

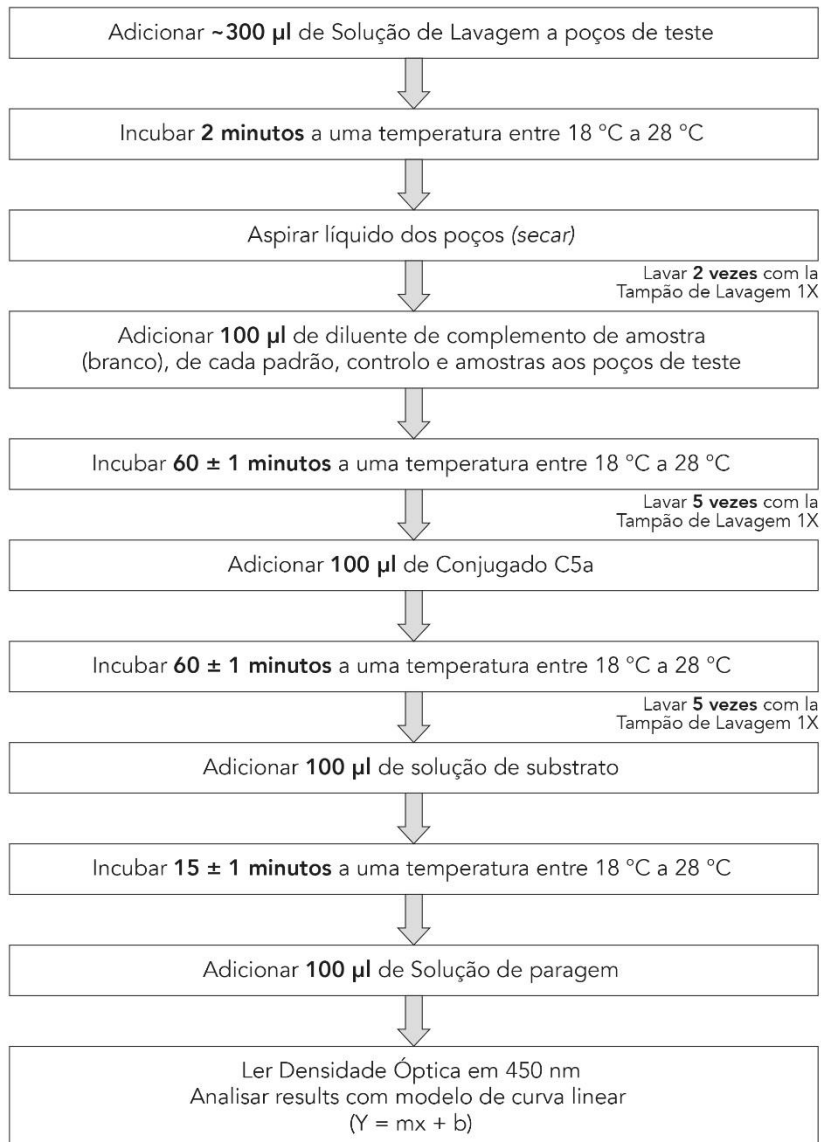
O imunoenensaio enzimático MicroVue C5a mede a quantidade de C5a em soro ou plasma humanos.

SUMÁRIO

Preparação do Reagent e da Amostra

- Diluir la Concentrado de Solução de Lavagem 1:20 com água desionizada.
- Diluir as Amostras de Soro 1:50 com el diluente de complemento de amostra (e.g. 10 μ L + 490 μ L).
- Diluir as amostras de plasma 1:20 com el diluente de complemento de amostra (e.g. 20 μ L + 380 μ L).

Procedimento de Ensaio





FINALIDADE DO ENSAIO

O imunoensaio enzimático MicroVue C5a mede a quantidade de C5a em soro ou plasma humanos.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O imunoensaio enzimático MicroVue C5a é um ensaio com 96 poços, de captura directa, para a medição de C5a em soro ou plasma humanos.

Em condições normais, a activação das vias alternativa, clássica, ou da lectina – resulta na formação da enzima convertase C5 multimolecular, capaz de clivar a C5 em C5a e C5b.^{1,2} A C5b é um constituinte-chave do Complexo Complemento Terminal e desempenha uma série de funções neste seu papel. A C5a é um fragmento de proteína de baixo peso molecular (aproximadamente 9kD) com 74 amino-ácidos.³ A C5a é metabolizada rapidamente pela enzima carboxipeptidase presente no soro, para uma estrutura de 73 aminoácidos, mais estável, menos activa, C5a des-Arg.^{2,3} Para fins de conveniência, nesta documentação referem-se ambas as formas por “C5a”.

O ensaio MicroVue C5a, que permite um procedimento quantitativo rápido e altamente específico, de medição dos níveis de C5a, destina-se a investigações sobre o papel ou estado da activação das vias terminais do complemento, em inúmeros cenários de investigação; e também para monitorizar a geração de C5a *in vivo* ou *in vitro*.⁴ Sendo a mais poderosa das anafilatoxinas, a C5a tem uma série de funções biológicas² inclusivé a de desgranulação de mastócitos, de quimiotaxia, sequestração de leucócitos, de activação celular via ligação ao Receptor² para C5a (C5aR ou CD88). A investigação tem associados a si elevados níveis de C5a de fase fluída e adsorvida, com hemo-incompatibilidade a alguns biomateriais, particularmente em circuitos extra-corporais.⁵⁻⁹ A investigação associou também níveis de C5a ao desenvolvimento de uma série de patologias tal como o enfarte do miocárdio¹⁰⁻¹⁴, ataques e acidentes^{15,16}, bem como a síndrome de derrames vasculares e lesões renais associadas¹⁷⁻¹⁹. Igualmente bem documentado se encontra o papel da C5a na patogénese da malária²⁰ e de outras doenças infecciosas, bem como a sepsis.²¹⁻²⁴

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O imunoensaio enzimático MicroVue C5a de enzimas consta de um procedimento de três fases, que utiliza (1) uma microplaca revestida com anticorpo monoclonal de rato, específico para um neo-epitopo C5a humano, (2) um anticorpo monoclonal de rato conjugado com HRP (peroxidase de rábano) para a região C5a de C5, e (3) um substrato cromogénico.

Na primeira fase, os padrões, os controlos e as amostras são pipetados nos poços revestidos com um anticorpo monoclonal de rato para a C5a. O anticorpo monoclonal vai ligar-se a C5a nos padrões, controlos e amostras. Após um período de incubação, realiza-se uma lavagem para remover o material não ligado.

Na segunda fase, adiciona-se conjugado de rato de peroxidase de rábano anti-C5(C5a), a cada poço. A enzima conjugada anti-C5 (C5a) liga-se à C5a imobilizada, ligada na primeira fase. Depois de um período de incubação, efectua-se uma lavagem para remover qualquer conjugado não-ligado.

Na terceira fase, junta-se tetrametilbenzidina (TMB) 3,3',5,5' – solução de substrato cromogénico pronta-a-usar – aos poços. A HRP ligada reage com o substrato, formando uma cor azul. Depois de um período de incubação, pára-se a reacção quimicamente, o que vai dar origem a uma mudança de cor: de azul para amarelo, confirmando que ocorreu reacção. A intensidade da cor é medida no espectrofotómetro a A_{450} . A intensidade da cor da mistura da reacção é proporcional à concentração de C5a presente nas Amostras diluídas do ensaio, dos Padrões e dos Controlos. Os resultados calculam-se com base na curva-padrão gerada, recorrendo a uma regressão linear.

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

96 Ensaios para Complexo de C5a

O kit MicroVue C5a EIA contém o seguinte:

A	Padrões C5a	Items 5131 – 5135	1 cada, 1,5 mL
B	Pronto a usar. Contém soro humano de concentração conhecida de C5a (ng/mL), estabilizadores de		
C	proteínas		
D			
E			
L	Controlo Inferior	Item 5136	1,5 mL
	Pronto a usar. Contém soro humano com a concentração determinada de C5a (ng/mL), estabilizadores de proteínas		
H	Controlo Superior	Item 5137	1,5 mL
	Pronto a usar. Contém soro humano com a concentração determinada de C5a (ng/mL), estabilizadores de proteínas		
1	Tiras Revestidas	Item 5129	12 cada
	Tiras de oito poços, revestidas com anticorpo monoclonal de rato, em saqueta de alumínio re-selável		
2	Solução de Paragem	Item A9947	12 mL
	Contém ácido hidrocloreídrico 1N (4%)		
3	20X de Concentrado de Solução de Lavagem	Item A9957	2 cada, 50 mL
	Contém solução tampão salina de fosfato (PBS), 1,0% Tween-20®, e 0,035% Proclin® 300		
4	Diluyente de Complemento de Amostra	Item A3670	50 mL
	Contém PBS, 2,5% Estabilizadores de proteína 0,05% Tween-20, 0,035% Proclin 300		
5	Substrato de TMB	Item 5059	12 mL
	Pronto a usar. Contém tetrametilbenzidina 3,3',5,5' (TMB)		
6	Conjugado	Item 5130	12 mL
	Contém anticorpo monoclonal de rato conjugado com peroxidase de rábano para C5a		

Tween-20® é uma marca comercial registada da ICI Americas Inc.

ProClin® é uma marca comercial registada da Rohm and Haas Company.

MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Temporizador (60-minutos)
- Calculadora ou outro método computacional para validação do ensaio
- Placas limpas, novas, para microensaio e/ou tubos de ensaio e suportes
- Contentor graduado para diluição de tampão de lavagem
- Depósito ou outro sistema de lavagem
- Pipeta multicanal (8 ou 12 canais) ajustável ou micropipetas de repetição (opcional)
- Pipetas novas/limpas, de 1 mL, 5 mL, e 10 mL
- Micropipetas e pontas esterilizadas, descartáveis
- Leitor de placas capaz de ler densidades ópticas a A₄₅₀ entre 0.0 e 3.0
- Água desionizada ou destilada

AVISOS E PRECAUÇÕES

- Só para uso diagnóstico *in vitro*. Não se destina a venda ou utilização nos Estados Unidos ou Canadá.
- Tratar as Amostras como material potencialmente perigoso para a saúde.
- Proceder de acordo com as Precauções Universais sempre que se manusear o conteúdo deste kit a as Amostras de qualquer doente.

- Usar os reagentes fornecidos como unidade integral, antes de expirar o prazo de validade indicado no rótulo da embalagem.
- Armazenar os reagentes do ensaio conforme indicado.
- Não usar as tiras revestidas caso a embalagem esteja furada.
- O ProClin 300 é usado como conservante. O contacto incidental ou a ingestão de reagentes que contenham ProClin podem causar irritação na pele, nos olhos ou na boca. Aplicar as boas práticas laboratoriais a fim de reduzir a exposição a perigos. Procurar ajuda médica se sentir qualquer sintomatologia.
- A Solução Stop é considerada corrosiva e pode causar irritação. Não ingerir. Evitar contacto com os olhos, pele e vestuário. Caso haja contacto, lavar imediatamente a área afectada com água abundante. No caso de ingestão, chamar o médico.
- Cada unidade de um dador usada na preparação dos padrões e dos soros de controlo deste produto, foi testada quanto à presença de anticorpos do vírus da imunodeficiência (HIV1 e HIV2), e do vírus da Hepatite C, bem como do antígeno de superfície da Hepatite B - segundo método aprovado pela FDA. Dado que nenhum método de ensaio pode assegurar completamente a ausência de agentes infecciosos, os reagentes deverão ser manuseados ao nível 2 da Biosegurança, tal como é recomendado relativamente a qualquer soro ou amostra humana de sangue potencialmente infecciosa, no Manual dos Centros de Controlo de Doenças/ Institutos Nacionais de Saúde (EUA): *"Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,"* 2007.
- O uso de pipetas multicanal ou de pipetadores de repetição é vivamente recomendado, a fim de assegurar a distribuição atempada dos reagentes.
- Para medir com rigor as amostras, há que adicionar as amostras e os padrões com muita precisão. Há que pipetar com cuidado extremo e que usar, apenas, equipamentos calibrados.
- É absolutamente essencial que se faça uma colheita adequada de amostras que devem ser armazenadas em excelentes condições. Só assim se obterão resultados rigorosos. (Ver *MANUSEAMENTO E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS*).
- Evitar a contaminação microbiana ou contaminação cruzada das amostras ou reagentes.
- Ensaiar as amostras em duplicado.
- Não usar um poço do microensaio mais que uma vez.
- O não cumprimento dos tempos de incubação e das temperaturas indicados, podem originar resultados erróneos.
- Deve proteger-se o Substrato de TMB da luz, quer em armazém, quer durante o período de incubação. Deve evitar-se o contacto com os olhos, pele e vestuário. Em caso de contacto, deverá lavar-se imediatamente a área afectada, com água.
- Uma vez iniciado o ensaio, não se deve deixar secar os poços.
- Quando se proceder à remoção dos líquidos dos poços, não arranhar nem tocar no fundo dos poços.
- As Amostras desactivadas por aquecimento, as hiperlipémicas e as Amostras contaminadas, podem conduzir a resultados erróneos.
- Para evitar a formação de aerossóis durante a lavagem, aspirar o fluido para dentro de uma garrafa que contenha lixívia para uso doméstico.
- Deve usar-se uma garrafa de lavagem ou uma máquina de enchimento automática, para lavar a placa. (Ver *PROCEDIMENTO DO ENSAIO*, fase 8). A fim de obter os melhores resultados, evitar usar pipeta multicanal na lavagem da placa.
- Os testes devem ser realizados numa área com ventilação adequada.
- Elimine os recipientes e conteúdo não utilizado de acordo com federais, estatais e requisitos regulamentares locais.
- Usar vestuário adequado, luvas e protecção de rosto e olhos sempre que manusear o conteúdo deste kit.
- Lave bem as mãos após o manuseamento.
- Para obter informações adicionais sobre os símbolos de perigo, segurança, o manuseamento e a eliminação dos componentes contidos neste kit, consulte a Ficha de Dados de Segurança (SDS) disponível em quidel.com.

ARMAZENAMENTO

Armazenar kits por abrir, a 2 °C a 8 °C. Antes de usar os reagentes e outros materiais necessários para um ensaio, colocá-los à temperatura de 18 °C a 28 °C. Colocar todas as tiras não-utilizadas, na embalagem de armazenamento, voltar a fechá-la bem e guardar a 2 °C a 8 °C.

INDICAÇÕES DE INSTABILIDADE OU DE DETERIORAÇÃO DE REAGENTES

A descoloração ou a turbidez da solução de lavagem, indicam a sua deterioração. Nesse caso, deve eliminar-se essa solução.

PREPARAÇÃO E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Manusear e eliminar todas as amostras segundo Precauções Universais.

Todas as operações de manipulação de amostras deverão ser efectuadas a temperaturas que oscilem entre 2 °C a 8 °C.

Colheita de Amostras

É absolutamente essencial fazer uma colheita correcta, bem como efectuar o ensaio adequadamente. Também o armazenamento das amostras, em boas condições, é essencial – porque a C5a pode ser gerada em amostras mal manipuladas, por activação indevida do complemento.

Os valores para as amostras normais de soro serão tipicamente mais elevados do que os obtidos com EDTA ou com as amostras de plasma normal citrado. Os níveis de C5a em plasma de EDTA ou em plasma citrado podem, portanto, representar com maior rigor as concentrações *in vivo*.²⁵

As amostras de soro, EDTA, ou de plasma citrado deverão ser colhidas assepticamente, empregando técnicas padrão.²⁶ As amostras deverão ser logo ensaiadas, caso contrário, deverão ser armazenadas a 4 °C ou em gelo, por não mais de 4 horas, antes de se proceder ao ensaio.

Se não se puder executar o ensaio das Amostras num prazo de quatro horas, de acordo com as linhas de orientação atrás descritas, deve congelar-se as Amostras a –70 °C, ou a uma temperatura inferior.

Pode usar-se também uma **Solução de Estabilização de Amostras** (Item No. A9576) na preparação das amostras de soro e plasma humanos, a fim de as armazenar. Este produto exige uma aplicação cuidada e correcta. Requer que se dilua a amostra 1:1 com a solução, antes da congelação. O produto é fornecido apenas pela Quidel. A pedido, poderá ser fornecida mais informação técnica sobre a solução.

Descongelação das Amostras

Descongelar as Amostras rapidamente, a 37 °C. De imediato, colocar as Amostras acabadas de descongelar, em gelo (por um período que não ultrapasse as oito horas) de modo a evitar a activação do complemento antes de as diluir. Não deixar as amostras a 37 °C pois poderá ocorrer a activação do complemento. Não deixar as amostras a descongelar à temperatura ambiente, ou em gelo, porque assim pode originar-se uma activação de C5a, que poderá afectar os resultados. Deve executar-se o ensaio o mais cedo possível, imediatamente após a descongelação. Poderão efectuar-se três ciclos de congelação/descongelação, sem que as amostras sejam afectadas. Se fôr necessário congelar novamente as amostras, para se proceder a nova análise, a Quidel sugere que se congelem alíquotas múltiplas da amostra, a fim de evitar ciclos múltiplos de congelação/ descongelação.

Diluição de Amostras

PRECAUÇÕES: tratar todas as amostras como sendo potencialmente nocivas para a saúde. Aplicar as Precauções Universais. Não usar amostras desactivadas por aquecimento, nem amostras contaminadas, nem as que foram armazenadas em condições deficientes.

NOTA: Ler "COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS" - onde estão registadas anotações importantes sobre métodos de descongelação de amostras. A manipulação apropriada das amostras é factor essencial para a obtenção de resultados rigorosos.

A Quidel sugere que se diluam as amostras de plasma normal a 1:20 usando o diluente fornecido; as amostras de soro devem ser diluídas a 1:50. Poderá ser necessária uma diluição a 1:200 ou superior, se a amostra tiver níveis de C5a elevados. **Há** que diluir as amostras de modo a que os valores A_{450} observados, estejam acima do LLOQ e não excedam o valor A_{450} do padrão E de C5a. As Amostras com leituras de A_{450} fora desta gama, deverão ser submetidas a novo ensaio com nova diluição.

Determinar o número (N) de amostras que se vão ensaiar. Etiquetar os tubos de ensaio de #1 até #N e registar quais as amostras que correpondem aos tubos respectivos. Preparar uma diluição adequada de cada amostra (ver o parágrafo anterior) com o diluente de amostras. Misturar bem, evitando a formação de espuma e de bolhas. Não armazenar nem reutilizar amostras diluídas.

Adicionar amostras diluídas aos poços do Microtitulador

A adição das amostras diluídas aos poços do microtitulador, deverá ficar concluída no prazo máximo de 15 minutos a partir da aplicação da primeira amostra. Para adicionar as amostras diluídas, os padrões, os controlos e o tampão, aos poços, pode usar-se um de dois métodos (ver Fase 6 do *PROCEDIMENTO DO ENSAIO*). Para ensaios de poucas amostras, podem adicionar-se as amostras diluídas e os outros reagentes, directamente aos poços respectivos, com uma micropipeta (100 μ L/poço). Para poucos ou muitos ensaios, mas sobretudo para os mais numerosos, recomendamos o uso de uma pipeta multicanal para adicionar as Amostras, como se segue.

De forma a simplificar a dispensa dos padrões, dos controlos e das amostras diluídas nos poços, pode recorrer-se à reprodução prévia da microplaca. Neste caso, ao invés de adicionar 100 μ L de cada um dos padrões, Amostras diluídas ou Controlos, directamente à placa revestida, dispensa-se 120-130 μ L de cada solução a uma placa não revestida (não fornecida) de acordo com o esquema EIA desejado. Depois de todas as soluções que se quer ensaiar terem sido adicionadas aos poços, na nova placa, transferir rapidamente 100 μ L de cada poço em branco, para os poços revestidos de anticorpos, com a ajuda de um micropipetador. Para evitar a possibilidade de contaminação cruzada, deverão trocar-se as pontas das pipetas sempre que houver uma mudança na composição das amostras que se vão transferir.

Este procedimento "replica plating" poderá ser usado para adicionar de maneira conveniente o Conjugado, o Substrato e também a Solução Stop.

PREPARAÇÃO DE REAGENTES

Antes de usar os reagentes, eles deverão ser trazidos a uma temperatura de 18 °C a 28 °C.

Depois de separados os reagentes e os materiais que se vão utilizar, há que guardar os materiais não usados, respeitando as temperaturas indicadas, para bom armazenamento. (ver *ARMAZENAMENTO*).

1. Amostras-padrão e os Controlos

As Amostras-padrão e os Controlos não necessitam de ser diluídos nem preparados antes de usar.

2. Solução de Lavagem

Homogeneizar o concentrado 20X de solução de lavagem invertendo o frasco várias vezes. Se este concentrado tiver sido armazenado a 2 °C a 8 °C, pode registar-se uma formação de cristais. Para dissolver os cristais, aquecer o frasco em banho-maria entre 37 °C a 50 °C até à dissolução completa de todos os cristais e, depois, misturar bem o conteúdo. Preparar a solução de lavagem diluindo todo o conteúdo de um dos frascos de concentrado de solução de lavagem 20X num litro de água destilada ou desionizada. Misturar tudo muito bem. A solução de lavagem mantém-se estável durante 30 dias,

quando conservada num recipiente limpo a uma temperatura entre 2 °C a 8 °C. Caso ocorra descoloração ou turvação, eliminar o reagente.

3. Seleção das tiras do Microensaio

Determine-se o número de poços que irão ser necessários para o ensaio. Recomenda-se que os poços em branco, os Controlos e as Amostras-padrão sejam ensaiados em duplicado. Guardar na embalagem as tiras que não são necessárias, tornar a fechar bem e conservar à temperatura de 2 °C a 8 °C. Verificar se as tiras, que irão ser usadas, se encontram devidamente encaixadas no suporte.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Antes de iniciar o ensaio, ler o folheto anexo que o acompanha.

Ver *PREPARAÇÃO DE REAGENTES e AVISOS E PRECAUÇÕES*.

1. Realizar o esquema da placa, indicando quais os poços atribuídos ao(s) branco(s), padrões, controlos e amostras, registando os números de lote indicados nos rótulos dos frascos. Deve etiquetar um canto da placa do microensaio, que sirva de orientação.
2. Preparar as tiras do microensaio como segue:
 - a. Proceder à re-hidratação dos poços do microensaio, adicionando, aproximadamente, 300 µL de Solução de Lavagem, dispensando-a manualmente ou de forma automática.
 - b. Incubar dois minutos a 18 °C a 28 °C.
 - c. Retire o líquido de cada poço.
 - d. Adicionar aproximadamente 300 µL de solução de Lavagem a cada poço.
 - e. Retire o líquido de cada poço.
 - f. Repita novamente os passos para um total de três lavagens**
 - g. Inverta a placa, batendo com vigor de encontro a papel absorvente, duas vezes, para retirar o líquido restante.
3. Selecionar um ou dois poços como branco. Juntar 100 µL de diluente de Amostras, aos poços que irão ser usados.
4. Adicionar 100 µL de amostra-padrão de C5a (A, B, C, D, E) em duplicado. **NOTA: As amostras-padrão estão prontas a usar e não precisam de diluição.**
5. Adicionar 100 µL tanto de controlo inferior/baixo e de controlo superior de C5a aos poços duplicados. **NOTA: Os Controlos estão prontos a usar, não precisando de diluição.**
6. Adicionar 100 µL de cada uma das Amostras diluídas ao poço do microensaio a que pertencem. (Ver *DILUIÇÃO DE AMOSTRAS*).
7. Incubar a 18 °C a 28 °C durante 60 ± 1 minutos.
8. Lavar os poços do micro ensaio como segue:
 - a. Depois da incubação, no passo 7 (ou no passo 10 abaixo), remover o líquido de cada poço.
 - b. Adicionar aproximadamente 300 µL de solução de lavagem a cada poço, manualmente ou de forma automática.
 - c. Remover o líquido dos poços.
 - d. Repetir mais quatro vezes os passos b-c.**
 - e. Após o quinto ciclo de lavagem, inverter a placa e bater firmemente contra papel absorvente, duas vezes, para remover todo o líquido restante.
9. Com uma pipeta multicanal, distribuir 100 µL de conjugado de C5a em cada poço lavado, do ensaio, incluindo o(s) branco(s).
10. Incubar as tiras do microensaio a 18 °C a 28 °C durante 60 ± 1 minutos.
11. Lavar os poços do microensaio após uma incubação de 60-minutos (passo 10), conforme descrito no número 8 do *PROCEDIMENTO DO ENSAIO*.
12. Imediatamente a seguir ao procedimento da lavagem, deitar 100 µL de solução de substrato em cada poço, incluindo o(s) branco(s).
13. Incubar as tiras do microensaio a 18 °C a 28 °C durante 15 (± 1) minutos.
14. Adicionar 100 µL de solução stop a cada poço, a fim de parar a reacção enzimática. Esta adição deverá ser feita pela mesma ordem e no mesmo ritmo com que se adicionou a solução de substrato. Dar

pancadas suaves na placa para que a cor se manifeste da maneira homogénea. **NOTA: Podem obter-se melhores resultados aplicando a função auto-mix do leitor de placas (se disponível), imediatamente antes da leitura da placa.**

15. Determinar leitura da absorvância a 450 nm (valor A_{450}), de cada poço do ensaio, num prazo de 60 minutos após a adição da solução stop (passo 14), procedendo à correcção necessária dos brancos.
16. Determinar a concentração das Amostras e dos Controlos da curva-padrão.
17. Eliminar as Amostras diluídas e os Controlos restantes e as tiras utilizadas no microensaio. (*AVISOS E PRECAUÇÕES*).

CONTROLO DE QUALIDADE

As boas práticas de laboratório recomendam o uso de controlos, para assegurar um desempenho correcto do ensaio. Cada kit de C5a contém controlos altos e baixos. São fornecidas gamas de controlos. Os valores dos controlos têm como objectivo comprovar a validade da curva e dos resultados das amostras. Cada laboratório a estabelecerá os seus próprios parâmetros para os limites dos ensaios. Se os valores dos Controlos NÃO se enquadrarem nos limites aceites pelo vosso laboratório, os resultados devem considerar-se questionáveis e deverá repetir-se o ensaio das Amostras. Além disso, de acordo com o folheto da embalagem, a curva gerada com os padrões do kit, deverá ir ao encontro dos estritos requisitos de validação. Se o ensaio não corresponder a estes requisitos, deverá ser repetido, ou então contacte os serviços de apoio técnico da Quidel.

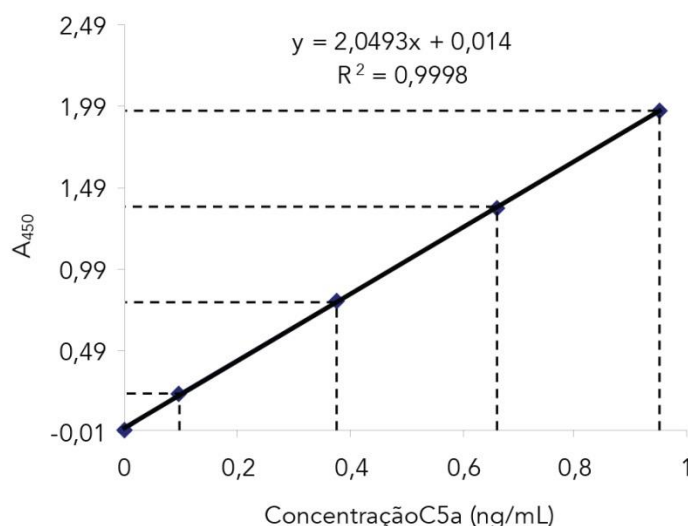
O certificado de análise, incluído neste kit, é específico deste lote, e destina-se a comprovar a semelhança dos resultados obtidos pelo vosso laboratório, com os resultados que a Quidel obteve.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Cálculo dos Resultados

Uso da curva-padrão: Na curva-padrão para o EIA C5a utilizam-se os valores de A_{450} EIA dos padrões já corrigidos com o branco, por subtracção, (no eixo x) e as respectivas concentrações (no eixo y). A curva-padrão deve ir ao encontro dos requisitos de validação. A maioria dos computadores e calculadoras são capazes de executar estes cálculos. Exemplo de uma curva-padrão típica é o que se pode ver abaixo na Figura 1.

Figura 1
Curva- Padrão Representativa



Amostra	A_{450}	ng/mL
Padrão A	-0,001	0

Amostra	A₄₅₀	ng/mL
Padrão B	0,225	0,095
Padrão C	0,789	0,378
Padrão D	1,369	0,661
Padrão E	1,965	0,953
r = 0,9998	m = 2,0493	b = 0,014

Cálculo da Concentração Real de C5a nas Amostras

A concentração atribuída nos frascos de amostras-padrão e nos frascos dos controlos são unidades absolutas de complexo de C5a. A concentração de C5a existente numa amostra é calculada por multiplicação da concentração obtida pelo factor de diluição utilizado. Por exemplo: se se diluir 1:20 uma amostra de plasma EDTA e a curva de regressão linear mostrar uma concentração de 0,5 ng C5a/mL, então a concentração de C5a na amostra será de 10 ng C5a/mL (ou 20 x 0,5).

Para obter determinações rigorosas de concentrações de C5a para amostras de ensaio que produzam valores A₄₅₀ maiores que o de padrão E de C5a (ou que produzam valores menores que o de LLOQ), as Amostras deverão ser novamente ensaiadas com uma diluição diferente, de modo a que os novos valores A₄₅₀ se enquadrem nestes limites. Devem repetir-se os ensaios das Amostras-padrão de C5a e dos controlos, em todos os ensaios repetidos.

Validação

Determinar o declive, a intersecção, e o coeficiente de correlação obtidos pela linha de curva otimizada para os padrões de C5a A, B, C, D, e E. Os valores devem situar-se dentro dos parâmetros especificados para que se possa qualificar o ensaio:

coeficiente correlação (r):	> 0,98
declive (m):	1,14-2,50
y- intersecção (b):	(-)0,0145 a (+)0,0532

Verificar se os valores estão de acordo com os valores expressos nos rótulos dos frascos.

LIMITAÇÕES

O Imunoensaio enzimático C5a MicroVue tem sido usado para ensaiar amostras colhidas como soro ou como plasma em EDTA e citrato. Não foram ensaiados outros anti-coagulantes.

VALORES OBSERVADOS

Foram ensaiados soro e plasma EDTA de vinte (20) dados aparentemente normais e saudáveis com este kit MicroVue. Abaixo apresentam-se os resultados.

	n	Média (ng/ml)	Gama (ng/ml)
EDTA Plasma	20	20,65	0,37 a 74,33
Soro	20	50,09	13,37 a 179,23

NOTA: As concentrações de C5a determinadas para as Amostras de soro ou plasma, podem variar de laboratório para laboratório; portanto, recomenda-se que cada laboratório estabeleça a sua própria gama. As concentrações indicadas deverão ser tomadas como simples linhas de orientação.

DESEMPENHO DO ENSAIO

Limites

LOD: O limite de detecção (LOD) para o ensaio de C5a é de 0,01 ng/mL, foi determinado pelo limite superior de 3SD Inum estudo-padrão zero.

LLOQ: O limite inferior de quantificação (LLOQ) para o ensaio de the C5a é de 0,050 ng/mL, que é a concentração mais baixa na curva-padrão, que vai ao encontro dos critérios de rigor e precisão da NCCLS. (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*)

Substâncias Interferentes

As seguintes substâncias não interferem no ensaio, conforme se apurou:

Substância	Concentração
Bilirrubina	40 mg/dL
Hemoglobina	500 mg/dL
Triglicéridos	3000 mg/dL
Na + Heparina	14 U/mL
Proteína C5	80 mg/L
Glucose	1200 mg/dL
Colesterol	500 mg/dL

As amostras puras com níveis de albumina > 118,6 mg/dL ou de Gama Globulina > 8,9 mg/dL revelaram interferências com a quantificação, no ensaio, e devem ser diluídas de maneira consentânea.

Precisão

Determinou-se a precisão intra e inter ensaios, procedendo a ensaios de 20 réplicas, de 2 Amostras de plasma e de 2 Amostras de soro em 10 operações diferentes.

Amostra	C5a (ng/mL)	No-ensaio ¹ C.V. (%)	Entre ensaios ² C.V. (%)
Plasma EDTA	12,34	3,8	9,9
	1,41	3,9	13,0
Soro	30,13	3,6	7,1
	21,92	3,5	7,8

¹n = 20 réplicas ²n = 10 ensaios

Linearidade

Procedeu-se à execução da Linearidade diluindo Amostras, em série, com diluente de Amostras e comparando os valores observados com os valores esperados.

Amostra	Factor Diluição	Observado C5a (ng/mL) ³	Esperado C5a (ng/mL) ³	Recuperação (%)
EDTA Plasma	10	1,214	1,266	96%
	20	0,667	0,633	105%
	40	0,343	0,317	108%
	80	0,164	0,158	103%
	160	0,077	0,079	98%
Soro	25	0,873	0,864	99%
	50	0,465	0,432	93%

100	0,236	0,216	92%
200	0,115	0,108	94%
400	0,054	0,054	100%

³Factor de diluição não incluído

APOIO TÉCNICO

Para apoio fora dos EUA é favor contactar o vosso fornecedor ou distribuidor local. para obter mais informações a respeito da Quidel e dos produtos Quidel e seus distribuidores pode consultar o sítio quidel.com.

REFERÊNCIAS

1. Tack, Brian F., Sam C. Morris, and James W. Prahl. "Fifth component of human complement: purification from plasma and polypeptide chain structure." *Biochemistry* 18(8) (1979): 1490-1497.
2. Guo, Ren-Feng and Peter A. Ward. "Role of C5a in Inflammatory Responses." *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005): 821-852.
3. Hugli, T. E. "Biochemistry and biology of anaphylatoxins." *Complement* 3(3) (1986): 111-127.
4. Yancey, K. B. "Biological properties of human C5a: selected *in vitro* and *in vivo* studies." *Clin. Exp. Immunol.* 71 (1988): 207-210.
5. Hoenich, Nicholas A. and Kostas P. Katopodis. "Clinical characterization of a new polymeric membrane for use in renal replacement therapy." *Biomaterials* 23(18) (2002): 3853-3858.
6. Christine S. Rinder et al. "Selective blockade of membrane attack complex formation during simulated extracorporeal circulation inhibits platelet but not leukocyte activation." *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 118(3) (1999): 460-466.
7. Smith, Brian Richard, Henry M. Rinder, and Christine S. Rinder. "Interaction of Blood and Artificial Surfaces." *Thrombosis and Hemorrhage*, 3rd ed. Eds. J. Loscalzo and A. I. Schafer. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 865-885.
8. Yvan Gasche et al. "Complement depletion during haemofiltration with polyacrylonitrile membranes." *Nephrol. Dial. Transplant* 11 (1996): 117-119.
9. Claudia Sperling et al. "In vitro blood reactivity to hydroxylated and non-hydroxylated polymer surfaces." *Biomaterials* 2007, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.041.
10. Frangogiannis, Nikolaos G., Wayne C. Smith, and Mark L. Entman. "The inflammatory response in myocardial infarction." *Cardiovascular Res.* 53 (2002): 31-47.
11. Walter S. Speidl et al. "Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis." *Euro. Heart Journal* 26 (2005): 2294-2299.
12. Langlois, Paul F. and Maria S. Gawryl. "Detection of the terminal complement complex in patient plasma following acute myocardial infarction." *Atherosclerosis* 70 (1988): 95-105.
13. Jawed Fareed et al. "Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes." *Clin. Chem.* 48(8) (1998): 1845-1853.
14. Antti P. Vakeva et al. "Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: Role of the Terminal Complement Components and inhibition by anti C5 therapy." *Circulation.* 97 (1998): 2259-2267.
15. Thiruma V. Arumugam et al. "Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death." *PNAS* 104(35) (2007): 14104-14109. doi:10.1076/pnas.0700.506.104.
16. Van Beek, Johan, Kristina Elward, and Philippe Gasque. "Activation of Complement in the Central Nervous System: Roles in Neurodegeneration and Neuroprotection." *Ann. NY Acad. Sci.* 992 (2003): 56-71.
17. Sheerin, N. S. and S. H. Sacks. "Leaked protein and interstitial damage in the kidney: is complement the missing link?" *Clin. Exp. Immunol.* 130 (2002): 1-3.
18. T. R. Welch et al. "C5a is important in the tubulointerstitial component of experimental immune complex glomerulonephritis." *Clin. Exp. Immunol.* 130 (2002): 43-48.
19. Thomas Muller et al. "Detection of renal allograft rejection by complement components C5a and TCC in plasma and urine." *J. Lab. Clin. Med.* 129 (1997): 62-71.

20. A. Conroy et al. "C5a Enhances Dysregulated Inflammatory and Angiogenic Responses to Malaria *In vitro*: Potential Implications for Placental Malaria." *PLoS ONE* 4(3) 2009: e4953. doi:10.1371/journal.pone.0004953.
21. A. Bengtsson et al. "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 (1998): 509-514.
22. Haas, Pieter-Jan and Jos van Strijp. "Anaphylatoxins: Their Role in Bacterial Infections and Inflammation." *Immunol. Res.* 37(3) (2007): 161-175.
23. Ren-Feng Guo et al. "In vivo regulation of neutrophil apoptosis by C5a during sepsis." *J. Leukoc. Biol.* 80(6) (2006): 1575-1583.
24. Ward, Peter A. "Role of the complement in experimental sepsis." *J. Leukoc. Biol.* 83(3) (2008): 467-470.
25. Mollnes, T. E., P. Garred, and G. Bergseth. "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. Immunol.* 73(3) (1988): 484-488.
26. Centers for Disease Control. "Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings." *MMWR.* 1987 36 (suppl. No. 2S):001.

REF A025 – MicroVue C5a 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

PIA025001PT00 (02/17)

GLOSSÁRIO

REF

Número de catálogo



Marca CE de conformidade

EC REP

Representante autorizado na Comunidade Europeia

LOT

Número do lote



Utilizar até



Fabricante



Limitação de temperatura



Utilização prevista



Consulte as instruções e-rotulagem de utilização

IVD

Para diagnóstico *in vitro*



Contém o suficiente para 96 determinações

CONT

Conteúdo / Contem

CONTROL

Controlo
