i campioni come materiale potenzialmente infetto. Nel maneggiare il contenuto del kit e i campioni dei pazienti attenersi alle precauzioni universali.

- Usare i reagenti forniti come un'unica unità, entro la data di scadenza riportata sull'etichetta della confezione.
- Conservare i reagenti come indicato.
- Non usare le Strisce coattate se la busta è forata.
- ProClin 300 viene usato come conservante. Un contatto accidentale o l'ingestione di tamponi o reagenti che lo contengono può causare irritazione alla pelle, agli occhi o alla bocca. Per ridurre l'esposizione, usare le buone pratiche di laboratorio (BPL). In presenza di sintomi, rivolgersi al medico.
- La Soluzione bloccante è considerata corrosiva e può causare irritazione. Non ingerire. Evitare il contatto con occhi, pelle e indumenti. Se si verifica contatto, lavare immediatamente con acqua l'area colpita. In caso di ingestione contattare il medico.
- Ogni unità dei donatori utilizzata per la preparazione degli standard e dei controlli di questo prodotto è stata testata con un metodo approvato dalla FDA per la presenza di anticorpi per il virus dell'immunodeficienza umana (HIV1 e HIV2) e per il virus dell'epatite C, così come per l'antigene di superficie dell'epatite B. Dal momento che nessun metodo è in grado di offrire certezza assoluta di assenza di agenti infettivi, questi reagenti vanno manipolati al livello di biosicurezza 2, come raccomandato - per ogni campione di siero o sangue umano potenzialmente infetto - nel manuale del Centers for Disease Control/National Institutes of Health "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories".<sup>18</sup>
- L'uso di pipette multicanale o di pipettatori a ripetizione è raccomandato al fine di garantire una tempestiva dispensazione dei reagenti.
- Per una misurazione accurata dei campioni, aggiungere standard e campioni in maniera precisa. Pipettare con accuratezza usando solo strumenti calibrati.
- La raccolta e la conservazione adeguata dei campioni è essenziale al fine di ottenere risultati accurati (vedere *PREPARAZIONE E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI*).
- Evitare la contaminazione microbica o la cross-contaminazione dei campioni o dei reagenti.
- Analizzare ciascun campione in duplicato.
- Non usare lo stesso pozzetto per più di un test.
- L'uso di altri tempi di incubazione e di altre temperature, rispetto a quelli indicati nel paragrafo Procedura, può fornire risultati non corretti.
- Durante la conservazione e l'incubazione il substrato TMB va protetto dalla luce e dal contatto con i metalli o la gomma. Evitare il contatto con occhi, pelle e indumenti. Se si verifica contatto, lavare immediatamente con acqua l'area colpita.
- Una volta iniziato il saggio, non lasciare asciugare i pozzetti.
- Durante la rimozione del liquido dai pozzetti non raschiare o toccare il fondo di questi ultimi.
- Campioni contaminati, iperlipemici o inattivati al calore possono fornire risultati errati.
- Per evitare la formazione di aerosol durante il lavaggio, usare un sistema che aspiri il liquido di lavaggio all'interno di una bottiglia contenente candeggina per uso domestico.
- Per lavare la piastra si dovrebbe usare un sistema automatico di riempimento o una bottiglia per lavaggio (*PROCEDURA DI DOSAGGIO*, fase 6). Per ottenere i risultati migliori, non usare una pipetta multicanale per lavare la piastra del microdosaggio.
- I test devono essere effettuati in un'area dotata di ventilazione adeguata.
- Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con la normativa nazionale e locale in vigore.
- Indossare indumenti protettivi, guanti, e protezione occhio/viso durante l'utilizzo del kit.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo la manipolazione.
- Per ulteriori informazioni su simboli di pericolo, sicurezza, manipolazione e smaltimento dei componenti di questo kit, consultare la scheda di sicurezza (SDS) reperibile su [quidel.com](http://quidel.com).

## CONSERVAZIONE

Conservare il kit chiuso a 2°C a 8°C.

## INDICAZIONI DI 'INSTABILITÀ O DETERIORAMENTO DEI REAGENTI

La presenza di torbidità o lo scolorimento della soluzione di lavaggio diluita indica un deterioramento di questo reagente. In presenza di una di queste condizioni, eliminare la soluzione.

## TRATTAMENTO CAMPIONI E PREPARAZIONE

**Trattare e smaltire i campioni secondo le Precauzioni universali.**

**Tutte le operazioni di manipolazione dei campioni devono essere effettuate a 2°C a 8°C**

### Raccolta dei campioni

#### *Siero/plasma*

A causa dell'attivazione del complemento che si verifica nel corso della coagulazione, la concentrazione di C4a nei campioni di siero umano normale sarà superiore rispetto a quella ottenuta con campioni di plasma-EDTA. I livelli di C4a nel plasma-EDTA possono perciò rappresentare le concentrazioni *in vivo* in maniera più accurata.

Nei campioni raccolti o conservati in maniera non corretta il frammento C4a è suscettibile a proteolisi, ed è possibile che si generi C4a in campioni manipolati in modo improprio mediante attivazione artificiale del complemento; per tale ragione, è essenziale una corretta raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni.<sup>19</sup> Per conseguire risultati ottimali nel caso del plasma, si raccomandano provette di raccolta con K2 o K3 EDTA.

I campioni di siero e di plasma EDTA vanno raccolti in maniera asettica usando tecniche convenzionali.<sup>20</sup> I campioni vanno testati subito o conservati in ghiaccio per non più di quattro ore prima del dosaggio.

Se il campione non può essere analizzato entro quattro ore conformemente alle linee guida esposte in dettaglio sopra, va congelato a -70°C o a una temperatura inferior.

### Scongelamento dei campioni congelati

Per ridurre al minimo il tempo di manipolazione dei campioni, prima di scongelare i campioni per la valutazione allestire una piastra (o delle provette) di diluizione e aggiungere il volume appropriato di diluente (come descritto nel paragrafo sottostante, Diluizione dei campioni).

Scongelare rapidamente a 37°C i campioni congelati (i campioni devono risultare appena scongelati). Trasferire immediatamente in ghiaccio i campioni scongelati per prevenire l'attivazione del complemento prima della diluizione. Non lasciare i campioni in ghiaccio per più di quattro ore. Non lasciare i campioni a 37°C, dato che può verificarsi l'attivazione del complemento. Non scongelare i campioni a temperatura ambiente o in ghiaccio in quanto queste procedure possono portare ad attivazione del complemento e influire sui risultati dall'analisi. Dopo lo scongelamento, i campioni vanno dosati non appena possibile. Si possono eseguire fino a cinque cicli di congelamento/scongelamento senza influire sui campioni. Se occorre congelare di nuovo i campioni per analizzarli successivamente, Quidel suggerisce di congelare varie aliquote del campione per evitare di superare il numero di cicli di congelamento/scongelamento consigliati.

### Diluizione dei campione

**ATTENZIONE: trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Avvalersi delle Precauzioni universali. Non utilizzare campioni inattivati al calore, contaminati o conservati in modo non corretto.**

**NOTA: vedere Scongelamento dei campioni congelati per individuare indicazioni di rilievo sui metodi adatti allo scongelamento dei campioni congelati. Un adeguato trattamento del campione è essenziale al fine di ottenere risultati accurati.**

I campioni **devono** essere diluiti, così che i valori osservati siano maggiori dell'LLOQ e non superino l'ULOQ. I campioni con letture esterne a questo intervallo vanno ridosati a una nuova diluizione.

Preparare una diluizione appropriata (vedere il paragrafo seguente) di ogni campione usando il Diluente per campioni. Miscelare gentilmente ciascuna diluizione per evitare la formazione di schiuma e bolle. Non conservare o riutilizzare i campioni diluiti.

### *Plasma*

La diluizione raccomandata per i campioni di plasma in Diluente per campioni è 1:40. Eseguire la diluizione come segue:

*10 µl di campione + 390 µl di Diluente per campioni*

### *Siero*

La diluizione raccomandata per i campioni di siero in Diluente per campioni è 1:80. Eseguire la diluizione come segue:

*10 µl di campione + 790 µl di Diluente per campioni*

I campioni con livelli elevati di attivazione del complemento possono richiedere diluizioni maggiori del campione rispetto a quanto indicato sopra.

## Aggiunta dei campioni diluiti ai pozzetti della microtitolazione

**Completare l'aggiunta dei campioni diluiti ai pozzetti della microtitolazione entro 15 minuti dall'applicazione del primo campione.**

Per dispensare i campioni diluiti, gli standard, i controlli e il tampone ai pozzetti, si può usare una tra due metodiche (vedere il passaggio 4 della *PROCEDURA DI DOSAGGIO*). Per il dosaggio di pochi campioni, i campioni diluiti e gli altri reagenti possono essere aggiunti direttamente nei pozzetti con una micropipetta (100 µl/pozzetto). Per i dosaggi di pochi o di molti campioni, ma specialmente nel secondo caso, Quidel raccomanda l'impiego della procedura di "replica plating", descritta in basso, per caricare quanto più rapidamente possibile gli standard, i controlli e i campioni diluiti nei pozzetti del microdosaggio.

Usare un pipettatore multicanale per dispensare 120 µl a 130 µl di ogni soluzione ai singoli pozzetti di una piastra per il bianco (non fornita), corrispondente allo schema EIA finale desiderato. Dopo aver aggiunto tutte le soluzioni da dosare ai pozzetti del microdosaggio nella piastra per il bianco, trasferire rapidamente 100 µl da ogni pozzetto del bianco ai pozzetti rivestiti con l'anticorpo, usando un micropipettatore multicanale. Per evitare la possibilità di cross-contaminazioni, i puntali vanno sostituiti ogni volta che vi sia una variazione nella composizione dei campioni da trasferire.

**Questa procedura di "replica plating" può essere usata per aggiungere comodamente anche il coniugato, il substrato e la soluzione saturante.**

## PREPARAZIONE DEI REAGENTI

**Portare tutti i reagenti e i materiali a 15°C a 27°C prima dell'uso.**

Dopo aver rimosso i reagenti e materiali necessari, riportare quanto non occorre alle loro temperature di conservazione (vedere *CONSERVAZIONE*).

## Strisce per il microdosaggi

Calcolare il numero di strisce necessarie per il dosaggio. Quidel consiglia di dosare i pozzetti del bianco, gli standard e i controlli in duplicato. Le strisce che non vengono usate vanno riposte nella busta, che va sigillata e riportata a 2°C a 8°C. Fissare le strisce da usare nel dosaggio nel telaio per piastre.

## Soluzione di lavaggio

Prima dell'uso agitare svariate volte per inversione il flacone della Soluzione di lavaggio concentrata 20X. Se questa è stata conservata a 2°C a 8°C si possono essere formati dei cristalli. Per scioglierli, scaldare il flacone in un bagno di acqua a 37°C a 50°C fino a loro completa dissoluzione, e proseguire miscelando a fondo. Preparare la Soluzione di lavaggio diluendo con acqua distillata o deionizzata tutto il contenuto di uno dei flaconi di Soluzione di lavaggio concentrata 20X e portando il volume a un litro. Miscelare a fondo. La Soluzione di lavaggio è stabile per 30 giorni, se conservata in un contenitore pulito a 2°C a 8°C. Se si verifica scolorimento o la presenza di torbidità, eliminare il reagente.

## Standard e controlli

Standard e controlli sono forniti pronti per l'uso e non richiedono diluizione o preparazione prima di utilizzarli.

## PROCEDURA D'ANALISI

**Leggere le istruzioni per l'uso prima di iniziare il dosaggio.**

*Vedere AVVERTIMENTI E PRECAUZIONI e PREPARAZIONE DEI REAGENTI.*

1. Annotare le posizioni del pozzetto, o dei pozzetti, del microdosaggio corrispondente/i al bianco, a tutti i campioni da dosare, agli standard e ai controlli, così come i numeri di lotto riportati sulle etichette dei flaconi. Contrassegnare un angolo della piastra del microdosaggio per l'orientamento.
2. Preparare le strisce per il microdosaggio come segue:
  - a. Reidratare i pozzetti del microdosaggio aggiungendo circa 300 µl di Soluzione di Lavaggio a ciascun pozzetto, usando una bottiglia per lavaggio o un dispositivo automatico di riempimento.
  - b. Incubare a 15°C a 27°C per 2 minuti.
  - c. Eliminare il liquido da ciascun pozzetto.
  - d. Aggiungere a ciascun pozzetto circa 300 µl di Soluzione di Lavaggio.
  - e. Eliminare il liquido da ciascun pozzetto.
  - f. Ripetere ancora una volta i passaggi da d-e per un totale di tre lavaggi.**
  - g. Capovolgere la piastra e picchiettare in maniera decisa, per due volte, su carta assorbente per rimuovere l'eventuale liquido di lavaggio residuo.
3. Selezionare uno o più pozzetti da usare come bianco. Aggiungere 100 µl di Diluente per campioni al pozzetto che sarà usato, o ai pozzetti che saranno usati, come bianco.
4. Aggiungere 100 µl di standard, controlli o campioni diluiti ai pozzetti in duplicato stabiliti. L'intera piastra deve essere caricata entro 15 minuti dal caricamento del primo campione su di essa.
5. Incubare a 15°C a 27°C per 60 ± 5 minuti.
6. Lavare i pozzetti del microdosaggio per un totale di 5 volte usando la seguente procedura:
  - a. Aspirare il contenuto di ciascun pozzetto.
  - b. Aggiungere circa 300 µl di Soluzione di Lavaggio a ciascun pozzetto usando una bottiglia per lavaggio o un dispositivo automatico di riempimento.
  - c. Incubare i pozzetti per 1 minuto a 15°C a 27°C.
  - d. Aspirare il contenuto di ciascun pozzetto.
  - e. Capovolgere la piastra e picchiettare in maniera decisa su carta assorbente per rimuovere l'eventuale liquido di lavaggio residuo.
  - f. Aggiungere a ciascun pozzetto circa 300 µl di Soluzione di Lavaggio.
  - g. Aspirare il contenuto di ciascun pozzetto.
  - h. Capovolgere la piastra e picchiettare in maniera decisa su carta assorbente per rimuovere l'eventuale liquido di lavaggio residuo tra un lavaggio e l'altro.
  - i. Ripetere altre quattro volte i passaggi da f-h, per un totale di cinque lavaggi.**
  - j. Dopo il quinto ciclo di lavaggio, capovolgere la piastra e picchiettare in maniera decisa su carta assorbente per rimuovere l'eventuale liquido di lavaggio residuo.
7. Usando una pipetta multicanale o a ripetizione, dispensare 100 µl di Coniugato C4a in ciascun pozzetto lavato, compreso il pozzetto, o i pozzetti, del bianco.
8. Incubare le strisce del microdosaggio a 15°C a 27°C per 60 ± 5 minuti.

9. Lavare i pozzetti del microdosaggio dopo l'incubazione di 60 minuti (passaggio 8), come descritto *nella PROCEDURA DI DOSAGGIO*, passaggio 6.
10. Subito dopo la procedura di lavaggio, dispensare 100 µl della Soluzione di Substrato in ciascun pozzetto, compreso il pozzetto, o i pozzetti, del bianco.
11. Incubare le strisce del microdosaggio a 15°C a 27°C per 15 ± 1 minuti.
12. Aggiungere ad ogni pozzetto 100 µl di Soluzione bloccante per interrompere la reazione enzimatica. La Soluzione bloccante va aggiunta ai pozzetti nello stesso ordine e alla stessa velocità a cui è stata aggiunta la Soluzione di substrato.
13. Picchiettare delicatamente la piastra sul banco per disperdere lo sviluppo del colore in modo completo e uniforme. **NOTA: si possono ottenere risultati ottimali usando (se disponibile) la funzione auto-mix del lettore per piastre, appena prima della lettura della piastra stessa.**
14. Determinare le letture di assorbanza a 450 nm per ogni test ben entro 30 minuti dall'aggiunta della Soluzione bloccante (passaggio 12), effettuando una correzione per il bianco in conformità con il sistema di spettrofotometria in uso.
15. Stabilire la concentrazione dei campioni e dei controlli dalla curva di riferimento.
16. Eliminare i campioni diluiti residui, il substrato rimanente e le strisce per microdosaggio utilizzate (vedere *AVVERTIMENTI E PRECAUZIONI*).

## CONTROLLO QUALITÀ

Il Certificato di Analisi incluso in questo kit è specifico per ogni lotto e va usato con l'obiettivo di verificare che i risultati ottenuti dal Vostro laboratorio siano simili a quelli conseguiti da Quidel Corporation. I valori di densità ottica forniti sono intesi unicamente come indicazioni guida. I risultati ottenuti dal Vostro laboratorio possono essere divergenti.

Sono forniti gli intervalli per il controllo di qualità. I valori del controllo servono per verificare la validità della curva e dei risultati dei campioni. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri parametri per limiti di dosaggio accettabili. Se i valori di controllo NON rientrano nei limiti di accettabilità del Vostro laboratorio, i risultati del dosaggio vanno ritenuti ambigui, e i campioni ripetuti.

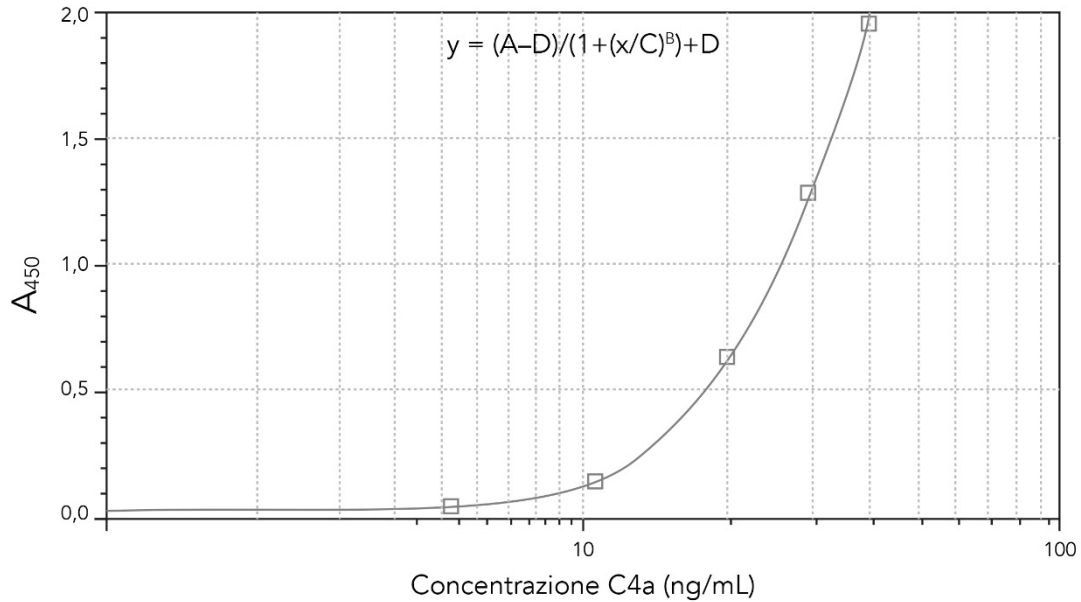
## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

**Uso della curva di riferimento:** La curva di riferimento (o standard) per il dosaggio EIA di C4a viene generata usando i valori di  $A_{450}$  (sottratti del valore del bianco) per ogni standard (sull'asse delle y) e la concentrazione assegnata per ciascuno standard di C4a (sull'asse delle x). Dopo la regressione a 4 parametri, la curva di riferimento così generata deve soddisfare i requisiti di convalida (vedere più avanti). Questi calcoli possono essere eseguiti dalla maggior parte dei computer e dei software per la lettura delle piastre.

In alternativa, i dati possono essere posti in grafico manualmente e i valori (in ng/ml) dei campioni del dosaggio letti direttamente dalla linea di regressione lineare della curva di riferimento. In figura 1 è fornito un esempio di una tipica curva di riferimento.



**Figura 1**  
**Curva standard rappresentativa**



Campione	A <sub>450</sub>	ng/ml
Standard A	0,05	5,19
Standard B	0,179	10,51
Standard C	0,657	20,29
Standard D	1,301	29,57
Standard E	1,956	40,34

### Calcolo delle concentrazioni effettive di C4a nei campioni del dosaggio

L'effettiva concentrazione di C4a presente in ciascun campione del dosaggio viene determinata moltiplicando la concentrazione di C4a in ng/ml, determinata dalla curva di riferimento del kit, per il reciproco del fattore di diluizione usato per il campione.

Se i valori di A<sub>450</sub> per un dato campione del dosaggio sono superiori rispetto a quelli dello standard più elevato (E), i risultati vanno riportati come "superiori a" la concentrazione di C4a dello standard più elevato (E) moltiplicato per il fattore di diluizione del campione. In caso sia richiesto un valore di concentrazione di C4a più accurato, il campione del dosaggio va ritestato usando un fattore di diluizione maggiore. In tutti i dosaggi ripetuti è necessario dosare anche gli standard di C4a e i controlli.

### VALIDAZIONE

---

coefficiente di correlazione (r): ≥ 0,98  
bianco: ≤ 0,150

---

Fare riferimento al Certificato di analisi del prodotto per gli intervalli medi accettabili di concentrazione di C4a per i controlli basso e alto.

### LIMITI

Il dosaggio immunoenzimatico MicroVue C4a è stato usato per analizzare campioni raccolti come siero, o come plasma in K2 o K3 EDTA. Nel dosaggio MicroVue C4a si consiglia di non utilizzare plasma citrato o plasma eparina, in quanto questi producono risultati erranei. Non sono stati testati altri anticoagulanti.

## VALORI ATTESI DEI CAMPIONI

Nel kit di dosaggio immunoenzimatico MicroVue C4a sono stati analizzati plasma EDTA e siero di, rispettivamente, 32 e 44 donatori normali. I risultati sono presentati di seguito.

Campione	n	Media (ng/mL)	Intervallo (ng/mL)
Plasma EDTA	32	1694,65	383,50 a 8168,17
Siero	44	1098	20,92 a 4437,24

NOTA: il comportamento della media e della deviazione standard (DS) delle concentrazioni del frammento C4a determinate per i campioni di plasma o di siero può variare tra laboratori; pertanto, si raccomanda che ciascun laboratorio stabilisca i valori medi di concentrazione del frammento C4a e deviazione standard per i campioni.

## PRESTAZIONI DEL DOSAGGIO

### Limiti

**LOD:** il limite di rilevazione (LOD) per il dosaggio EIA di C4a è 0.29 ng/ml, determinato dal limite superiore 3SD in uno studio sullo zero standard.

**LLOQ:** Il limite di quantificazione inferiore (LLOQ) per l'EIA di C4a è 5,0 ng/ml, la più bassa concentrazione sulla curva standard che ha rispettato i criteri CLSI di accuratezza e precisione.

**ULOQ:** Il limite di quantificazione superiore (ULOQ) per l'EIA di C4a è 61 ng/ml, la più alta concentrazione che ha rispettato i criteri CLSI di accuratezza e precisione.

### Sostanze interferenti

Le sostanze elencate di seguito sono state dosate nell'EIA di C4a, ed è stato riscontrato che non interferiscono con il dosaggio usando campioni di plasma o di siero:

Sostanza	Concentrazione
Bilirubina	40 mg/dL
Emoglobina	200 mg/dL
Trigliceridi	3000 mg/dL
Glucosio	1000 mg/dL
Colesterolo	500 mg/dL
Albumina	6000 mg/dL
Gammaglobulina	6000 mg/dL
EDTA	10 mM
Eparina	3 U/mL

### Precisione

La precisione intra-dosaggio e inter-dosaggio è stata determinata dosando 20 replicati di 1 campione di plasma e di 1 campione di siero in 10 esperimenti differenti.

Campione	C4a (ng/mL)	Intra-dosaggio <sup>1</sup> C.V. (%)	Inter-dosaggio <sup>2</sup> C.V. (%)
Plasma EDTA	833,9	3,7%	4,4%
Siero	1941,5	4,3%	4,0%

<sup>1</sup>n = 20 replicati    <sup>2</sup>n = 10 esperimenti

## Linearità

La linearità è stata valutata diluendo i campioni con diluente per campioni e confrontando i valori osservati con quelli attesi. Di seguito sono presentati risultati tipici.

Campione	Fattore di diluizione	C4a osservato (ng/mL) <sup>3</sup>	C4a atteso (ng/mL) <sup>3</sup>	Recupero (%)
Plasma EDTA	60	35,27	35,27	100%
	80	27,247	26,45	103%
	100	21,678	21,16	102%
	120	18,156	17,64	103%
Siero	80	23,657	23,657	100%
	95	20,331	19,92	102%
	110	17,743	17,21	103%
	125	15,885	15,14	105%

<sup>3</sup>Fattore di diluizione non incluso

## Recupero dei picchi

Il recupero dei picchi è stato condotto sottoponendo a "spiking" i campioni con una quantità nota di C4a purificato e confrontando i valori osservati con quelli attesi.

Campione	C4a (ng/mL)	Picco ("spike") (ng/mL)	Risultato (ng/mL)	Recupero (%)
Plasma 1	899,598		1211,02	92%
Plasma 2	996,199	416,91	1288,55	91%
Plasma 3	902,898		1257,25	95%
Siero 1	1000,298		1526,67	84%
Siero 2	1522,56	807,258	2090,01	90%
Siero 3	675,658		1570,40	106%

## ASSISTENZA

Per l'assistenza tecnica fuori dagli Stati Uniti, invitiamo a contattare il distributore locale di zona. Ulteriori informazioni su Quidel e sui suoi prodotti e distributori sono disponibili sul sito [quidel.com](http://quidel.com).

## BIBLIOGRAFIA

1. Moon K.E., Gorski J.P., Hugli T.E. 1981. "Complete primary structure of human C4a anaphylatoxin." *J BIOL CHEM* 256(16):8685-8692.
2. Gorski J.P., Hugli T.E., Muller-Eberhard H.J. 1979. "C4a: The third anaphylatoxin of the human complement system." *PROC NATL ACAD SCI (USA)* 76(10):5299-5302.
3. Gorski J.P., Hugli T.E., Muller-Eberhard H.J. 1981. "Characterization of human C4a anaphylatoxin." *J BIOL CHEM.* 256(6):2707-2711.
4. Hugli, T.E. 1986. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *COMPLEMENT* 3:111-27.
5. Fukuoka Y, Xia H-Z, Sanchez-Nunoz L.B., Dellinger A.L., Escibano L., Schwartz L.B. 2008. "Gnenration of anaphylatoxins by human  $\beta$ -Tryptase from C3, C4, and C5." *J IMMUNOL.* 180:6307-6316.
6. Mateja M.M., Korosec P., Kern I., Flezar M., Suskovic S., Sorli J. 2004. "Complement factors C3a, C4a, and C5a in chronic obstructive pulmonary disease and asthma." *AM J RESPIR CELL MOL BIOL.* 31:216-219.
7. Lee S-H, Rhim T., Choi Y-S, Kim S-H, Cho S-Y, Paik Y-K, Park C-S. 2006. "Complement C3a and C4a increased in plasma of patients with aspirin-induced asthma." *AM J RESPIR CRIT CARE MED.* 173:370-378.

8. Hass P-J, van Strijp J., 2007. "Anaphylatoxins: Their role in bacterial infection and inflammation." *IMMUNOL RES.* 37(3):161-175.
9. Abou-Ragheb H.H.A., Williams A.J., Brown C.B., Milford-Ward A. 1992. "Plasma levels of the anaphylatoxins C3a and C4a in patients with IgA nephropathy/Henoch-Shonlein nephritis." *NEPHRON* 62:22-26.
10. Tsuruta T., Yamamoto T., Matsubara S., Nagasawa S., Tanase S., Tanaka J., Takagi K., Kambara T. 1993. "Novel function of C4a anaphylatoxin: Release from monocytes of protein which inhibits monocyte chemotaxis." *AM J PATHOL* 142(6):1848-1857.
11. Wild G., Watkins J., Milford-Ward A., Hughes P., Hume A., Rowell N.R. 1990. "C4a anaphylatoxin levels as an indicator of disease activity in systemic lupus erythematosus." *CLIN EXP IMMUNOL* 80:167-170.
12. Ingram G., Hakobyan S., Robertson N.P., Morgan B.P. 2010. "Elevated plasma C4a levels in multiple sclerosis correlate with disease activity." *J NEUROIMMUNOL.* 223:124-127.
13. Olu K., Atsumi T., Bohgaki M., Amengual O., Kataoka H., Horita T., Yasuda S., Koike T. 2009. "Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome." *ANN RHEUM DIS.* 68:1030-1035.
14. Nyakoe N.K., Taylor R.P., Makumi J.N., Waitumbi J.N. 2009. „Complement consumption in children with Plasmodium falciparum malaria.“ *MALARIA J.*, 8:7-15.
15. Marcheix B., Carrier M., Martel C., Cossette M., Pellerin M., Bouchard D., Perrault L.P. 2008. "Effect of pericardial blood processing on postoperative inflammation and the complement pathways." *ANN THORAC SURG.* 85:530-535.
16. Shoemaker R.C., Giclas P.C., Crowder C., House D., Glovsky M.M. 2008. "Complement split products C3a and C4a are early markers of acute lyme disease in tick bite patients in the United States." *INT ARCH ALLERGY IMMUNOL* 146:255-261.
17. Stricker R.B., Savely V.R., Motanya N.C., Giclas P.C. 2008. "Complement split products C3a and C4a in chronic lyme disease." *SCAND J IMMUNOL.* 69:64-69.
18. 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>.
19. 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.* 73:484-88.
20. Centers for Disease Control. 1987. "Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings." *MMWR.* 36 (suppl. No. 2S):001.

**REF** A036 – MicroVue C4a Fragment 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**

**PIA036003IT00 (07/20)**

## GLOSSARIO

---

**REF**

Numero di catalogo



Marcio CE di conformità

---

**EC REP**

Rappresentante autorizzato  
nella Comunità Europea

**LOT**

Codice lotto

---



Data di scadenza



Produttore

---



Limitazione di temperatura



Uso previsto

---



Leggere le istruzioni e di  
etichettatura per l'uso



Rischio biologico

---

**IVD**

Per uso diagnostico *In Vitro*



Contenuto Sufficiente per 96 determinazioni

---

**CONT**

Contenuto / Contiene

**CONTROL**

Controllo

---