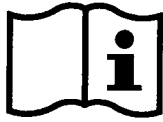


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

C5a ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative measurement of Anaphylatoxin C5a in human plasma or urine



REF DE3327

 **192 wells**

Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Contenu

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4
4	REAGENTS.....	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	6
6	ASSAY PROCEDURE	7
7	EXPECTED NORMAL VALUES	8
8	QUALITY CONTROL	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	9
10	LIMITATIONS OF USE	10
11	LEGAL ASPECTS	10
12	REFERENCES / LITERATURE	11
1	EINLEITUNG	12
2	TESTPRINZIP	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	12
4	BESTANDTEILE DES KITS	13
5	PROBENVORBEREITUNG	14
6	TESTDURCHFÜHRUNG	15
7	ERWARTETE WERTE.....	17
8	QUALITÄTS-KONTROLLE	17
9	ASSAY CHARACTERISTIKA.....	17
10	GRENZEN DES TESTS.....	18
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	18
12	REFERENZEN / LITERATUR.....	18
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	20

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **Demeditec C5a ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of Anaphylatoxin C5a in human plasma or urine.

1.2 Summary and Explanation

The complement system consists of more than 20 proteins which evolved as defense system against invading microorganisms. It can also be activated in a variety of disease states or upon contact with medical devices or drugs (1). Upon activation, a cascade of proteolytic enzymes releases the anaphylatoxins C3a, C4a and C5a from their respective precursors (2). These fragments exert various biological functions such as histamine release, smooth muscle contraction, increase in capillary permeability or immunomodulation (3). In addition, C5a and its degraded form C5a-desArg are highly potent chemotactic agents for polymorphonuclear leukocytes, which then will release tissue degradative enzymes and oxygen radicals (4). This in turn will also lead to activation of other humoral systems such as coagulation and fibrinolysis (5). Thus, C5a is probably the most important complement-derived proinflammatory mediator. C5a is believed to play a pivotal role in the pathogenesis of septic shock, the adult respiratory distress syndrome, acute pancreatitis and the deleterious effects after myocardial infarction (6,7,8). Recently it has been shown that C5a is closely associated with the capillary leak syndrome in leukemic children after bone marrow transplantation. C5a is also a marker in urine for predicting the onset of acute graft rejection after kidney transplantation (9). With respect to possible deleterious consequences, C5a determination may be indicated during hemodialysis, after cardiopulmonary bypass or after any other contact with medical devices (10).

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The Demeditec C5a ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle. Due to cross-reactivity of the monoclonal antibodies with complement factor C5, C5 in the sample is removed by precipitation prior to analysis. The resulting clear supernatant contains the C5a to be determined (10,11). During the first incubation the C5a in the sample binds to murine anti C5a monoclonal antibodies (mab 561), which are attached to the surface of the microtitration plate. Unbound constituents are then removed by washing and, in a second reaction, peroxidase conjugated monoclonal antibodies (Mab 557) are added and bound to a different epitope on C5a. The excess enzyme conjugated antibodies are removed by washing; the bound enzyme activity is then determined. The enzymatic reaction between hydrogen peroxide and chromogen is terminated by the addition of dilute sulphuric acid. The intensity of the colour intensity, which is proportional to the concentration of C5a, is determined photometrically.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C - 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells**, 24 x 8 (break apart) strips, 192 wells; Wells coated with murine monoclonal antibodies against human C5a.
2. **CAL** **1** - **4** **Standard (Standard 1-4)**, 4 vials (lyophilized), 1.0 mL; Concentrations: 0.1 - 0.4 - 3.0 - 10.0 µg/L. See "Reagent Preparation";
3. **CONTROL** **Control**, 1 vial (lyophilized), 1.0 mL, see "Reagent Preparation". For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.
4. **BUF** **Assay Buffer**, 1 vial, 25 mL, ready to use,
5. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate**, concentrate, 1 vial, 0.5 mL, Murine monoclonal antibodies to human C5a, conjugated to horseradish peroxidase; see "Reagent Preparation".
6. **ENZ** **CONJ** **DIL** **Conjugate Diluent**, 2 vials, 11 mL each, ready to use. Tris Buffer solution (50 mmol/L)
7. **PRECIP** **Precipitation Reagent**, 1 vial, 20 mL, ready to use
8. **SUB** **TMB** **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use, Tetramethylbenzidine (TMB).
9. **STOP** **SOLN** **Stop Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use, contains 0.5 M H₂SO₄, Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
10. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated), see "Reagent Preparation".

4.2 Materials required but not provided

- Tris Buffer Solution (Tris/HCl Buffer pH 8.0 Tris (100 mmol/L), NaCl (25 mmol/L). For sample dilution. (This solution can be ordered at Demeditec, product code: DE3327BUF)
- Centrifuge: suited for small reaction tubes (e.g. Eppendorf)
- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 - 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2 - 8 °C. For special storage conditions please refer to chapter 4.4 "Reagent Preparation". Microtiter wells must be stored at 2 - 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Opened kits retain activity for 4 weeks if stored as described above. The Precipitation Reagent has to be stored protected from light.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Standards and Control

Reconstitute the lyophilized contents of the standard vial with 1.0 mL deionized water.

Note: *The reconstituted standards and control can be used within 8 hours at 15 °C to 25 °C or within 1 day at 2 °C to 8 °C. For longer storage freeze at -20 °C for 4 weeks. Frozen (-20°C) reconstituted Standards or Control should only be used once within 4 weeks.*

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution. Dilute 30 mL of concentrated Wash Solution with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL. *The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.*

Enzyme Conjugate

Pipette 200 µL of Anti-human C5a Conjugate into a vial of Conjugate Diluent (11 mL) and shake gently to mix (sufficient for 1 test plate). Working Conjugate Solution can be stored at 2 °C to 8 °C for 4 weeks.

Dilution Reagent (for Sample dilution)

Prepare a Dilution Reagent by mixing an equal volume of Tris buffer with distilled water.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, Demeditec has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma or urine can be used in this assay. Haemolytic and lipaemic plasma and plasma containing rheumatoid factors do not interfere with the assay. Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Mono-vette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

Centrifuge within 2 hours for 10 min. at a minimum of 1500 x g and remove the supernatant plasma. C5a is preferentially determined in plasma or urine stabilized with EDTA (≥ 10 mmol/L final concentration). Citrated plasma may also be used but requires special care as e.g. immediate cooling at ice in order to avoid unspecific activation of the complement cascade (13).

Urine

In urine C5a is stable at room temperature (15 °C to 25 °C) for 24 hours (9). Thus, urine routinely collected over 24 hours can be used as well as spontaneous urine. In case of severe proteinuria additional cleavage of excreted C5 might occur. For collection of urine 1 part of an appropriate EDTA solution (> 0.11 nmol/L) is mixed with 9 parts of urine.

5.2 Specimen Storage

Stability of plasma sample:	15 °C - 25 °C	2 hours
	2 °C - 8 °C	8 hours
	- 20 °C	1 month

Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

Stability of urine sample:	15 °C - 25 °C	24 hours
-----------------------------------	---------------	----------

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard or If high values are expected dilute the plasma sample first 1:10 with *Dilution Reagent* and then apply the normal precipitation step to the diluted sample. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example dilution 1:10: 10 μ L sample + 90 μ L *Dilution Reagent* (mix thoroughly)

In the case that the amount of sample is limited the further dilution can be prepared from the supernatant. But for exact results, the sample dilution must be done before the precipitation step.

5.4 Preparation of Samples - Precipitation

In order to exclude cross-reactivity of the monoclonal antibodies with uncleaved complement factor C5, the C5 in standards, control plasma and samples has to be removed by precipitation. After centrifugation the clear supernatant contains the C5a to be analysed.

1. Pipette into appropriate centrifugation tubes one volume of either sample, standard or control plasma and add one volume of the Precipitation Reagent. For double determinations a volume of 100 μ L of sample and 100 μ L of Precipitation Reagent is recommended.
2. Mix intensively at once and incubate at least for 3 min. at 15 °C - 25 °C.
3. Centrifuge the mixture for 10 min. at approx. 2500 x g (or 3 min. at 8000 x g).
4. **Use the clear supernatant in the assay procedure.**

In the supernatant C5a is stable at 15 °C - 25 °C for 1 day and at 2 °C - 8 °C for 3 days if stored separately from the pellet.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

6.2.1 Assay Procedure for Plasma Samples

1. Secure the desired number of Microtiterwells in the holder.
2. Pipette into each well **50 µL** of Assay Buffer (C5a).
3. Dispense **50 µL** of the supernatant of either standard, control or sample **with new disposable tips** into appropriate wells. After filling the test plate shake briefly to ensure thorough mixing.
4. Incubate for **20 min.** (± 2 min.) at room temperature (20 °C – 25 °C).
5. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells 3 times with diluted Wash Solution (300 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual water droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Dispense **100 µL** Working Conjugate Solution into each well.
7. Incubate for **15 min.** (± 2 min.) at room temperature (20 °C – 25 °C).
8. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells 3 times with diluted Wash Solution (300 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual water droplets. (See step 5.)
9. Add **100 µL** of Substrate Solution to each well.
10. Incubate for **15 minutes** (± 2 min.) at room temperature.
11. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of Stop Solution to each well.
12. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.2.2 Assay Procedure for Urine Samples

For testing urine samples the following procedure is recommended to obtain an improved recovery of C5a.

1. Instead of using Standards S1 to S4 for establishing the reference curve **use only standard S4** and prepare a precipitate as described.
2. Then dilute the supernatant in series (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) with a 1:1 mixture of the Precipitation Reagent and the following buffer:
150 mmol/L Na-phosphate, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, pH 7.0.
3. For dilution of urine samples follow the same procedure, i.e. dilute the supernatant after precipitation with the phosphate buffered saline/Precipitation Reagent mixture.
4. With this prepared Standard curve and urine samples follow now the procedure as described in "6.3.1 Assay Procedure for Plasma Samples".

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using linear graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4 Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as such. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 1 (0.10 µg/L)	0.11
Standard 2 (0.40 µg/L)	0.16
Standard 3 (3.00 µg/L)	0.59
Standard 4 (10.0 µg/L)	1.77

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

Preliminary Reference Interval:

The Normal Values of the Demeditec ELISA were determined by measuring the Values of 240 apparently healthy adults with the Demeditec ELISA Kit.

The normal value range is assumed to be as 2.5th - 97.5th percentile.

	Median µg/L	Range µg/L
Adults	0.35	0.15 - 0.5 µg/L

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results. Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or Demeditec directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.02 - 10.0 µg/L.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

Data can be obtained on request.

9.3 Sensitivity

The minimum detectable concentration of C5a by this assay is estimated to be < 0.02 µg/L

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

In the range between 2 and 3 µg/L the coefficient of variation in the series (intra-assay CV) was found between 5 and 8%.

9.4.2 Inter Assay

In the range between 2 and 3 µg/L the coefficient of variation from day to day (inter-assay CV) was found between 6 and 10%.

9.5 Recovery

The recovery of C5a in plasma was between 86 and 114%.

9.6 Linearity

Data can be obtained on request.

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results. Interferences caused by improper sample handling are explained in the chapters 'Specimen - Collection'.

Note: Incorrect collection technique, e.g. inadequate mixing of the sample and anti-coagulant, can lead to falsely elevated C5a values!

10.1 Interfering Substances

Haemolytic and lipaemic plasma and plasma containing rheumatoid factors do not interfere with the assay.

10.2 High-Dose-Hook Effect

A high-dose hook effect was not observed.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact Demeditec.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement. Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Rother, K. and G.O. Till (Eds.): The Complement System. Springer – Heidelberg-New York (1988).
2. Hugli, T.E.: Structure and function of the anaphylatoxins. Springer Semin. Immunopathol. 7: 193-219 (1984).
3. Morgan, E.: Modulation of immune response by anaphylatoxins. Complement 3: 128-136 (1986).
4. Yancey, K.B.: Biological properties of human C5a; selected in vitro and in vivo studies. Clin. Exp. Immunol. 71: 207-210 (1988).
5. Preissner, K.T. and G. Müller-Berghaus: Molekulare Wechselwirkungen zwischen Komplement-, Gerinnungs- und Fibrinolysesystem. Haemostas 6:67-81 (1986).
6. Dalmaso, A.P.: Complement in the pathophysiology and diagnosis of human diseases. Crit. Rev. Clin. Lab. 24: 123-183 (1986).
7. Hammerschmidt, D.E.: Clinical utility of complement anaphylatoxin assays. Complement 3: 166-176 (1986).
8. Gardinali, M. et al.: Complement activation and polymorphonuclear neutrophil leukocyte elastase in sepsis. Arch. Surgery 127: 1219-1225 (1992).
9. Müller T, Kraus M, Neumann C and Lange H. Detection of renal allograft rejection by complement components C5a and TCC in plasma and urine. J. Lab. Clin. Med. 129: 62-71 (1997).
10. Mollnes, T.E. et al.: Complement activation and bioincompatibility. Clin. Exp. Immunol. 88: 21-26 (1991).
11. Klos, a. et al.: Detection of native human complement components C3 and C5 and their primary activation peptides C3a and C5a (anaphylatoxic peptides) by ELISAs with monoclonal antibodies. J. Immunol. Meth. 111: 241-252 (1988).
12. Biosafety in Microbiological and Biomed Laboratories, Centers for Disease Control/National Institutes of Health, 1984 (HHS Pub. No. (CDC) 84-8395).
13. Mollnes, G.E., P.Garred and G. Bergseth: Effect of time, temperature and anti-coagulants on in vitro complement activation: consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. Clin. exp. Immunol. 73: 484-488 (1988).

1 EINLEITUNG

Der **Demeditec C5a ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Anaphylatoxin C5a in Plasma oder Urin eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der Demeditec C5a ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert. Weitere Angaben entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB** **MT** *Microtiterwells*, 2 x 96 Wells, 24 x 8 Wells (einzeln brechbar); mit monoklonalen Antikörper gegen humanes C5a beschichtet.
2. **CAL** **1** – **4** *Standard (Standard 1-4)*, 4 Fläschchen (lyophilisiert), je 1,0 mL; Konzentrationen: 0.1 - 0.4 - 3.0 - 10.0 µg/L. Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
3. **CONTROL** *Control* (Kontrolle), 1 Fläschchen (lyophilisiert), 1,0 mL; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“. Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.
4. **BUF** *Assay Buffer* (Assaypuffer), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig;
5. **ENZ** **CONJ** *Enzyme Conjugate* (Enzymkonjugat) **konzentriert**, 1 Fläschchen, 0,5 mL; Anti-human C5a-Antikörper, mit Meerrettichperoxidase konjugiert, siehe „Vorbereitung der Reagenzien“. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **ENZ** **CONJ** **DIL** *Conjugate Diluent* (Konjugatverdünnungsmedium), 2 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig; Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
7. **PRECIP** *Precipitation Reagent* (Fällungsreagenz), 1 Fläschchen, 20 mL, gebrauchsfertig.
8. **SUB** **TMB** *Substrate Solution* (Substratlösung), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
9. **STOP** **SOLN** *Stop Solution* (Stopplösung), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig; enthält 0,5 M H₂SO₄. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
10. **WASH** **SOLN** **40x** *Wash Solution* (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Tris Puffer (Tris/HCl Puffer pH 8.0 Tris (100 mmol/L), NaCl (25 mmol/L). Zur Probenverdünnung hochkonzentrierter Proben. Dieser Puffer kann bei Demeditec bestellt werden, Produkt Nr.: DE3327BUF.
- Zentrifuge: passend für kleine Reagenzröhrchen (z.B. Eppendorf)
- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Besondere Lagerungsbedingungen finden Sie unter Kapitel 4.4 „Vorbereitung der Reagenzien“. Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 4 Wochen ihre Reaktivität. Das Fällungsreagenz muss lichtgeschützt gelagert werden.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Standards und Control

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Standard- und Kontrollfläschchen mit 1,0 mL destilliertem Wasser.

***Achtung:** Die rekonstituierten Standards und Kontrollen sollten bei einer Lagerung bei 15 °C bis 25 °C innerhalb von 8 Stunden verbraucht werden oder innerhalb von 1 Tag bei einer Lagerung bei 2 °C bis 8 °C. Eingefrorene (-20 °C) rekonstituierte Standards oder Kontrollen sollten nur einmal aufgetaut werden und nur 4 Wochen gelagert werden.*

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte *Wash Solution* (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.*

Enzyme Conjugate

Pipettieren Sie 200 µL *Enzyme Conjugate* in ein Fläschchen mit *Conjugate Diluent* (11 mL) und mischen Sie die Lösung gründlich. (Konjugat-Arbeitslösung) Ausreichend für eine Testplatte. Die Konjugat-Arbeitslösung kann bei 2 °C bis 8 °C bis zu 4 Wochen gelagert werden.

Verdünnungsreagenz (zur Probenverdünnung)

Das Verdünnungsreagenz erhalten Sie durch das Mischen gleicher Volumenteile von Tris-Puffer mit destilliertem Wasser.

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Material Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma Demeditec in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Plasma oder Urin können in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden. Hämolytisches oder lipämisches Plasma oder Plasma mit Rheumafaktoren interferiert nicht in diesem Test. Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

Die entnommene Blutprobe innerhalb von 2 Stunden ca. 10 Minuten bei mindestens 1500 x g zentrifugieren. Den Plasmaüberstand entnehmen. C5a wird vorwiegend in Plasma oder Urin bestimmt, stabilisiert mit EDTA (≥ 10 mmol/L Endkonzentration). Zitratplasma kann auch verwendet werden, erfordert aber besondere Maßnahmen, z.B. sofortige Kühlung auf Eis, um eine unspezifische Aktivierung der Komplement-Kaskade zu vermeiden (13).

Urin

Im Urin ist C5a bei Raumtemperatur (15 °C - 25 °C) für 24 Stunden stabil (9). Es kann Spontan-Urin sowie 24-Stunden-Sammelurin eingesetzt werden. (Weitere Informationen entnehmen Sie bitte der englischen Arbeitsanleitung.) 1 Teil einer entsprechenden EDTA Lösung (>0.11 nmol/L) wird mit 9 Teilen Urin gemischt.

5.2 Probenaufbewahrung

Haltbarkeit der **Plasmaproben**: 15 °C - 25 °C 2 Stunden
2 °C - 8 °C 8 Stunden
- 20 °C 1 Monat

Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn einige Male vorsichtig gemischt werden.

Haltbarkeit der **Urinproben**: 15 °C - 25 °C 24 Stunden

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Verdünnungsreagenz* 1:10 weiter verdünnt werden. Für den Fällungsschritt wird die verdünnte Probe eingesetzt. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Verdünnungsreagenz* gründlich mischen)

Falls zuwenig Probenmaterial vorhanden sein sollte, kann die weitere Verdünnung aus dem Überstand hergestellt werden. Für exakte Resultate muss allerdings die Probenverdünnung vor der Präzipitation durchgeführt werden.

5.4 Probenvorbereitung – Fällung

Um Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper mit ungespaltenem C5-Komplementärfaktor auszuschließen, muss C5 in Standards, Kontrolle and Proben durch eine Fällung entfernt werden. Nach dem Zentrifugieren wird der klare Überstand getestet.

1. In die entsprechenden Zentrifugenröhrchen ein Volumenteil von Proben, Standards oder Kontrolle pipettieren und dann ein Volumenteil des Precipitation Reagent. Für Doppelbestimmungen wird eine Volumenmenge von 100 µL Probe und 100 µL Precipitation Reagent empfohlen.
2. Sofort gründlich mischen und für mindestens 3 Minuten bei +15 ° bis +25 °C inkubieren.
3. Die Mischung für 10 Minuten bei ungefähr 2500 x g zentrifugieren (oder 3 Minuten bei 8000 x g).
4. **Benutzen Sie den klaren Überstand für die Testdurchführung.**

C5a im Überstand ist bei 15 °C bis 25 °C für 1 Tag haltbar und bei 2 °C bis 8 °C für 3 Tage, wenn es separat vom Pellet aufbewahrt wird.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

6.2.1 Testdurchführung in Plasma

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **50 µL Assay Buffer** in jedes Well pipettieren.
3. **Je 50 µL Überstand** von *Standard, Control* und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
4. **20 Minuten** (± 2 min.) bei Raumtemperatur inkubieren (20 °C - 25 °C).
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschruttes!
6. **100 µL verdünntes Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
7. **15 Minuten** (± 2 min.) bei Raumtemperatur inkubieren (20 °C - 25 °C).
8. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
9. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
10. **15 Minuten** (± 2 min.) bei Raumtemperatur inkubieren (20 °C - 25 °C).
11. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
12. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

6.2.2 Testdurchführung in Urin

Bitte entnehmen Sie die Informationen der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem Demeditec ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 1 (0,10 µg/L)	0,11
Standard 2 (0,40 µg/L)	0,16
Standard 3 (3,00 µg/L)	0,59
Standard 4 (10,0 µg/L)	1,77

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

Vorläufiges Referenzintervall: N = 240

	Mittelwert µg/L	Bereich µg/L (5% - 95% Perzentile)
Erwachsene	0,35	0,15 – 0,5 µg/L

8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma Demeditec in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,02 – 10,0 µg/L.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Sensitivität

0,02 µg/L

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

Achtung: Fehler bei der Probengewinnung, z.B. unzureichendes Mischen von Probe und Antikoagulant, kann zu falsch erhöhten C5a-Werten führen.

10.1 Interferenzen

Hämolytisches oder lipämisches Plasma oder Plasma mit Rheumafaktoren interferiert nicht in diesem Test.

10.2 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma Demeditec in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.












11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12 REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore