

Un inmunoensayo enzimático para la cuantificación del fragmento C4a de la proteína del complemento C4 en suero o plasma humano

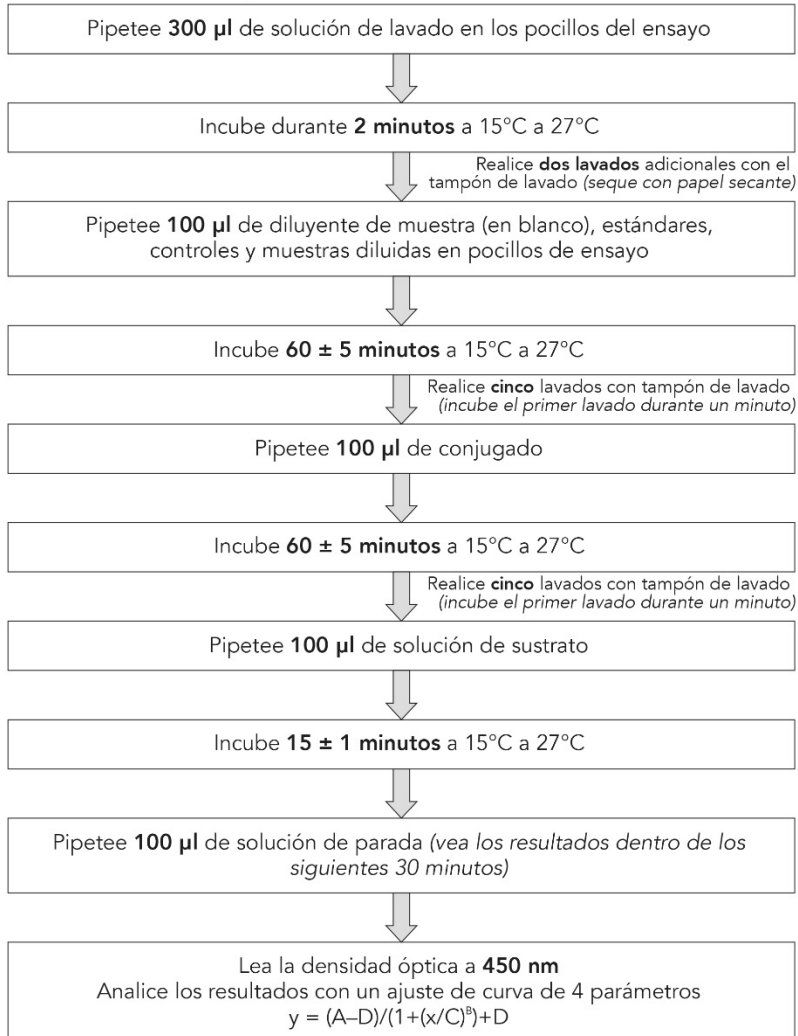
Para uso diagnóstico *in vitro*. Solo para exportación. No apto para la venta o uso en Estados Unidos o Canadá.

RESUMEN

Reactivo, estándares, controles y preparación de muestras

- Diluya el concentrado de tampón de lavado a 1:20 con agua desionizada.
- Diluya las muestras de plasma a 1:40 con el diluyente de muestras (por ejemplo, muestra de 10 µl + diluyente de 390 µl)
- Diluya las muestras de suero a 1:80 con el diluyente de muestras (por ejemplo, muestra de 10 µl + diluyente de 790 µl)

Procedimiento del ensayo



S



USO PREVISTO

El kit de inmunoensayo enzimático MicroVue C4 mide la cantidad del fragmento de complemento C4a, un fragmento de la activación de la proteína del complemento, C4 en el plasma o suero humano y de primates. La medición del C4a en el plasma o suero humano proporciona pruebas de la implicación de la vía clásica o de lectina del complemento.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El inmunoensayo enzimático MicroVue C4 es un inmunoensayo de 96 pocillos de captura directa para la medición del C4a en suero, plasma y otras muestras biológicas o experimentales de humanos o primates. En condiciones normales, la activación de las vías clásicas o la lectina del complemento da lugar a la fragmentación de la proteína del complemento, C4 en C4a y C4b por la proteasa, C1s. El C4a es fragmentado rápidamente a su forma más estable y menos activa C4a-des Arg por la enzima N de carboxipeptidasa de suero endógeno. Por lo tanto, la cuantificación del C4a-des Arg debe proporcionar una medición fiable de la activación de la vía clásica o del complemento de lectina que se ha producido en las muestras de prueba.¹⁻⁴

El ensayo MicroVue C4a, un procedimiento rápido, muy específico y cuantitativo para medir los niveles de C4a, está diseñado para las investigaciones sobre la función o el estado de activación de la vía del complemento en numerosos entornos de investigación, y para monitorizar la generación de C4a *in vivo* o *in vitro*. El C4a es la más débil de la anafilotoxinas, en comparación con C3a y C5a; sin embargo, tiene un papel importante en el logro de cambios de la permeabilidad vascular, la inducción de la contracción del músculo liso y la liberación de histamina de los mastocitos y basófilos. Se cree que el C4a tiene un papel importante en varias enfermedades autoinmunitarias como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la glomerulonefritis aguda.⁵⁻¹⁵ Recientemente se ha implicado como un marcador de la enfermedad de Lyme aguda y crónica.¹⁶⁻¹⁷

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El inmunoensayo enzimático MicroVue C4a para la cuantificación de C4a en el plasma o suero humano es un procedimiento de tres pasos en el cual se utiliza (1) una placa de microensayo recubierta con un anticuerpo monoclonal de ratón que se une específicamente al C4a humano, (2) un anticuerpo C4a antihumano monoclonal de conjugado de peroxidasa de rábano (HRP), y (3) un sustrato cromogénico.

En el paso 1, los estándares, controles y muestras de ensayo se añaden a los pocillos de microensayo prerrevestidos con un anticuerpo monoclonal C4a específico. El C4a, pero no el C4 ni los demás productos de activación de complementos, presente en las muestras se une al anticuerpo monoclonal anti-C4a inmovilizado. Después de la incubación, un ciclo de lavado elimina el material no unido.

En el paso 2, el anticuerpo C4a antihumano monoclonal de conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade a cada pocillo de ensayo. El anticuerpo C4a antihumano de conjugado de enzima se une al C4a capturado en los pocillos de microensayo. Después de la incubación, un ciclo de lavado elimina el material no unido y el exceso de conjugado.

En el paso 3, se añade un sustrato de enzima cromogénico a cada pocillo de microensayo. El conjugado HRP unido reacciona con el sustrato y forma un color azul. Después de la incubación, la reacción enzimática se detiene químicamente, el color cambia a amarillo, y la intensidad del color se mide espectrofotométricamente a 450 nm. La intensidad del color de la mezcla de reacción es proporcional a la concentración de C4a presente en las muestras, estándares y controles.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

96 ensayos para el fragmento C4a de la proteína del complemento, C4

El kit de inmunoensayo enzimático MicroVue C4 contiene lo siguiente:

- | | | | |
|----------|---|-------------------------|-------------------------|
| A | Estándares C4a | Cód. 5204 – 5208 | 1,5 ml cada uno |
| B | Listo para usar. Cada uno contiene la proteína purificada nativa C4a humana con una concentración | | |
| C | de proteínas asignada (ng/ml), estabilizantes proteínicos | | |
| D | | | |
| E | | | |
| L | Control bajo de C4a | Cód. 5209 | 1,5 ml |
| | Listo para usar. Contiene la proteína purificada nativa C4a humana con una concentración asignada (ng/ml), estabilizantes proteínicos | | |
| H | Control alto de C4a | Cód. 5210 | 1,5 ml |
| | Listo para usar. Contiene la proteína purificada nativa C4a humana con una concentración asignada (ng/ml), estabilizantes proteínicos | | |
| 1 | Placa de microensayo | Cód. 5198 | 12 unidades |
| | Tiras fraccionables de ocho pocillos recubiertas de anticuerpo monoclonal murino específico para C4a humano en recipiente de aluminio resellable | | |
| 2 | Solución de parada | Cód. A9947 | 12 ml |
| | Contiene 1N (4%) de ácido hidroclicórico | | |
| 3 | Solución de lavado concentrada 20X | Cód. A9957 | 50 ml, 2 de cada |
| | Contiene solución salina tamponada con fosfato (PBS), Tween-20® al 1,0% y ProClin® 300 al 0,035% | | |
| 4 | Diluyente de muestras | Cód. A3670 | 50 ml |
| | Contiene PBS, Tween-20 al 0,05%, Estabilizadores proteínicos al 2,5% y ProClin 300 al 0,035% | | |
| 5 | Sustrato TMB | Cód. 5059 | 12 ml |
| | Listo para usar. Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) | | |
| 6 | Conjugado | Cód. 5211 | 12 ml |
| | Contiene anticuerpo C4a antihumano monoclonal de conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) suspendido en tampón de estabilización HRP con conservante | | |

Tween-20® es una marca comercial registrada de ICI Americas Inc.

ProClin® es una marca comercial registrada de Rohm and Haas Company.

MATERIALES NECESARIOS, PERO NO INCLUIDOS

- Temporizador (de 60 minutos)
- Placas de microensayos sin usar y limpias, placa de dilución de 96 pocillos y/o tubos de test y portatubos
- Recipiente para la solución del tampón de lavado
- Botella para lavado u otro sistema homologado de lavado para inmunoensayos
- Micropipetas y puntas de pipetas estériles y desechables
- Pipeta multicanal ajustable (8 o 12 canales) o micropipetas de repetición
- Pipetas limpias, 1 ml, 5 ml y 10 ml
- Depósitos de reactivos para agregar conjugado, sustrato y soluciones de parada a la placa (use depósitos limpios y sin usar para cada reactivo)
- Lector de placas apto para valores de densidad óptica de A₄₅₀ entre 0.0 y 3.0
- Agua desionizada o destilada

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Trate las muestras como material de posible riesgo biológico. Siga las precauciones universales cuando manipule componentes de este kit o muestras de pacientes.
- Use los reactivos como una unidad integral antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.
- Almacene los reactivos como se indica.
- No use las tiras recubiertas si la bolsa está perforada.
- El ProClin 300 se usa como conservante. El contacto accidental o la ingestión de tampones o reactivos que contengan ProClin puede causar irritación de la piel, ojos o boca. Aplique prácticas de laboratorio recomendadas para reducir la exposición. Busque atención médica en caso de experimentar algún síntoma.
- La solución de parada se considera corrosiva y puede causar irritación. No se debe ingerir. Evite el contacto con los ojos, piel y ropa. En caso de contacto, lave inmediatamente el área afectada con agua. En caso de ingestión, avise a un médico.
- Cada unidad de donante utilizada para preparar los estándares y controles se ha comprobado por un método aprobado por la FDA para detectar la presencia de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH 2) y el virus de la hepatitis C, así como para el antígeno superficial de la hepatitis B. Debido a que ningún método puede garantizar la ausencia total de agentes infecciosos, estos reactivos deben manipularse a un nivel de bioseguridad 2 como recomienda para cualquier suero humano o muestra de sangre potencialmente infecciosa el manual de los Centers for Disease Control/National Institutes of Health (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories).¹⁸
- Se recomienda el uso de pipetas multicanal o una pipeta de repetición para asegurar la dispensación adecuada de los reactivos.
- Para una medición exacta de las muestras, añada las muestras y estándares de forma precisa. Pipetee cuidadosamente usando sólo material calibrado.
- La obtención y la conservación adecuadas de las muestras son esenciales para la exactitud de los resultados (véase *MANIPULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA*).
- Evite la contaminación microbiana o cruzada de muestras y reactivos.
- Compruebe cada muestra por duplicado.
- No use ningún pocillo para más de una prueba.
- El uso de tiempos y temperaturas de incubación que no sean los indicados en la sección Procedimiento puede dar resultados erróneos.
- El sustrato TMB tiene que estar protegido de la luz y del contacto con materiales metálicos o de goma durante el almacenamiento y la incubación. Evite el contacto con los ojos, piel y ropa. En caso de contacto, lave inmediatamente el área afectada con agua.
- No permita que se sequen los pocillos del microensayo una vez empezado el ensayo.
- Cuando saque el líquido de los pocillos de microensayo, no raspe ni toque el fondo de los pocillos.
- Las muestras inactivadas por calor, hiperlipémicas o contaminadas pueden dar resultados erróneos.
- Para evitar la formación de aerosoles durante el lavado, utilice un aparato para aspirar el líquido de lavado al interior de un frasco que contenga lejía de uso doméstico.
- Utilice una botella para lavado o un dispositivo de llenado automático para lavar la placa (PROCEDIMIENTO DE ENSAYO, paso 6). Para obtener los mejores resultados, no utilice una pipeta multicanal para lavar la placa de microensayo.
- La prueba debe realizarse en una zona que disponga de la ventilación adecuada.
- Deseche los envases y contenido no utilizado conforme a los requerimientos locales, estatales y federales reglamentarios.
- Vista preferentemente ropa protectora, guantes y protección para ojos/cara cuando esté manipulando los componentes del kit.
- Lavarse bien las manos después de manipular el kit.

- Para obtener información adicional sobre símbolos de peligro, seguridad, manipulación y eliminación de los componentes de este kit, consulte la Ficha de datos de seguridad (*Safety Data Sheet, SDS*) que se encuentra en quidel.com.

ALMACENAMIENTO

Conserve el kit sin abrir a 2°C a 8°C.

INDICACIONES DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

El enturbamiento o la decoloración de la solución de lavado diluida indica un deterioro de este reactivo. Si se produce cualquiera de estas dos condiciones, la solución debe desecharse.

MANIPULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Manipule y deseche todas las muestras utilizando las precauciones universales.

Todas las manipulaciones de las muestras deben hacerse a 2°C a 8°C.

Colección de muestras

Suero/plasma

Debido a la activación del complemento que se produce durante la coagulación, la concentración de C4a en muestras de suero humano normal será mayor que la concentración obtenida con las muestras de plasma EDTA. Por consiguiente, es posible que los niveles de C4a en plasma EDTA representen con más precisión las concentraciones *in vivo*.

El fragmento C4a es propenso a la proteólisis en las muestras obtenidas o conservadas inadecuadamente y se puede generar C4a en las muestras que no se manejen adecuadamente a través de la activación del complemento artefacto; por lo tanto, la obtención, conservación y manipulación adecuadas de las muestras es esencial.¹⁹ Para obtener resultados óptimos en plasma, se recomienda utilizar tubos de obtención K2 o K3 EDTA.

Las muestras de suero y de plasma EDTA deben recogerse de forma aséptica usando las técnicas estándar.²⁰ Las muestras deben analizarse de inmediato o guardarse en hielo durante no más de cuatro horas antes del análisis.

Si la muestra no se puede analizar en el plazo de las cuatro horas indicadas, debe congelarse a –70°C o a menos temperatura.

Descongelación de las muestras

Para minimizar el tiempo de manipulación de las muestras, prepare una placa de dilución (o tubos) y añada la cantidad apropiada de diluyente (como se describe en la sección Dilución de la muestra) antes de descongelar las muestras para su evaluación.

Descongele las muestras congeladas rápidamente a 37°C. Transfiera las muestras descongeladas inmediatamente al hielo, para evitar la activación del complemento antes de la dilución. No mantenga las muestras en hielo durante más de cuatro horas. No deje las muestras a 37°C, porque se podría producir la activación del complemento. No descongele muestras a temperatura ambiente o en hielo, ya que esto puede conducir a la activación del complemento y afectar el resultado de la prueba. Las muestras deben analizarse lo antes posible después de su descongelación. Se pueden llevar a cabo hasta cinco ciclos de descongelación sin afectar a las muestras. Si las muestras necesitan congelación adicional para su posterior análisis, Quidel sugiere congelar varias alícuotas de la muestra para no superar el número recomendado de ciclos de congelación/descongelación.

Dilución de las muestras

ADVERTENCIA: Trate todas las muestras como potencialmente infecciosas. Use las precauciones universales. No use muestras inactivadas por calor, contaminadas o conservadas inadecuadamente.

NOTA: Consulte en Descongelación de las muestras las notas importantes sobre los métodos adecuados para descongelarlas. La manipulación adecuada de las muestras es esencial para obtener resultados precisos.

Las muestras deben diluirse para que los valores observados estén por encima del límite inferior de cuantificación (LLOQ) sin rebasar el límite superior de cuantificación (ULOQ). Las muestras con lecturas fuera de este intervalo deben volver a analizarse con una nueva dilución.

Prepare una dilución apropiada (vea la sección siguiente) de cada muestra con el diluyente de muestras. Mezcle suavemente cada dilución para evitar la formación de espuma y burbujas. No guarde ni reutilice las muestras diluidas.

Plasma

La dilución recomendada para muestras de plasma con diluyente de muestras es de 1:40. Realice la dilución de la siguiente manera:

10 µl de muestra + 390 µl de diluyente de muestras

Suero

La dilución recomendada para muestras de suero con diluyente de muestras es de 1:80. Realice la dilución de la siguiente manera:

10 µl de muestra + 790 µl de diluyente de muestras

Las muestras con altos niveles de activación del complemento pueden requerir diluciones mayores que las indicadas.

Agregue muestras diluidas a los pocillos de microvaloración

Complete la adición de muestras diluidas en los pocillos de microvaloración dentro de los 15 minutos siguientes a la aplicación de la primera muestra.

Se puede usar cualquiera de los dos métodos para añadir las muestras diluidas, estándares, controles y tampones a los pocillos (consulte el Paso 4 de PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO). Para series de ensayos donde se analizan pocas muestras, los reactivos y muestras diluidas pueden añadirse directamente al pocillo asignado con micropipeta (100 µl/pocillo). Para series pequeñas o grandes, pero especialmente para las grandes, Quidel recomienda el uso del procedimiento de “placas de réplicas” descrito a continuación para cargar las normas, controles y muestras diluidas en los pocillos de microensayo lo más rápidamente posible.

Use una pipeta multicanal para añadir 120 µl a 130 µl de cada solución a pocillos individuales en una placa en blanco (no incluida) correspondiente al patrón de enzoinmunoanálisis final deseado. Cuando todas las soluciones del test se hayan añadido a los pocillos de microensayo de la placa en blanco, transfiera con rapidez 100 µl de cada pocillo en blanco a los pocillos recubiertos de anticuerpos, utilizando una micropipeta multicanal. Para evitar la posibilidad de contaminación cruzada, las puntas de pipeta se deben cambiar cada vez que hay un cambio en la composición de las muestras a transferir.

El procedimiento de “placas de réplicas” puede usarse también para añadir las soluciones de conjugado, sustrato y de parada.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos y materiales deben situarse a 15°C a 27°C antes de su uso.

Después de retirar los reactivos y materiales necesarios, devuelva los artículos no utilizados a sus temperaturas de conservación adecuadas (vea CONSERVACIÓN).

Tiras de microensayo

Determine el número de tiras necesarias para el ensayo. Quidel recomienda comprobar los pocillos en blanco, estándares y controles por duplicado. Saque las tiras que no sean necesarias y colóquelas en la bolsa de almacenamiento, cierre la bolsa y devuélvala a 2°C a 8°C. Sujete las tiras a usar en el ensayo en una placa de ensayo.

Solución de lavado

Mezcle el concentrado de solución de lavado 20X invirtiendo el frasco varias veces. Si el concentrado de solución de lavado 20X se ha conservado a 2°C a 8°C, es posible que se hayan formado cristales. Para disolver los cristales, caliente el frasco en baño maría a 37°C a 50°C hasta que se disuelvan, y siga mezclando bien. Prepare la Solución de Lavado diluyendo el contenido completo de una de las botellas de concentrado de solución de lavado 20X hasta un litro con agua destilada o desionizada. Mezcle bien. La solución de lavado es estable durante 30 días cuando se conserva en un recipiente limpio, a 2°C a 8°C. Si se produce decoloración o enturbiamiento, deseche el reactivo.

Estándares y controles

Los estándares y controles se suministran listos para usar y no necesitan dilución ni preparación.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Lea todo el prospecto del producto antes de comenzar el ensayo.

Consulte ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES y PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

1. Registre las posiciones de los pocillos del microensayo correspondientes al (a los) pocillo(s) en blanco, todas las muestras de prueba, estándares y controles, así como los números de lote indicados en las etiquetas de las ampollas. Etiquete una de las esquinas de la placa de microensayo para su orientación.
2. Prepare las tiras de microensayo como sigue:
 - a. Rehidrate los pocillos de microensayo añadiendo aproximadamente 300 µl de solución de lavado a cada pocillo, con una botella para lavado o un dispositivo de llenado automático.
 - b. Incube a 15°C a 27°C durante 2 minutos.
 - c. Extraiga el líquido de cada pocillo.
 - d. Añada aproximadamente 300 µl de solución de lavado a cada pocillo.
 - e. Extraiga el líquido de cada pocillo.
 - f. Repita los pasos d-e una vez más para completar un total de tres lavados.**
 - g. Invierta la placa y déle dos golpes secos sobre papel absorbente para sacar todo el líquido residual.
3. Seleccione uno o más pocillos para servir como blanco. Añada 100 µl de diluyente de muestras al (a los) pocillo(s) que piense utilizar como blanco(s) del lector de placas.
4. Añada 100 µl de estándares, controles o muestras diluidas en los pocillos asignados por duplicado. Debe cargarse toda la placa durante los 15 minutos siguientes a la carga de la primera muestra sobre la placa.
5. Incube a 15°C a 27°C durante 60 ± 5 minutos.
6. Lave los pocillos de microensayo un total de cinco veces mediante el siguiente procedimiento:
 - a. Aspire el contenido de cada pocillo.
 - b. Utilizando una botella para lavado o un dispositivo automático de lavado de placas, añada aproximadamente 300 µl de solución de lavado a cada pocillo.
 - c. Incube los pocillos durante un minuto a 15°C a 27°C.
 - d. Aspire el contenido de cada pocillo.
 - e. Invierta la placa y déle golpes secos sobre papel absorbente para sacar todo el líquido residual.

- f. Añada aproximadamente 300 µl de solución de lavado a cada pocillo.
 - g. aspire el contenido de cada pocillo.
 - h. Invierta la placa y déle golpes secos sobre papel absorbente para sacar todo el líquido residual entre cada lavado.
 - i. **Repita los pasos f-h cuatro veces más para completar un total de cinco lavados.**
 - j. Después del quinto ciclo de lavado, invierta la placa y déle golpes secos sobre papel absorbente para sacar todo el líquido residual.
7. Usando una pipeta de repetición o multicanal, dispense 100 µl de conjugado C4a en cada pocillo lavado, incluido(s) el (los) pocillo(s) en blanco.
 8. Incube las tiras de microensayo a 15°C a 27°C durante 60 ± 5 minutos.
 9. Lave los pocillos de microensayo después de la incubación de 60 minutos (paso 8), como se describe en el *PROCEDIMIENTO DE ENSAYO*, paso 6.
 10. Inmediatamente después del lavado, añada 100 µl de la solución de sustrato TMB en cada pocillo, blanco(s) incluido(s).
 11. Incube las tiras de microensayo a 15°C a 27°C durante 15 ± 1 minutos.
 12. Añada 100 µl de la solución de parada a cada pocillo para detener la reacción enzimática. La solución de parada debe añadirse a los pocillos en el mismo orden y en la misma proporción que la solución de sustrato.
 13. Golpee suavemente la placa sobre la mesa de trabajo para dispersar la evolución del color completa y uniformemente. **NOTA: Los resultados óptimos se obtienen usando la función de mezclado automático (si existe) del lector de placa inmediatamente antes de la lectura.**
 14. Determine la absorbancia a 450 nm para cada pocillo de prueba dentro de los 30 minutos siguientes a la adición de la solución de parada (paso 12), realizando la corrección en blanco de acuerdo con el sistema espectrofotométrico en uso.
 15. Determine la concentración de las muestras y controles a partir de la curva estándar.
 16. Deseche las muestras diluidas restantes, sustrato y tiras de microensayo usadas (*vea ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES*).

CONTROL DE CALIDAD

El certificado de análisis incluido en este kit es específico del lote y debe usarse para comprobar que los resultados obtenidos por su laboratorio son similares a los logrados por Quidel Corporation. Los valores de densidad óptica indicados se deben usar solamente a modo de orientación. Los resultados de su laboratorio pueden ser diferentes.

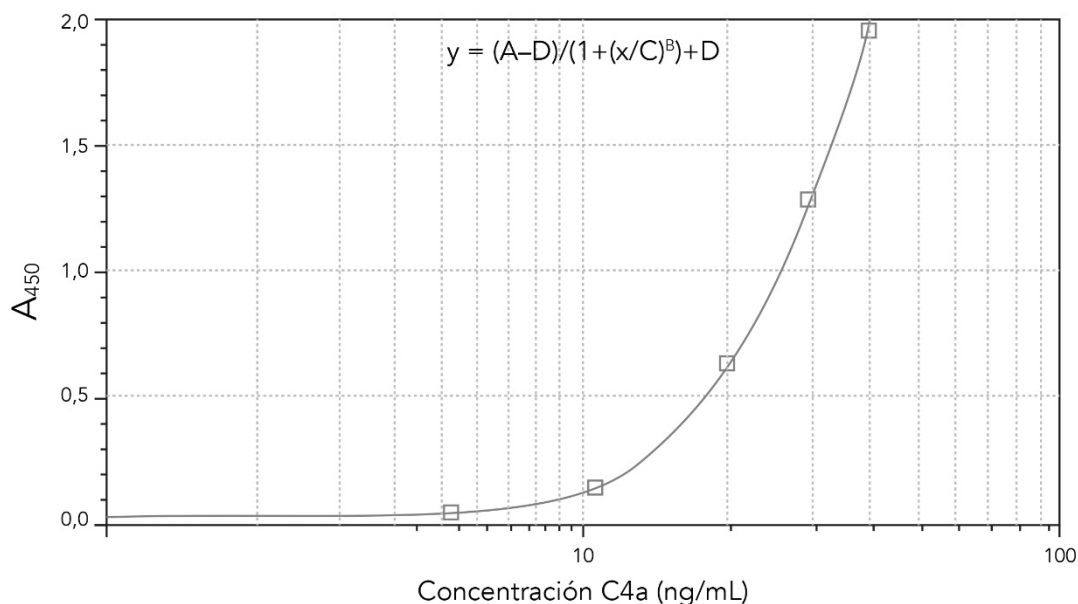
Se proporcionan intervalos de control de calidad. Los valores de control están diseñados para verificar la validez de la curva y los resultados de la muestra. Cada laboratorio debe establecer sus propios parámetros para los límites de análisis aceptables. Si los valores de control NO están dentro de los límites de aceptación de su laboratorio, los resultados del análisis deben considerarse dudosos, y las muestras se deben repetir.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Uso de la curva estándar: La curva estándar para el enzimoimmunoanálisis C4a se genera usando los valores A_{450} para cada estándar, previa sustracción del valor del blanco (en el eje Y) y la concentración asignada a cada estándar C4a (en el eje X). Después de la regresión de 4 parámetros, la curva estándar generada debe cumplir con los requisitos de validación (mostrados a continuación). La mayoría del software de lectura de placas y los ordenadores son capaces de realizar estos cálculos.

No obstante, los datos también pueden representarse manualmente en un gráfico y los valores (ng/ml) de las muestras de prueba pueden leerse directamente en la línea de ajuste óptimo de la curva estándar. Ejemplo de una curva estándar típica (Figura 1).

Figura 1
Curva estándar representativa



Muestra	A ₄₅₀	ng/ml
Estándar A	0,05	5,19
Estándar B	0,179	10,51
Estándar C	0,657	20,29
Estándar D	1,301	29,57
Estándar E	1,956	40,34

Cálculo de la concentración de C4a real en muestras de prueba

La concentración real de C4a presente en cada muestra sin diluir se determina multiplicando la concentración de C4a en ng/ml, determinada a partir de la curva estándar del kit, por la recíproca del factor de dilución de la muestra que se utilice.

Si los valores A₄₅₀ de una muestra de prueba determinada son mayores que los valores del estándar más alto (E), los resultados deben considerarse “mayores que” la concentración C4a del estándar más alto (E) multiplicada por el factor de dilución de la muestra. Si se necesita un valor de concentración de C4a más preciso, la muestra de prueba se debe volver a analizar con un factor de dilución mayor. En todos los ensayos repetidos, también se deben ejecutar los estándares y los controles C4a.

VALIDACIÓN

coeficiente de correlación (r): $\geq 0,98$
Blanco: $\leq 0,150$

Consulte en las etiquetas de las ampollas o en el Certificado de Análisis del producto la media de los intervalos de concentración de C4a aceptables para los controles alto y bajo.

LIMITACIONES

El inmunoensayo enzimático MicroVue C4a se ha utilizado para analizar muestras recogidas como suero, o como plasma en EDTA K2 o K3. No se recomienda el uso de plasma citratado o plasma de heparina en el

ensayo MicroVue C4a, puesto que producirían resultados erróneos. No se han analizado otros anticoagulantes.

VALORES OBSERVADOS

Se analizó plasma EDTA y suero de donantes normales 32 y 44, respectivamente, mediante el kit de inmunoensayo enzimático MicroVue C4a. Los resultados son los siguientes.

Muestra	n	Media (ng/ml)	Intervalo (ng/ml)
EDTA-plasma	32	1694,65	383,50 a 8168,17
Serum	44	1098	20,92 a 4437,24

NOTA: El comportamiento de media y de desviación estándar (SD) de las concentraciones de fragmentos C4a determinado para las muestras de suero o plasma puede variar entre unos y otros laboratorios. Por lo tanto, se recomienda que cada laboratorio determine los valores de concentración media de fragmentos C4a y de desviación estándar de las muestras.

FUNCIONAMIENTO DEL ENSAYO

Límites

LOD: El límite de detección (LOD) para el enzimoimmunoanálisis C4a es de 0.29 ng/ml, determinado por el límite superior de 3SD en un estudio de estándar cero.

LLOQ: El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para el enzimoimmunoanálisis C4a es 5.0 ng/ml, que es la concentración más baja de la curva estándar acorde con los criterios de exactitud y precisión del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

ULOQ: El límite superior de cuantificación (ULOQ) para el enzimoimmunoanálisis C4a es 61 ng/ml, que es la concentración más alta de la curva estándar acorde con los criterios de exactitud y precisión del CLSI.

Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias fueron probadas en el enzimoimmunoanálisis C4a y se constató que no interfieren con el ensayo utilizando muestras de plasma o suero:

Sustancia	Concentración
Bilirrubina	40 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Triglicéridos	3000 mg/dL
Glucosa	1000 mg/dL
Colesterol	500 mg/dL
Albúmina	6000 mg/dL
Globulina gamma	6000 mg/dL
EDTA	10 mM
Heparina	3 U/ml

Precisión

Se determinó la precisión en una misma prueba y entre dos pruebas analizando 20 réplicas de una muestra de plasma y una muestra de suero en 10 pruebas diferentes.

Muestra	C4a (ng/ml)	Intra-ensayo ¹ C.V. (%)	Inter-ensayo ² C.V. (%)
Plasma EDTA	833,9	3,7%	4,4%
Suero	1941,5	4,3%	4,0%

¹n = 20 réplicas ²n = 10 pruebas

Linealidad

La linealidad se comprobó diluyendo muestras con diluyente de muestras y comparando los valores obtenidos con los valores previstos. A continuación se muestran los resultados típicos.

Muestra	Factor de dilución	C4a observado (ng/ml) ³	C4a previsto (ng/ml) ³	Recuperación (%)
Plasma EDTA	60	35,27	35,27	100%
	80	27,247	26,45	103%
	100	21,678	21,16	102%
	120	18,156	17,64	103%
Suero	80	23,657	23,657	100%
	95	20,331	19,92	102%
	110	17,743	17,21	103%
	125	15,885	15,14	105%

³Factor de dilución no incluido.

Recuperación de picos

La recuperación de picos se realizó mediante la adición de una cantidad conocida de C4a purificada a las muestras y comparando los valores observados con los valores previstos.

Muestra	C4a (ng/ml)	Pico (ng/ml)	Resultado (ng/ml)	Recuperación (%)
Plasma 1	899,598		1211,02	92%
Plasma 2	996,199	416,91	1288,55	91%
Plasma 3	902,898		1257,25	95%
Suero 1	1000,298		1526,67	84%
Suero 2	1522,56	807,258	2090,01	90%
Suero 3	675,658		1570,40	106%

ASISTENCIA

Para los servicios fuera de Estados Unidos, diríjase a su distribuidor local. Para más información sobre Quidel, sus productos y distribuidores, consulte la página web quidel.com.

REFERENCIAS

1. Moon K.E., Gorski J.P., Hugli T.E. 1981. "Complete primary structure of human C4a anaphylatoxin." *J BIOL CHEM* 256(16):8685-8692.
2. Gorski J.P., Hugli T.E., Muller-Eberhard H.J. 1979. "C4a: The third anaphylatoxin of the human complement system." *PROC NATL ACAD SCI (USA)* 76(10):5299-5302.
3. Gorski J.P., Hugli T.E., Muller-Eberhard H.J. 1981. "Characterization of human C4a anaphylatoxin." *J BIOL CHEM.* 256(6):2707-2711.
4. Hugli, T.E. 1986. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *COMPLEMENT* 3:111-27.

5. Fukuoka Y, Xia H-Z, Sanchez-Nunoz L.B., Dellinger A.L., Escribano L., Schwartz L.B. 2008. "Generation of anaphylatoxins by human β -Tryptase from C3, C4, and C5." *J IMMUNOL*. 180:6307-6316.
6. Mateja M.M., Korosec P., Kern I., Flezar M., Suskovic S., Sorli J. 2004. "Complement factors C3a, C4a, and C5a in chronic obstructive pulmonary disease and asthma." *AM J RESPIR CELL MOL BIOL*. 31:216-219.
7. Lee S-H, Rhim T., Choi Y-S, Kim S-H, Cho S-Y, Paik Y-K, Park C-S. 2006. "Complement C3a and C4a increased in plasma of patients with aspirin-induced asthma." *AM J RESPIR CRIT CARE MED*. 173:370-378.
8. Hass P-J, van Strijp J., 2007. "Anaphylatoxins: Their role in bacterial infection and inflammation." *IMMUNOL RES*. 37(3):161-175.
9. Abou-Ragheb H.H.A., Williams A.J., Brown C.B., Milford-Ward A. 1992. "Plasma levels of the anaphylatoxins C3a and C4a in patients with IgA nephropathy/Henoch-Shonlein nephritis." *NEPHRON* 62:22-26.
10. Tsuruta T., Yamamoto T., Matsubara S., Nagasawa S., Tanase S., Tanaka J., Takagi K., Kambara T. 1993. "Novel function of C4a anaphylatoxin: Release from monocytes of protein which inhibits monocyte chemotaxis." *AM J PATHOL* 142(6):1848-1857.
11. Wild G., Watkins J., Milford-Ward A., Hughes P., Hume A., Rowell N.R. 1990. "C4a anaphylatoxin levels as an indicator of disease activity in systemic lupus erythematosus." *CLIN EXP IMMUNOL* 80:167-170.
12. Ingram G., Hakobyan S., Robertson N.P., Morgan B.P. 2010. "Elevated plasma C4a levels in multiple sclerosis correlate with disease activity." *J NEUROIMMUNOL*. 223:124-127.
13. Olu K., Atsumi T., Bohgaki M., Amengual O., Kataoka H., Horita T., Yasuda S., Koike T. 2009. "Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome." *ANN RHEUM DIS*. 68:1030-1035.
14. Nyakoe N.K., Taylor R.P., Makumi J.N., Waitumbi J.N. 2009. "Complement consumption in children with Plasmodium falciparum malaria." *MALARIA J*, 8:7-15.
15. Marcheix B., Carrier M., Martel C., Cossette M., Pellerin M., Bouchard D., Perrault L.P. 2008. "Effect of pericardial blood processing on postoperative inflammation and the complement pathways." *ANN THORAC SURG*. 85:530-535.
16. Shoemaker R.C., Giclas P.C., Crowder C., House D., Glovsky M.M. 2008. "Complement split products C3a and C4a are early markers of acute lyme disease in tick bite patients in the United States." *INT ARCH ALLERGY IMMUNOL* 146:255-261.
17. Stricker R.B., Savely V.R., Motanya N.C., Giclas P.C. 2008. "Complement split products C3a and C4a in chronic lyme disease." *SCAND J IMMUNOL*. 69:64-69.
18. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 2007. *BIOSAFETY IN MICROBIOLOGICAL AND BIOMEDICAL LABORATORIES (BMBL) 5TH EDITION*. Washington: U.S. Government Printing Office. <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>.
19. Mollnes, T.E., P. Garred, and G. Bergseth. 1988. Effect of time, temperature and anticoagulants on *in vitro* complement activation: Consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *CLIN EXP IMMUNOLOGY*. 73:484-88.
20. Centers for Disease Control. 1987. "Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings." *MMWR*. 36 (suppl. No. 2S):001.

REF

A036 – MicroVue C4a Fragment EIA Kit

IVD





MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA036001ES00 (04/19)

GLOSARIO

REF

Número del catálogo



Marca CE de conformidad

EC REP

Representante autorizado
en la Comunidad Europea

LOT

Código de lote



Fecha de caducidad



Fabricante



Limites de temperatura



Indicaciones



Consulte los instrucciones
e-etiquetado de uso



Riesgo biológico

IVD

Para uso diagnóstico *in vitro*



Contiene una cantidad suficiente para
96 determinaciones

CONT

Contenido / Contiene

CONTROL

Control
