

Um imunoenensaio enzimático para a quantificação do fragmento C3a da proteína do complemento C3 em soro ou plasma humano.

SUMÁRIO

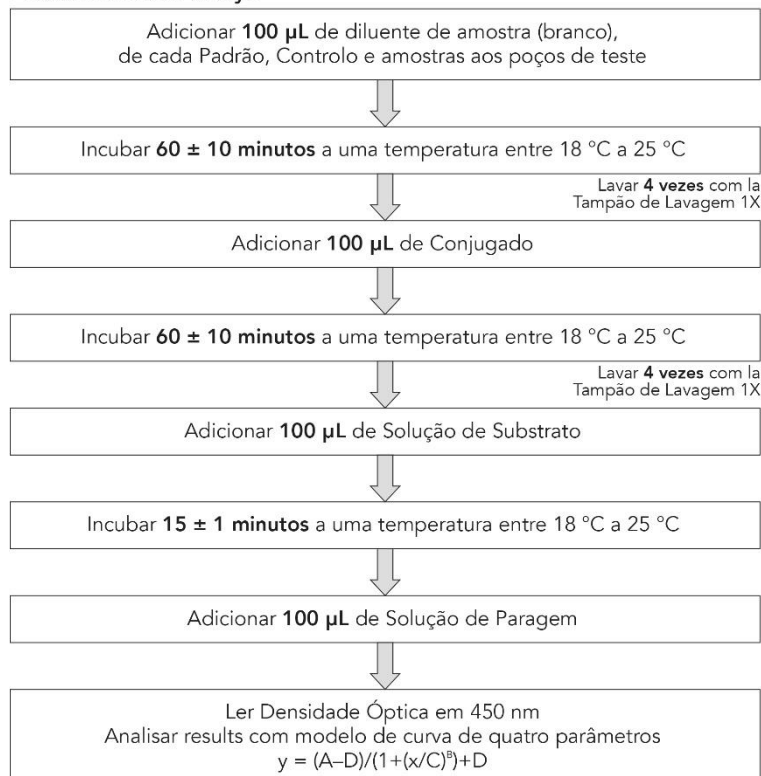
Preparação do Reagent

- Diluir la Concentrado de Solução de Lavagem 1:20 com água desionizada.

Preparação da Amostra (Plasma – 1:200; Soro – 1:5000)

- Pipete o diluente utilizado para a diluição 1 em tubos separados ou placas:
90 μ L para as amostras de plasma (Diluição 1 para plasma)
490 μ L para as amostras de soro (Diluição 1 para soro)
- Pipete o diluente utilizado na diluição 2 em tubos separados ou placas:
475 μ L para as amostras de plasma (Diluição 2 para plasma)
495 μ L para as amostras de soro (Diluição 2 para soro)
- Descongele as amostras rapidamente incubando a 37°C até que cerca de 90% da amostra esteja descongelada. Após o que coloque de imediato em gelo.
- Agite gentilmente as amostras.
- Transfira 10 μ L da amostra de plasma ou soro para a Diluição 1 correspondente, agite gentilmente.
- Transferir las siguientes cantidades de cada Dilución-1 a la Dilución-2 especificada, y mezclar cuidadosamente:
25 μ L Diluição 1 de plasma \rightarrow 475 μ L Diluição 2 para plasma
5 μ L Diluição 1 de soro \rightarrow 495 μ L Diluição 2 para soro

Procedimiento de ensayo





FINALIDADE DO ENSAIO

O imunoensaio enzimático MicroVue C3a Plus mede a quantidade de C3a em soro ou plasma humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O imunoensaio enzimático MicroVue C3a Plus é um ensaio com 96 poços, de captura directa, que mede a quantidade de C3a em soro, plasma e outras amostras biológicas ou experimentais de humanos.

Em condições normais, a activação das vias alternativa, clássica, ou da lectina – resulta na formação da enzima convertase C3 multimolecular, capaz de clivar a C3 em C3a e C3b.¹ A C3a é um fragmento de proteína de baixo peso molecular (aproximadamente 9kD) com 77 amino-ácidos.² A C3a é metabolizada rapidamente pela enzima carboxipeptidase N presente no soro, para uma estrutura de 76 aminoácidos, mais estável, menos activa, C3a des-Arg.³ Para fins de conveniência, nesta documentação referem-se ambas as formas por “C3a”.

O ensaio MicroVue C3a Plus, um procedimento quantitativo rápido e altamente específico, de medição dos níveis de C3a, 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 C3a *in vivo* ou *in vitro*. Foi demonstrado que o fragmento C3a aumenta a permeabilidade vascular, é espasmogénico e quimiotáctico e induz a libertação de mediadores farmacologicamente activos por vários tipos de células. O papel do fragmento C3a na patogenia das reacções inflamatórias observadas na sépsis por bactérias Gram-negativas, traumatismo, doença cardíaca isquémica, isquemia cerebral, síndrome pós-diálise e em várias doenças auto-imunes, incluindo a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso e a glomerulonefrite aguda está bem documentado.^{4,6-23}

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O imunoensaio enzimático MicroVue C3a Plus 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 C3a humano, (2) um anticorpo polyclonal de rato conjugado com HRP (peroxidase de rábano) para a região C3a de C3, e (3) um substrato cromogénico.

Na etapa 1, os padrões, os controlos e as amostras são pipetados nos poços revestidos com um anticorpo monoclonal de rato para a C3a. O anticorpo monoclonal vai ligar-se a C3a nos padrões, controlos e amostras. Após o período de incubação, realiza-se uma lavagem para remover o material não ligado.

Na etapa 2, adiciona-se conjugado de peroxidase de rábano anti-C3(C3a), a cada poço. A enzima conjugada anti-C3 (C3a) liga-se à C3a imobilizada, ligada na primeira fase. Após o período de incubação, efectua-se uma lavagem para remover qualquer conjugado não-ligado.

Na etapa 3, 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. Após o 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 A₄₅₀. A intensidade da cor da mistura da reacção é proporcional à concentração de C3a presente nos Padrões, Controlos, e Amostras diluídas do ensaio. Os resultados calculam-se com base na curva-padrão gerada, recorrendo 4-parâmetro de análise.

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

96 Ensaios para Complexo de C3a

O kit MicroVue C3a Plus EIA contém o seguinte:

A	Padrões C3a Plus	Items 5140 – 5145	1 cada, 1,5 mL
B	Pronto a usar. Contém soro humano de concentração conhecida de C3a (ng/mL), estabilizadores de		
C	proteínas		
D			
E			
L	Controlo Inferior:	Item 5146	1,5 mL
	Pronto a usar. Contém soro humano com a concentração determinada de C3a (ng/mL), estabilizadores de proteínas		
N	Controlo Superior	Item 5147	1,5 mL
	Pronto a usar. Contém soro humano com a concentração determinada de C3a (ng/mL), estabilizadores de proteínas		
1	Tiras Revestidas	Item 5148	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 Amostra	Item 5150	50 mL
	Contém uma base proteica tamponada com 0,05% de Proclin 300		
5	Substrato de TMB	Item 5059	12 mL
	Pronto a usar. Contém tetrametilbenzidina 3,3',5,5' (TMB) e peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)		
6	Conjugado	Item 5151	12 mL
	Contém anticorpo polyclonal conjugado com peroxidase de rábano para C3a		

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)
- Placa de diluição de 96 poços (VWR REF: 47743-828) ou tubos de ensaio e suportes para diluição de amostras (opcional)
- Placas de microensaio limpas, novas, para um método de réplica de placas (opcional)
- Contentor graduado para diluição de tampão de lavagem
- Depósito ou outro sistema de lavagem validado para o imunoensaio
- Micropipetas e pontas esterilizadas, descartáveis
- Reservatórios de reagentes para adicionar soluções de conjugado, substrato e de paragem à placa (utilizar reservatórios limpos, não utilizados para cada reagente)
- Pipeta multicanal (8 ou 12 canais) ajustável ou micropipetas de repetição
- 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*

- 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 antigénio 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."²⁴
- 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.
- Ensaia as amostras em duplicado.
- Não usar um poço do microensaio mais que uma vez.
- 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 líquido 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 fluído 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 10). 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 25 °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.

A descoloração ou a turbidez da Diluente de Amostra, indicam a sua deterioração. Nesse caso, deve eliminar-se essa solução. A cor do diluente de amostra pode variar entre cor-de-rosa e castanho, o que é normal e não indica deterioração ou instabilidade.

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 C3a pode ser gerada em amostras mal manipuladas, por activação indevida do complemento. Para resultados ideais em plasma, recomenda-se a utilização de tubos de colheita K2 EDTA (Fisher REF: 22-040-161).

Os valores para as amostras normais de soro serão tipicamente mais elevados do que os obtidos com EDTA. Os níveis de C3a em plasma de EDTA podem, portanto, representar com maior rigor as concentrações *in vivo*.²⁵

As amostras de soro e plasma de EDTA deverão ser colhidas assepticamente, empregando técnicas padrão.²⁶ As amostras deverão ser logo ensaiadas, caso contrário, deverão ser armazenadas em gelo, por não mais de 2 horas, antes de se proceder ao ensaio.

Se não se puder executar o ensaio das Amostras num prazo de duas 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 **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

Para minimizar o tempo de manuseamento de amostras, configurar uma placa de diluição (ou tubos) e adicionar o volume adequado de diluente (conforme descrito na secção *Diluição de Amostras* abaixo) antes de descongelar amostras para avaliação.

Descongelar as Amostras rapidamente, a 37 °C. De imediato, colocar as Amostras acabadas de descongelar, em gelo de modo a evitar a activação do complemento antes de as diluir. **Manter as amostras no gelo**

durante um período não superior a duas horas. 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 C3a, que poderá afectar os resultados. Deve executar-se o ensaio o mais cedo possível, imediatamente após a descongelação. Poderão efectuar-se um ciclo de congelação/dcongelação, 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.

OBSERVAÇÃO CRÍTICA: É de extrema importância que a colheita e diluição da amostra seja efectuada correctamente para evitar activação complementar e produção resultante de C3a nas amostras.

Há que diluir as amostras de modo a que os valores A_{450} observados, estejam acima do LLOQ e não excedam o ULOQ. 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 2 conjuntos de tubos de ensaio de #1 até #N e registar quais as amostras que correspondem aos tubos respectivos. Em alternativa, pode ser utilizada uma placa de diluição de 96 poços para fazer as diluições.

Preparar uma diluição adequada (ver a secção seguinte) de cada amostra com o Diluente de Amostras. Misturar suavemente, evitando a formação de espuma e de bolhas. Não armazenar nem reutilizar amostras diluídas.

Método de diluição

Para obter resultados ideais, efectuar uma diluição de dois passo para preparar cada amostra.

Plasma

Diluir amostras de plasma 1:200 no Diluente de amostras fornecido, da seguinte forma:

- Para cada diluição, pipetar 90 μ L de Diluente de amostra para diluição 1 e 475 μ L para diluição 2 em tubos ou placas de diluição separadas.
- Preparar a diluição 1 adicionando 10 μ L da Amostra de teste para 90 μ L de Diluente de amostra (o tubo ou placa de diluição de plasma 1). Misturar suavemente.
- Preparar a diluição 2 adicionando 25 μ L de diluição 1 a 475 μ L de Diluente de amostra (o tubo ou placa de diluição de plasma 2). Misturar suavemente.

Soro

Diluir amostras de soro 1:5000 no Diluente de amostra fornecido, da seguinte forma:

- Para cada amostra de teste, pipetar 490 μ L de Diluente de amostra para diluição 1 e 495 μ L para diluição 2 em tubos ou placas de diluição separadas.
- Preparar a diluição 1 adicionando 10 μ L da Amostra de teste para 490 μ L de Diluente de amostra (o tubo ou placa de diluição de soro 1). Misturar suavemente.

- Preparar a diluição 2 adicionando 5 µL de diluição 1 a 495 µL de Diluente de amostra (o tubo ou placa de diluição de soro 2). Misturar suavemente.

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 µL/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 µL de cada um dos padrões, Amostras diluídas ou Controlos, directamente à placa revestida, dispensa-se 120 µL a 130 µL 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 µL 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 25 °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*).

Amostras-padrão e os Controlos

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

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 e 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 e 8°C. Caso ocorra descoloração ou turvação, eliminar o reagente.

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. Rotular placa/tubos de diluição para corresponder a todas as amostras de teste.
3. Adicionar Diluente de amostra à placa/tubos de diluição. (Ver *Diluição de Amostras*.)
4. Descongelar amostras de teste e diluir de imediato.
5. Seleccionar um ou dois poços como branco. Juntar 100 µL de diluente de Amostras, aos poços que irão ser usados.
6. Adicionar 100 µL de amostra-padrão de C3a Plus (A, B, C, D, E) em duplicado. **NOTA: As amostras-padrão estão prontas a usar e não precisam de diluição.**
7. Adicionar 100 µL tanto de controlo inferior/baixo e de controlo superior de C3a Plus aos poços duplicados. **NOTA: Os Controlos estão prontos a usar, não precisando de diluição.**
8. Adicionar 100 µL de cada uma das Amostras diluídas ao poço do microensaio a que pertencem. (Ver *Diluição de Amostras*.)
9. Incubar a 18 °C a 25 °C durante 60 ± 10 minutos.
10. Lavar os poços do micro ensaio como segue:
 - a. Depois da incubação, no passo 9 (ou no passo 12 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 três vezes os passos b-c.**
 - e. Após o quarto ciclo de lavagem, inverter a placa e bater firmemente contra papel absorvente, duas vezes, para remover todo o líquido restante (se for utilizada lavagem manual).
11. Com uma pipeta multicanal, distribuir 100 µL de conjugado de C3a em cada poço lavado, do ensaio, incluindo o(s) branco(s).
12. Incubar as tiras do microensaio a 18 °C a 25 °C durante 60 ± 10 minutos.
13. Lavar os poços do microensaio após uma incubação de 60-minutos (passo 12), conforme descrito no número 10 do *PROCEDIMENTO DO ENSAIO*.
14. Imediatamente a seguir ao procedimento da lavagem, deitar 100 µL de solução de substrato em cada poço, incluindo o(s) branco(s).
15. Incubar as tiras do microensaio a 18 °C a 25 °C durante 15 (± 1) minutos.
16. 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.
17. 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 16), procedendo à correcção necessária dos brancos.
18. Determinar a concentração das Amostras e dos Controlos da curva-padrão.
19. 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 C3a Plus contém controlos baixos e altos. 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.

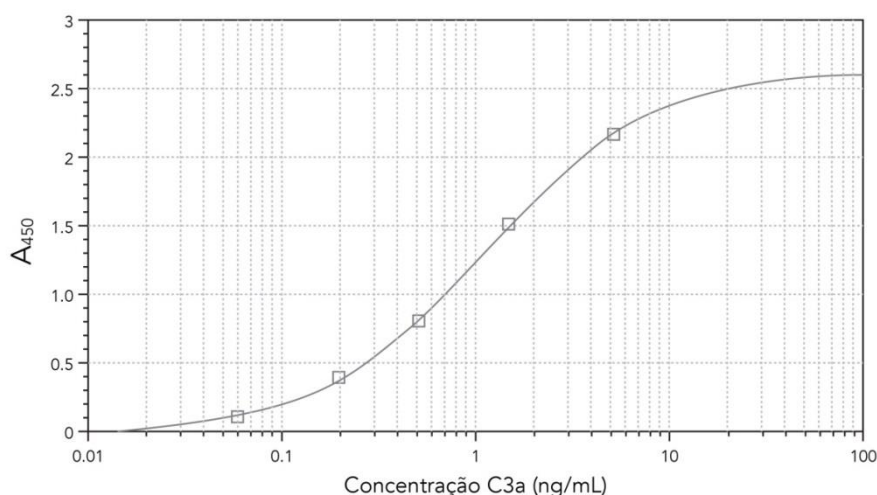
O certificado de análise, incluído neste kit, é específico deste lote, e destina-se a comprovar a semelhança dos resultados obtidos pelo vosso laboratório, com os resultados que a Quidel obteve.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Cálculo dos Resultados

Uso da curva-padrão: Na curva-padrão para o EIA C3a Plus utilizam-se os valores de A_{450} EIA dos padrões já corrigidos com o branco, por subtração, (no eixo x) e as respectivas concentrações (no eixo y). A curva-padrão deve ir ao encontro dos requisitos de validação. Exemplo de uma curva-padrão típica é o que se pode ver abaixo na Fig. 1.

Figura 1
Curva- Padrão Representativa



Cálculo da Concentração Real de C3a nas Amostras

A concentração atribuída nos frascos de amostras-padrão e nos frascos dos controlos são unidades absolutas de complexo de C3a. A concentração de C3a existente numa amostra é calculada por multiplicação da concentração obtida pelo factor de diluição utilizado. Por exemplo: se se diluir 1:200 uma amostra de plasma EDTA e a curva logística de 4 parâmetros mostrar uma concentração de 0,5 ng C3a/mL, então a concentração de C3a na amostra será de 100 ng C3a/mL (ou $200 \times 0,5$)

Para obter determinações rigorosas de concentrações de C3a para amostras de ensaio que produzam valores A_{450} maiores que o de padrão E de C3a (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 A_{450} se enquadrem nestes limites. Devem repetir-se os ensaios das Amostras-padrão de C3a e dos controlos, em todos os ensaios repetidos.

Validação

Determinar a assíntota superior (D) e o coeficiente de correlação do ajuste da curva logística de 4 parâmetros derivada para os padrões A, B, C, D e E do fragmento C3a. Os valores devem situar-se dentro dos parâmetros especificados para que se possa qualificar o ensaio:

coeficiente correlação (r^2): $> 0,98$
assíntota superior (D): $\geq 1,49$

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

LIMITAÇÕES

O Imunoensaio enzimático C3a Plus MicroVue tem sido usado para ensaiar amostras colhidas como soro ou como plasma em K2 EDTA. 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 C3a Plus MicroVue. Abaixo apresentam-se os resultados.

	n	Média (ng/mL)	Gama (ng/mL)
EDTA Plasma	20	129,6	33,8 a 268,1
Soro	20	240,4	71,0 a 589,2

NOTA: As concentrações de C3a 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 C3a Plus é de 0,012 ng/mL, foi determinado pelo limite superior de 3SD Inum estudo-padrão zero.

LLOQ: O limite inferior de quantificação (LLOQ) para o Ensaio de C3a Plus é de 0,023 ng/mL, que é a concentração mais baixa na curva-padrão, que vai ao encontro dos critérios internos relativamente à exactidão e precisão.

ULOQ: O limite de quantificação superior (ULOQ) para o Ensaio de C3a Plus é de 2.531 ng/mL, a concentração mais elevada na curva padrão que cumpriu os critérios internos relativamente a exactidão e precisão. Amostras diluídas com uma concentração acima deste limite devem ser novamente testadas com uma diluição superior.

Substâncias Interferentes

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

Substância	Concentração
Albumina	6000 mg/dL
γ Globulina	6000 mg/dL
Bilirrubina	20 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Triglicéridos	3000 mg/dL
Na + Heparina	3 U/mL
Glicose	1000 mg/dL
Colesterol	500 mg/dL
EDTA	10 mM
Proteína C3	5 µg/mL
Proteína C5	5 µg/mL
C5a	5 µg/mL

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	C3a	Intra-ensaio ¹	Inter ensaios ²
	(ng/mL)	C.V. (%)	C.V. (%)
Plasma EDTA	55,80	4,7	14,7
	119,5	5,0	19,6
Soro	533,3	5,3	8,3
	2308	4,5	5,9

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 C3a (ng/mL)	Recuperação (%)
EDTA Plasma	175	67,88	105,5
	200	64,36	100,0
	225	63,67	98,9
	250	62,99	97,9
	275	65,13	101,2
	300	65,54	101,8
Soro	1250	2097	96,5
	2500	2128	97,9
	5000	2173	100,0
	10000	2160	99,4
	20000	2196	101,1
	40000	2423	111,5

Recuperação Por Fortificação

A Recuperação por fortificação foi efectuada através da fortificação de amostras com uma quantidade conhecida de C3a purificada e comparando os valores observados com os valores esperados.

Amostra	C3a (ng/mL)	Fortificação (ng/mL)	Resultado (ng/mL)	Recuperação (%)
Serum 1	1021		2788	99,7
Serum 2	615,1	1775	2343	98,0
Serum 3	2080		3677	95,4
Plasma 1	53,4		230,5	99,7
Plasma 2	87,4	177,8	240,7	90,8
Plasma 3	118,3		278,8	94,1

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. Markiewski, M. Maciej, Dimitrios Mastellos, Ruxandra Tudoran, Robert A. DeAngelis, Christoph W. Strey, et al. 2004. C3a and C3b Activation Products of the Third Component of Complement (C3) Are Critical for Normal Liver Recovery after Toxic Injury. *The Journal of Immunology*. 173: 747-754. <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/173/2/747>.
2. Hugli, Tony E. 1975. Human Anaphylatoxin (C3a) from the Third Component of Complement. Primary Structure. *Journal of Biological Chemistry*. 250(21):8293-8301.
3. Morgan, Edward L., William O. Weigle and Tony E. Hugli. 1982. Anaphylatoxin-Mediated Regulation of the Immune Response, I. C3a-mediated Suppression of Murine Humoral Immune Responses. *J. Exp. Med.* 155:1412-1426.
4. Hugli, Tony E. and Hans J. Muller-Eberhard. 1978. Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Advances in Immunology*. 26:1-53.
5. Hugli, Tony E. 1986. Biochemistry and Biology of Anaphylatoxins. *Complement*. 3:111-127.
6. Purwar, Rahul, Miriam Wittmann, Jorg Zwirner, Martin Oppermann, et al. 2006. Induction of C3 and CCL2 by C3a in Keratinocytes: A Novel Autocrine Amplification Loop of Inflammatory Skin Reactions. *J. Immunol.* 177: 4444-4450.
7. Mack, W.J., A.F. Ducruet, Z.L. Hickman, M.C. Garrett, et al. 2007. Early plasma complement C3a levels correlate with functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 61(2):255-60; discussion 260-1.
8. Burns, Victoria E., Kate M. Edwards, Christopher Ring, Mark Drayson, and Douglas Carroll. 2008. Complement Cascade Activation After an Acute Psychological Stress Task. *Psychosom Med.* 70:387-396.
9. Marcheix, B., Michel Carrier, Catherine Martel, Marieve Cossette, et al. 2008. Effect of Pericardial Blood Processing on Postoperative Inflammation and the Complement Pathways. *Ann. Thorac. Surg.* 85:530-535. doi: 10.1016/j.athoracsur.207.08.050.
10. Gerasimidis, Thomas, Giorgos Sfyroeras, Giorgos Trellopoulos, Lemonia Skoura, Konstantinos Papazoglou, Konstantinos Konstantinidis, ... Efthimia Parapanisiou. 2005. Impact of Endograft Material on the Inflammatory Response After Elective Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *Angiology*. 56(6):743-753.
11. Hoenich, Nicholas A. and Kostas P. Katopodis. 2002. Clinical characterization of a new polymeric membrane for use in renal replacement therapy. *Biomaterials*. 23:3853-3858.
12. Rinder, Christine S., Henry M. Rinder, Michael J. Smith, Jayne B. Tracey, Jane Fitch, Lan Li, ... Brian R. Smith. 1999. Selective Blockade of Membrane Attack Complex Formation During Simulated Extracorporeal Circulation Inhibits Platelet but not Leukocyte Activation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 118:460-466.
13. Smith, Brian Richard, Henry M. Rinder, and Christine S. Rinder. 2002. Interaction of Blood and Artificial Surfaces. *Thrombosis and Hemorrhage, 3rd Edition*. Chapter 42.
14. Gasche, Yvan, Manuel Pascual, Peter M. Suter, Herve Favre, Jean-Claude Chevrolet and Jurg A. Schifflerli. 1996. Complement depletion during haemofiltration with polyacrylonitrile membranes. *Nephrol Dial Transplant*. 11:117-119.
15. Sperling, Claudia, Manfred F. Maitz, Sandra Talkenberger, Marie-Francoise Gouzy, Thomas Groth, and Carsten Werner. 2007. *In vitro* blood reactivity to hydroxylated and nonhydroxylated polymer surfaces. *Biomaterials*. doi:10.1016/j. biomaterials.2007.04.041.
16. Frangogiannis, Nikolaos G., C. Wayne Smith, and Mark L. Entman. 2002. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Res.* 53:31-47.
17. Fareed, Jawed, Debra A. Hoppensteadt, Fred Leya, Omer Iqbal, Helmut Wolf, and Roger Bick. 1998. Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes. *Clin Chem.* 44:8(B):1845-1853.
18. Arumugam, Thiruma V., Sung-Chun Tang, Justin D. Lathia, Aiwu Cheng, Mohamed R. Mughal, ... Mark P. Mattson. 2007. Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *PNAS*. 104(35):14104-14109. www.pnas.org doi:10.1073.pnas.0700506104.
19. Van Beek, Johan, Kristina Elward, and Philippe Gasque. 2003. Activation of Complement in the Central Nervous System: Roles in Neurodegeneration and Neuroprotection. *Ann NY Acad Sci.* 992:56-71.

20. Sheerin, N.S. and S.H. Sacks. 2002. Leaked protein and interstitial damage in the kidney: is complement the missing link? *Clin Exp Immunol.* 130:1-3.
21. Bengtsson, A., H. Redl, G. Schlag, K Hogasen, O. Gotze, and T.E. Mollnes. 1998. Anti-TNF Treatment of Baboons with Sepsis Reduces TNF- α IL-6 and IL-8, but not the Degree of Complement Activation. *Scand J Immunol.* 48:509–514.
22. Haas, Pieter-Jan and Jos van Strijp. 2007. Anaphylatoxins: Their Role in Bacterial Infection and Inflammation. *Immunol Res.* 37(3):161-175.
23. Black, Sylvester M., John F. Grehan, Andrew L. Rivard, Barbara A. Benson, Andrea E. Wahner, ... Agustin P. Dalmasso. 2006. Porcine Endothelial Cells and Iliac Arteries Transduced with AdenoIL-4 Are Intrinsically Protected, through Akt Activation, against Immediate Injury Caused by Human Complement. *J. Immunol.* 177:7355-7363.
24. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 2007. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition.* Washington: U.S. Government Printing Office.
<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>.
25. Mollnes, T.E., P. Garred, and G. Bergseth. 1988. Effect of time, temperature and anticoagulants on *in vitro* complement activation: Consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clin. Exp. Immunology.* 73:484 488.
26. Centers for Disease Control. 1987. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR.* 36 (suppl. No. 2S):001.

REF A032 – MicroVue C3a Plus EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA032001PT00 (11/17)

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



Risco biológico

IVD

Para diagnóstico *in vitro*



Contém o suficiente para 96 determinações

CONT

Conteúdo / Contem

CONTROL

Controlo
