

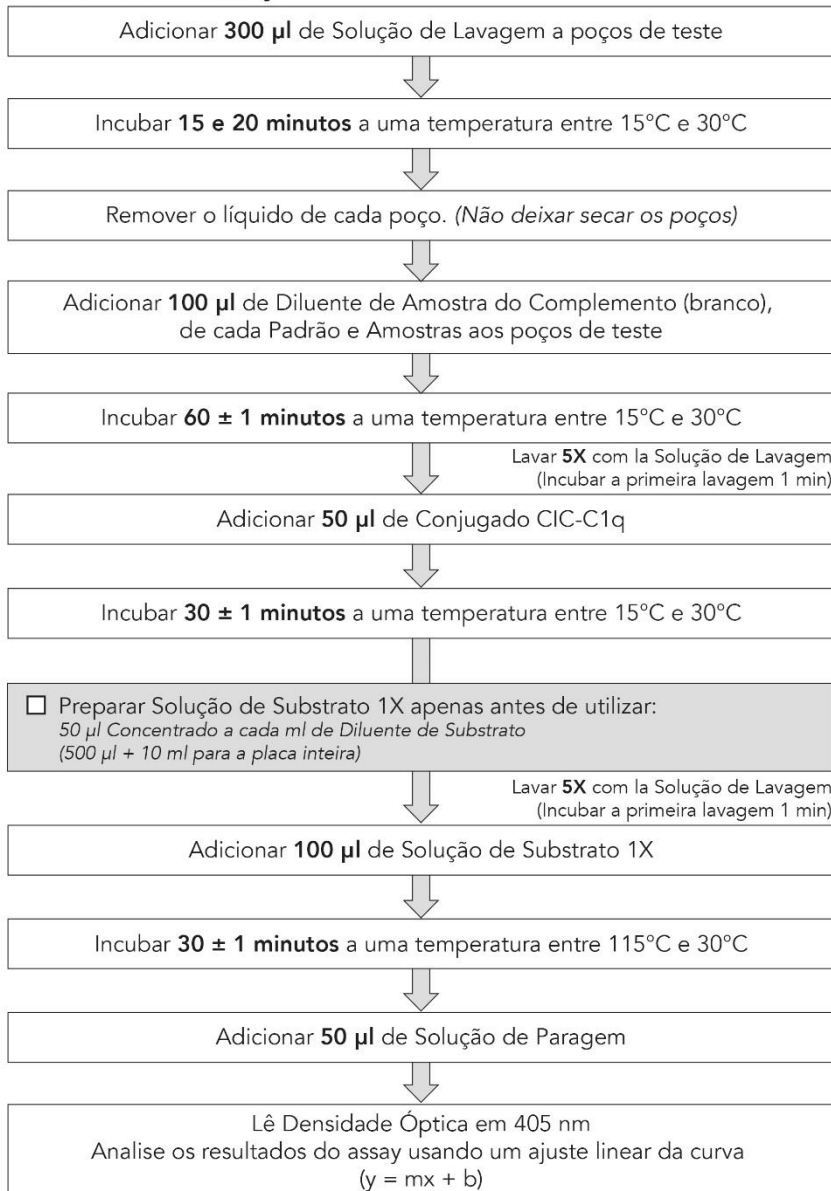
Para a detecção de complexos imunes no soro ou plasma humano

SUMÁRIO

Preparação do Reagent e da Amostra

- Diluir la Concentrado de Solução de Lavagem 1:20 com água desionizada.
- Cada Padrão deve ser reconstituído com 2,0 ml de Reagente Hidratante, misturra completamente e incubar por 15 minutos. (São estáveis a 30 dias.)
- Diluir as Amostras 1:50 com el Diluente de Amostra do Complemento (10 μ l + 490 μ l).

Procedimiento del ensayo





FINALIDADE

O imunoenensaio enzimático de CIC-C1q da MicroVue destina-se à detecção dos complexos imunes em plasma ou soro humanos.

RESUMO E EXPLIÇÃO

A importância dos complexos imunes circulantes (CIC) e a respectiva relação com várias patologias tem sido o objecto de investigação há vários anos. A formação de complexos imunes é um processo de protecção permanente e, normalmente, benigno de um sistema imunitário de funcionamento normal. Os CIC são removidos da circulação no hospedeiro normal através de um número de processos bioquímicos, enzimáticos e celulares complexos. Fulcral para a eliminação de muitos CIC é a activação da via clássica do complemento.

No entanto, em certas condições patológicas que estão longe de ser compreendidas, os complexos imunes podem iniciar lesões de vários órgãos e tecidos dependentes do complemento. Esta activação do complemento pode iniciar uma série de eventos potencialmente destrutivos no hospedeiro, incluindo a produção de anafilatoxina, lise de células e estimulação leucocitária, assim como a activação de macrófagos e outras células.¹ Quando os complexos imunes se fixam às paredes vasculares ou membranas celulares, pode ocorrer destruição do tecido normal, tal como em alguns casos de glomerulonefrite.

Certas propriedades dos CIC influenciam a sua potencial patogenicidade. De especial importância são: (1) a natureza, o tamanho e a concentração do antigénio; (2) a natureza, o tamanho e a concentração do anticorpo; e, (3) a velocidade de formação e depuração dos complexos imunes.^{1,2}

Os complexos imunes circulantes têm sido medidos numa diversidade de condições: infecções, desordens autoimunes, trauma e doenças proliferativas neoplásicas. Os actuais estudos sugerem que a determinação de CIC pode ser importante na avaliação de certas patologias e, por vezes, na monitorização da eficácia da terapêutica. Isto é especialmente verdade com o lúpus eritematoso disseminado (LED) e algumas formas de artrite reumatóide (AR).^{3,4} Classicamente, o primeiro estado patológico ligado à formação de complexos imunes foi a doença do soro, descrita no início do século XX por von Pirquet. Desde essa altura, têm sido descritos níveis elevados de CIC em doenças autoimunes (LED, síndrome relacionada com LED, AR), glomerulonefrite, doença neoplásica (Hodgkin, leucemia), infecções bacterianas (endocardite bacteriana subaguda [EBS], lepra), infecções parasitárias (malária, esquistossomíase) e infecções virais (hepatite, mononucleose).

Mais de 40 técnicas de ensaio têm sido descritas como capazes de detectar e quantificar os CIC. Vários testes, tais como o ensaio de células Raji, teste de desvio C1q, teste de congulinina, procedimentos de fixação de C1q em fase líquida, ensaio do factor reumatóide, teste de precipitina PEG e ensaios de C1q em fase sólida, têm sido descritos como passíveis de detectar ou quantificar os CIC.^{1,5} Como o tamanho e as propriedades físico-químicas dos CIC variam significativamente, nenhum destes ensaios foi aceite como norma. Um estudo cooperativo patrocinado pela Organização Mundial de Saúde em 1978 determinou que nenhum método individual se revelou eficaz em todos os estados patológicos suspeitos, tendo recomendado que, pelo menos, fossem realizadas duas técnicas de ensaio diferentes para detectar e medir adequadamente os CIC.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O imunoenensaio enzimático de CIC-C1q da MicroVue baseia-se no princípio de que os CIC de fixação do complemento irão ligar-se a proteína humana purificada de C1q imobilizada.

No primeiro passo, são adicionados os padrões e as amostras de soro ou plasma diluídos em diluente de amostra do complemento aos poços de microtitulação revestidos com C1q e incubados. Durante este período de incubação, os complexos imunes que ligam ao C1q formam complexos com os poços do microensaio revestidos com C1q. Para confirmar um resultado CIC positivo, a amostra pode ser diluída em

diluyente de confirmação, que contém uma elevada concentração de sal conhecida por inibir a ligação de CIC a C1q,^{6,7} e depois adicionada aos poços de microtitulação e incubada. Um ciclo de lavagem remove as proteínas de soro não ligadas.

No segundo passo, é acrescentada anti-IgG humana de caprino conjugada a peroxidase de rábano (HRP) a cada poço do teste. Durante esta incubação, o conjugado irá ligar aos complexos imunes que agora estão ligados aos poços do microensaio revestidos com C1q. Um ciclo de lavagem remove o conjugado não ligado.

No terceiro passo, é acrescentado um substrato de enzimas a cada poço de teste. O anticorpo conjugado a HRP ligado reage com o substrato cromogénico formando uma cor verde. Após a incubação, é adicionado um reagente para parar o desenvolvimento da cor.

As absorvâncias (valores A_{405}) dos padrões e amostras de teste são medidas espectrofotometricamente. A intensidade da cor verde é proporcional à quantidade de anticorpos IgG de CIC que ligam a C1q em fase sólida. É gerada uma curva padrão, traçando os valores A_{405} obtidos com cada padrão versus a sua concentração. A concentração dos complexos imunes presentes na amostra de teste é determinada mediante referência à curva padrão. Os resultados são expressos como equivalentes de gamaglobulina humana termicamente agregada por ml ($\mu\text{g Eq/ml}$).

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

O kit EIA de CIC-C1q contém o seguinte:

A	Padrões CIC-C1q	Ref. A9503-A9505	2 cada, 2 ml
B	(liofilizados) Quando reconstituídos, cada um contém uma quantidade conhecida de gamaglobulinas		
C	humanas termicamente agregadas (HAGG) em PBS e 2,5 % de estabilizadores		
1	Placa de microensaio	Ref. A9500	12 de cada
	96 poços com retentor e suporte composto por tiras de oito poços revestidos com proteína humana purificada C1q numa bolsa de papel de alumínio com fecho reutilizável		
2	Solução de paragem	Ref. A3673	6 ml
	Contém 250 mm de ácido oxálico		
3	Concentrado de solução de lavagem 20X	Ref. A9957	2 de cada, 50 ml
	Cada uma contém solução tampão salina concentrada de fosfato (PBS), 1,0 % de Tween-20® e 0,035 % de Proclin® 300		
4	Diluyente de amostra do complemento	Ref. A3670	50 ml
	Contém PBS, 2,5 % de estabilizadores e 0,035 % de Proclin 300		
5	Diluyente de substrato	Ref. A3672	25 ml
	Contém 0,1 m de tampão citrato e 0,05 % de H ₂ O ₂		
6	Concentrado de substrato	Ref. A3671	1,5 ml
	Contém 0,7 % de ácido 2,2'-Azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), persulfato de amónio		
7	Conjugado de CIC-C1q	Ref. A9506	2 de cada, 3 ml
	Anti-IgG humana (caprino) conjugada a peroxidase suspensa em tampão de estabilização de HRP		
8	Reagente de hidratação	Ref. A3675	25 ml
	Contém 0,035 % de Proclin 300		
9	Diluyente de confirmação	Ref. A9511	2 de cada, 10 ml
	Contém PBS, 2,5 % de estabilizadores, 1,2 m NaCl e 0,035 % de Proclin 300		

Tween-20® é uma marca comercial da ICI Americas Inc.
Proclin® é uma marca registada da Rohm and Haas Company.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Cronómetro (de 60 minutos)
- Calculadora ou outro método computacional para validar o ensaio
- Placas de microensaio limpas, não utilizadas, e/ou tubos de ensaio e suportes
- Recipiente para diluição do tampão de lavagem
- Frasco de lavagem ou outro sistema de lavagem para o imunoensaio
- Pipetas multicanal (8 ou 12 canais) ajustáveis ou micropipetas de repetição (opcional)
- Pipetas limpas, 1 ml, 5 ml e 10 ml
- Micropipetas e pontas de pipetas
- Leitor de placas com capacidade de efectuar leituras A_{405} da densidade óptica entre 0,0 e 2,0
- Água desionizada ou destilada

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Para diagnóstico *in vitro*.
- Tratar as amostras como material que possa constituir perigo biológico. Seguir as precauções universais ao manusear o conteúdo deste kit e quaisquer amostras dos doentes.
- Eliminar os recipientes e o conteúdo não utilizado de acordo com os regulamentos locais e nacionais.
- Utilizar os reagentes fornecidos como uma unidade inteira antes da data de validade inscrita na etiqueta da embalagem.
- Utilizar vestuário de protecção, luvas e protecção ocular/facial adequados ao manusear o conteúdo deste kit.
- Conservar os reagentes do ensaio conforme indicado.
- Não utilizar as tiras revestidas se a bolsa estiver perfurada.
- Analisar cada amostra em duplicado.
- O ProClin 300 é utilizado como conservante. O contacto ou ingestão acidental de tampões ou reagentes contendo ProClin pode provocar irritação na pele, nos olhos ou na boca. Seguir as boas práticas laboratoriais para reduzir a exposição. Procurar assistência médica caso se verifiquem estes sintomas.
- Para assegurar o fornecimento atempado dos reagentes, recomenda-se a utilização de pipetas multicanal ou de repetição.
- Para uma medição precisa de amostras, adicionar as amostras e os padrões com precisão. Utilizar a pipeta com cuidado recorrendo apenas a equipamento calibrado.
- A colheita e conservação correctas das amostras de teste são essenciais para a obtenção de resultados precisos (ver *COLHEITA E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS*).
- Evitar a contaminação microbiana ou contaminação cruzada de amostras, reagentes ou materiais. Poderão obter-se resultados incorrectos em caso de contaminação.
- Não usar um poço de microensaio para mais do que um teste.
- Descontaminar todas as amostras, os reagentes e materiais, mergulhando-os durante, no mínimo, 30 minutos numa solução 1:10 de lixívia doméstica (hipoclorito de sódio) ou submetendo-os a autoclave a uma temperatura de 121°C durante 30 minutos a 15 psi.
- A utilização de tempos ou temperaturas de incubação diferentes dos especificados na secção Procedimento pode originar resultados erróneos.
- O concentrado de substrato é sensível à luz. Evitar exposição prolongada a luz brilhante ou directa. Conservar os reagentes no escuro quando não estiverem a ser utilizados.
- Não permitir que os poços do microensaio sequem depois de iniciar o ensaio.
- Ao adicionar ou aspirar líquidos dos poços do microensaio, não raspar nem tocar no fundo dos poços.
- As amostras hiperlipémicas, inactivadas pelo calor ou contaminadas podem produzir resultados erróneos.
- Para evitar a formação de aerossóis durante a lavagem, utilizar um aparelho para aspirar o fluido da lavagem para um frasco com lixívia doméstica.
- Este ensaio pode ser efectuado com qualquer método de lavagem validado.
- 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

Conservar o kit não aberto a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C. Depois de aberto, o concentrado de solução de lavagem 20X e o reagente de hidratação podem ser conservados entre 2 °C e 30 °C.

Depois de seleccionar os reagentes ou os materiais a utilizar no ensaio, permitir que os reagentes não utilizados retomem imediatamente as devidas temperaturas de conservação. Permitir que os reagentes e os materiais atinjam uma temperatura entre 15 °C e 30 °C antes de os utilizar.

INDICAÇÕES DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES

O concentrado de substrato poderá variar na cor, desde incolor a verde pálido ou verde-escuro. Esta condição não terá qualquer influência no desempenho. No entanto, a solução de substrato acabada de preparar deverá apresentar uma cor entre incolor a verde pálido. Uma cor verde-escuro indica que a solução de substrato preparada se deteriorou, deve ser eliminada e que deve ser preparada uma nova solução de substrato num recipiente de vidro limpo.

A turvação ou descoloração da solução de lavagem diluída indica uma deterioração do reagente. Se isto acontecer, eliminar a solução.

COLHEITA E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS

Manusear e eliminar todas as amostras, seguindo as precauções universais.

O ensaio requer, pelo menos, 10 µL de soro ou plasma EDTA. Todas as amostras devem ser colhidas assepticamente e preparadas utilizando técnicas padrão na realização de testes em laboratórios clínicos.⁹ Não inactivar as amostras por calor. Qualquer material particulado deve ser eliminado das amostras, através de centrifugação a baixa velocidade, antes de proceder à realização de testes.

As amostras podem ser armazenadas entre 2 °C e 8 °C durante até 7 dias. Se as amostras forem armazenadas por períodos mais longos, devem ser congeladas a uma temperatura de -20 °C ou inferior, num congelador sem descongelação automática.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Consultar no quadro 1 as quantidades de solução de substrato e as tiras de microensaio necessárias por número de testes. Depois de retirar os reagentes e materiais necessários, voltar a colocar os materiais não utilizados nas respectivas temperaturas de conservação (ver *ARMAZENAMENTO*). **Permitir que todos os reagentes e materiais para o ensaio atinjam uma temperatura entre 15 °C e 30 °C antes de serem utilizados.**

1. Solução de lavagem

Misturar concentrado de solução de lavagem 20X, invertendo o frasco várias vezes. Se o concentrado de solução de lavagem 20X tiver sido conservado entre 2 °C e 8 °C, poderão ter-se formado cristais. Para os dissolver, aquecer o frasco em banho-maria entre 37 °C e 50 °C até à dissolução completa de todos os cristais. Misturar bem. Preparar a solução de lavagem para a lavagem dos poços do microensaio, diluindo todo o conteúdo de um dos frascos de concentrado de solução de lavagem 20X num litro de água destilada ou desionizada. Misturar 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.

2. Selecção das tiras do microensaio

Retirar o retentor de tiras da placa montada. Determinar o número de tiras necessário para o ensaio, consultando o quadro 1. Remover as tiras não necessárias e colocá-las numa bolsa de conservação,

selar a bolsa e conservar a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C. Guardar as tiras a utilizar no ensaio, recolocando devidamente o retentor das tiras na placa de microensaio.

3. Reconstituição dos padrões de CIC-C1q

Adicionar 2,0 ml de reagente de hidratação nos frascos dos padrões A-C. Permitir que os padrões liofilizados rehidratem durante, pelo menos, 15 minutos e, depois, misturar bem. Evitar a formação de espuma ou bolhas durante a mistura. Os padrões reconstituídos mantêm-se estáveis durante 30 dias quando conservados a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C.

4. Diluição de amostras

Atenção: tratar todas as amostras como potencialmente infecciosas. Não utilizar amostras inactivadas pelo calor ou contaminadas. Determinar o número (N) de amostras a testar. Rotular os tubos de ensaio desde o n.º 1 ao n.º N e registar qual a amostra que corresponde a cada tubo na ficha técnica fornecida. Preparar uma diluição numa proporção de 1 a 50 de cada amostra, utilizando o diluente de amostra do complemento (por exemplo, 10 µL de amostra de teste misturado com 490 µL de diluente de amostra do complemento). Misturar bem, contudo, evitando a formação de espuma e bolhas. Não armazenar nem reutilizar amostras diluídas. Se a concentração de complexos imunes medida na amostra for superior à concentração do padrão C e se se pretender um resultado final mais preciso, deve repetir-se o teste à amostra com uma diluição numa proporção 1:200 (quatro vezes a diluição de 1:50). **Nota:** as amostras que apresentaram concentrações medidas de CIC inferiores às do padrão C não devem ser submetidas a maior diluição nem ser novamente testadas.

5. Adição de amostras diluídas aos poços do microensaio

Pode ser utilizado um de dois métodos para adicionar amostras diluídas, padrões, controlos e tampão aos poços. Consultar o passo 3 do procedimento de ensaio. Para a realização de pequenos ensaios em que apenas são testadas algumas amostras, as amostras diluídas e outros reagentes podem ser adicionados directamente nos respectivos poços com uma micropipeta (100 µL/poço). Para grandes ou pequenos ensaios mas, especialmente, para os maiores, deve ser utilizada uma pipeta multicanal para a adição de amostras, tal como é indicado a seguir. **(Este procedimento pode ser convenientemente utilizado para adicionar o conjugado, o substrato, bem como a solução de paragem.)**

Para colocar os padrões, os controlos e as amostras diluídas nos poços do microensaio tão rápido quanto possível, poderá ser empregue um procedimento de “réplica de placas”. Em vez de adicionar 100 µL de cada padrão, controlo ou amostra diluída individualmente nos poços revestidos com C1q, é possível adicionar 120 a 130 µL de cada solução a poços individuais numa placa em branco (não fornecida) correspondente ao padrão final EIA pretendido. Depois de todas as soluções a testar terem sido adicionadas aos poços do microensaio na placa em branco, transferir rapidamente 100 µL de cada poço em branco para os poços revestidos com C1q, utilizando uma micropipeta multicanal. Para evitar a possibilidade de contaminação cruzada, as pontas das pipetas devem ser substituídas sempre que a composição das amostras a transferir for alterada.

6. Diluente de confirmação (opcional)

Caso se pretenda confirmação, determinar o número (N) de amostras a confirmar. Rotular os tubos de ensaios desde o n.º 1c ao n.º Nc e registar quais as amostras que correspondem a cada tubo na ficha técnica fornecida. Preparar a devida diluição (1:50 ou 1:200) utilizando o diluente de confirmação. Uma amostra diluída em diluente de confirmação deve ser processada concomitantemente com a mesma diluição da amostra em diluente de amostra do complemento.

7. Preparação da solução de substrato

Preparar imediatamente antes de utilizar. Determinar o volume necessário de solução de substrato no quadro 1. Preparar a solução de substrato, adicionando 50 µL de concentrado de substrato por ml de diluente de substrato. Misturar bem.

Quadro 1
Requisitos do Ensaio

Poços ¹	Tiras de 8 poços	Solução de substrato necessária (ml)	Diluente de substrato (ml)	Concentrado de substrato (µL)
16	2	1,6	2,0	100
24	3	2,4	3,0	150
32	4	3,2	4,0	200
40	5	4,0	5,0	250
48	6	4,8	5,0	250
56	7	5,6	6,0	300
64	8	6,4	7,0	350
72	9	7,2	8,0	400
80	10	8,0	9,0	450
88	11	8,8	9,0	450
96	12	9,6	10,0	500

¹ Determinar o número de amostras a testar e adicionar sete (7) poços para os três padrões (a testar em duplicado) e um poço em branco. Recomenda-se que os padrões e controlos duplicados sejam testados em tiras de microensaio separadas, sempre que possível.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Ler o folheto informativo completo antes de iniciar o ensaio.

Ver *PREPARAÇÃO DOS REAGENTES* antes de prosseguir.

Segurar firmemente a placa durante o manuseamento, para prevenir a remoção acidental do retentor de tiras.

1. Registrar as posições dos poços correspondentes a todas as amostras de teste e padrões, bem como os números dos lotes indicados nos rótulos dos frascos. Rotular um canto da placa de microensaio para orientação.
2. Preparar as tiras do microensaio do modo a seguir indicado.
 - a. Rehidratar os poços do microensaio, adicionando cerca de 300 µL de solução de lavagem a cada poço, utilizando um frasco de lavagem ou um dispositivo de lavagem de placas.
 - b. Incubar a uma temperatura de 15 °C a 30 °C durante 15 a 20 minutos.
 - c. Remover o fluido dos poços.
 - d. Inverter a placa e bater firmemente duas vezes em papel absorvente para remover restos de fluido.
3. Adicionar 100 µL de diluente de amostra do complemento ao(s) poço(s) que serão utilizados para colocar o leitor de placas em branco.
4. Adicionar 100 µL de cada padrão (A, B, C) de CIC-C1q reconstituído a poços duplicados.
5. Adicionar 100 µL de cada amostra diluída ao respectivo poço de microensaio. Ver *PREPARAÇÃO DOS REAGENTES*, item 5.
6. Incubar a uma temperatura de 15 °C a 30 °C durante 60 ± 1 minutos.
7. Lavar os poços do microensaio do modo a seguir indicado.

NOTA: o procedimento de lavagem de poços do microensaio pode ser feito manualmente ou com um lavador automático de placas.

- a. Após a incubação no passo 6 (e no passo 9 acima) remover o conteúdo de cada poço.
- b. Adicionar cerca de 300 µL de solução de lavagem a cada poço, utilizando um frasco de lavagem ou dispositivo automático de lavagem de placas.
- c. Incubar os poços durante 1 minuto a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C.
- d. Remover o conteúdo de cada poço.

- e. Adicionar cerca de 300 µL de solução de lavagem a cada poço.
 - f. Remover o conteúdo de cada poço.
 - g. Repetir os passos e-f mais três vezes.**
 - h. Após o quinto ciclo de lavagem, inverter a placa e bater firmemente duas vezes em papel absorvente para remover restos de líquido.
8. Utilizando uma pipeta multicanal ou de repetição, colocar 50 µL de conjugado em cada poço de teste lavado, assim como no(s) poço(s) em branco.
 9. Incubar as tiras do microensaio a uma temperatura de 15 °C a 30 °C durante 30 ± 1 minutos. Preparar a solução de substrato durante esta incubação (ver *PREPARAÇÃO DOS REAGENTES*, item 8).
 10. Lavar os poços do microensaio após o período de incubação de 30 minutos (passo 9), tal como é descrito em *PROCEDIMENTO DO ENSAIO*, passo 7.
 11. Imediatamente após o procedimento de lavagem, colocar 100 µL da solução de substrato acabada de preparar em cada poço, incluindo os poços em branco.
 12. Incubar as tiras do microensaio a uma temperatura de 15 °C a 30 °C durante 30 ± 1 minutos.
 13. Adicionar 50 µL de solução de paragem a cada poço para parar a reacção enzimática. A solução de paragem deve ser adicionada aos poços, seguindo a mesma ordem e o mesmo ritmo utilizados para a solução de substrato. Bater levemente na placa para dispersar uniformemente a cor.
 14. Determinar a leitura da absorvância a 405 nm para cada poço de teste, uma hora após a adição da solução de paragem (passo 13), fazendo uma correcção aos itens em branco, em conformidade com o sistema espectrofotométrico utilizado.
 15. Eliminar as restantes amostras diluídas e substrato, bem como as tiras do microensaio utilizadas (ver *ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES*, item 3). Guardar o suporte e retentor de tiras para futura utilização.

MÉTODO DE CONFIRMAÇÃO RECOMENDADO

Caso se pretenda uma confirmação independente de um resultado positivo ou se um resultado positivo for inconsistente com a interpretação clínica, a amostra positiva pode ser analisada através de um teste de confirmação. Não é possível confirmar um resultado negativo. O método de confirmação utiliza um diluente de amostra (o diluente de confirmação), que contém uma elevada concentração de cloreto de sódio.^{6,7} Para confirmar um resultado positivo, deve ser diluída uma alíquota da amostra (1:50 ou 1:200) em diluente de confirmação e uma segunda alíquota em diluente de amostra do complemento. Ambas as amostras são depois analisadas segundo os procedimentos de ensaio de CIC-C1q normais. Consultar mais informações nas secções *PREPARAÇÃO DOS REAGENTES* e *INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS*.

CONTROLO DE QUALIDADE

As boas práticas laboratoriais recomendam que se incluam os controlos positivo e negativo em cada ensaio. Para este fim, a Quidel possui disponíveis os controlos para o ensaio de CIC-C1q da MicroVue (controlos CIC-C1q, ref. A013), devendo estes serem utilizados em conformidade com o folheto da respectiva embalagem.

Para além dos controlos, este ensaio oferece um *MÉTODO DE CONFIRMAÇÃO RECOMENDADO* e *VALIDAÇÃO*.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Cálculos

A curva padrão é gerada utilizando os valores A_{405} com subtração dos valores em branco para cada padrão (no eixo y) e a concentração atribuída a cada padrão (ao longo do eixo x). A curva padrão deve cumprir os requisitos de validação. A maior parte dos computadores e calculadoras são capazes de realizar este cálculo. É apresentado um exemplo de uma curva padrão típica na figura 1.

A concentração de µg Eq/ml para cada amostra é calculada a partir da curva padrão, utilizando a análise de regressão linear. Os valores estimados determinados por referência à curva padrão devem ser avaliados tendo em conta a linha de separação para reações positivas. Ver Interpretação abaixo.

Ajuste do factor de diluição. A concentração de CIC atribuída foi determinada assumindo uma diluição de 1:50 do espécime. Se tiver sido testada uma diluição maior do espécime, o utilizador terá de multiplicar o resultado calculado pelo fator de diluição adequado. Por exemplo, se a diluição do espécime testada foi de 1:200, o resultado calculado tem de ser multiplicado por 4.

Cálculo do teste de confirmação. Para confirmar um resultado positivo, a concentração de complexos imunes [CIC] determinada na amostra diluída em diluente de confirmação é dividida pela concentração de complexos imunes medida na amostra diluída em diluente de amostra do complemento para gerar uma proporção:

$$\text{proporção} = \frac{[\text{CIC}] \text{ em diluente de confirmação}}{[\text{CIC}] \text{ em diluente de amostra do complemento}}$$

Validação

Determinar a inclinação, a intercepção y e o coeficiente de correlação da linha de melhor ajustamento obtida. Os valores devem encontrar-se dentro dos limites indicados a seguir para qualificar o ensaio.

coeficiente de correlação (r): superior a 0,95
inclinação (m): 0,022 a 0,056
intercepção y (b): (-) 0,108 a (+) 0,238

Interpretação

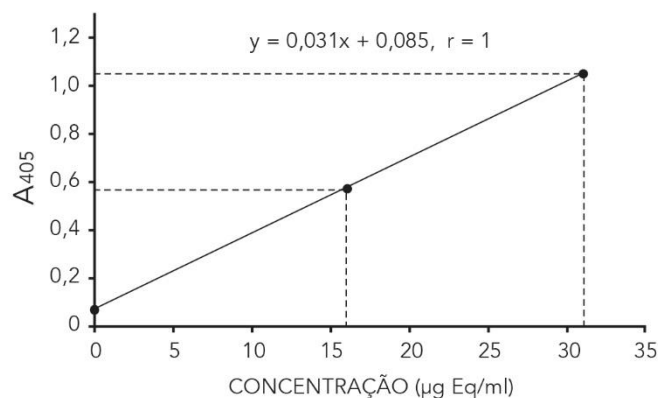
Resultados negativos: os valores inferiores a 4.0 µg Eq/ml são considerados negativos para níveis significativos de CIC.

Resultados positivos: os valores superiores ou iguais a 4.0 µg Eq/ml são considerados positivos para níveis significativos de CIC.

Resultados de confirmação: se a proporção for inferior a 0,7, o resultado positivo de CIC é confirmado. Por outras palavras, uma redução superior a 30 % confirma um resultado positivo.

Ocasionalmente, as amostras positivas poderão não ser confirmadas. A não confirmação das amostras poderá dever-se, entre outras razões, a: (1) amostras incorrectamente manuseadas (por exemplo, contaminadas ou inactivadas pelo calor) ou (2) amostras que possuem auto-anticorpos a C1q. Estas amostras não são necessariamente negativas para CIC. O material que origina o aparente resultado falso positivo poderá encobrir CIC que estejam a ocorrer concomitantemente que, quando presentes sozinhos, originariam um resultado CIC positivo confirmável.

Figura 1
Exemplo de curva padrão



Amostra	(A ₄₀₅)	µg Eq/ml
Padrão A	0,09	0.2
Padrão B	0,57	15.6
Padrão C	1,05	31.1
Amostra 1	0,19	3.4
Amostra 2	0,82	23.7
Amostra 3	0,40	10.2
r = 1,00	m = 0,031	b = 0,085

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

1. As amostras inativadas pelo calor podem produzir resultados falsos positivos. Devido ao facto deste teste medir agregados de IgG humana de uma forma não selectiva, a colheita e o processamento de amostras devem evitar condições que promovam a agregação de IgG.
2. O imunoensaio enzimático de CIC-C1q da MicroVue tem sido utilizado para testar amostras colhidas como soro ou plasma em anticoagulante EDTA. Não foram testados outros anticoagulantes.

VALORES ESPERADOS

Os complexos imunes circulantes (CIC) foram medidos em soro de 312 participantes, utilizando o imunoensaio enzimático de CIC-C1q da MicroVue. Colheram-se cento e seis (106) amostras de soro em participantes normais e assintomáticos. A concentração média de CIC foi de 2,1 µg Eq/ml (D.P. = 1,9).

Foram testadas amostras colhidas em 206 doentes com lúpus eritematoso disseminado (LED), artrite reumatóide (AR) e outras desordens utilizando o imunoensaio enzimático de CIC-C1q da MicroVue e um outro kit EIA disponível no mercado. A concordância geral entre os dois métodos foi de 87 %.

Na população mencionada acima, testaram-se oitenta e um (81) doentes com LED e trinta e três (33) com AR. Os dois kits apresentaram uma concordância de 82 % com estas amostras. Os dados são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2
Dados Comparativos Para Grupos de Doentes Específicos

Resultado do teste MicroVue	-	+	-	+
Resultado do teste alternativo	-	+	+	-
Doentes com AR	18	9	3	3
Doentes com LED	40	23	15	3
Outros	0	90	2	0

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Exactidão

Foi utilizado um padrão de complexos imunes, preparado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) com IgG termicamente agregadas, para padronizar o ensaio. Para testar a exactidão do ensaio, foram testadas cinco diluições do padrão da OMS em triplicado em nove passos do ensaio do kit MicroVue. Determinou-se que os valores do ensaio facultavam uma previsão das concentrações de padrão esperadas (coeficiente de determinação = 0,97).

Compararam-se quarenta e uma (41) amostras de soro e plasma (anticoagulante EDTA) emparelhadas de doentes com LED e AR, visando demonstrar a adequabilidade das amostras de plasma para o ensaio. Não se verificou qualquer diferença significativa entre os resultados do soro e plasma ($\alpha = 0,05$).

Reprodutibilidade

Foram testadas três amostras de soro e três padrões em nove passos de ensaio em três lotes de kits diferentes. Cada padrão foi testado em triplicado em cada passo do ensaio. Cada amostra de soro foi processada num único poço em cada passo. A variação média das amostras e padrões entre cada passo é apresentada no quadro 3 como a variação inter-ensaios. A variação média dos padrões em cada passo é apresentada no quadro 3 como a variação intra-ensaios.

Quadro 3
Reprodutibilidade do Ensaio

	Média (Eq/ml)	D.P. intra-ensaios (% CV)	D.P. inter-ensaios (% CV)
Amostra 1	30	NT	3,1 (10)
Amostra 2	7	NT	2,6 (37)
Amostra 3	0	NT	0,3 (N/A)
Padrão 1	37	3,2 (9)	3,9 (11)
Padrão 2	20	2,1 (10)	1,8 (9)
Padrão 3	0	0,1 (N/A)	0,0 (N/A)

NT = não testada N/A = não aplicável

Sensibilidade

A sensibilidade analítica do imunoensaio enzimático de CIC-C1q da MicroVue é de 1,0 μg Eq/ml.

Especificidade

Cento e seis (106) amostras de soro e plasma colhidas em participantes normais e assintomáticos foram testadas relativamente a CIC. A especificidade geral do ensaio foi de 94 %.

ASSISTÊNCIA

Para serviços fora dos EUA, contactar o distribuidor local. A informações adicionais sobre Quidel, nossos produtos, e nossos distribuidores pode ser encontrada em nosso web site em www.quidel.com.

REFERÊNCIAS

1. McDougal, J.S, McDuffie, F.C., Immune Complexes in Man: Detection and Clinical Significance, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 24, p. 1, 1985.
2. Endo, L., Corman, L.C., Panush, R.S., Clinical Utility of Assays for Circulating Immune Complexes, *Medical Clinics of North America*, Vol. 69, No. 4, p. 623, July 1985.
3. Abrass, C.K., Nies, K.M., Louie, J.S., Border, W.A., Glasscock, R.J., Correlation and Predictive Accuracy of Circulating Immune Complexes with Disease Activity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus, *Arthritis Rheum.*, Vol. 23, p. 273, 1980.
4. Duquesnoy, B., Circulating Immune Complexes and Complement in Rheumatoid Arthritis, *Ann. Biol. Clin.*, Vol. 42, p. 71, 1984.
5. Theofilopoulos, A.N., The Raji, Conglutinin, and Anti-C3 Assays for the Detection of Complement-Fixing Immune Complexes, *Methods in Enzymology*, Vol. 74, p. 511, 1981.
6. Agnello, V., Winchester, R.J., Kunkel, H.G., Precipitin Reactions of the C1q Component of Complement with Aggregated Gamma-Globulin and Immune Complexes in Gel Diffusion, *Immunology*, Vol. 19, p. 909, 1970.
7. Hack, C.E., Huijbregts, C.C., Paardekooper, J., Influence of Ionic Strength, EDTA Concentration, Endogenous C1q and Polyanions on the ¹²⁵I-C1q-Binding Test, *J. Immunol. Meth.*, Vol. 72, p. 197, 1984.
8. Richardson, J.H., Barkley, W.E., *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, p. 11–13, 1984.
9. Davidson, I., et al., *The Blood*, p. 1 20. in Cl. Davidson and J.B. Henry (ed.), Todd-Sanford Clinical Diagnosis, W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, 1969.

MicroVue é uma marca comercial registrada da Quidel Corporation. Quaisquer outras marcas comerciais neste documento são propriedade dos respectivos detentores e a sua utilização no presente documento não implica qualquer tipo de patrocínio ou endosso de produtos ou serviços.

REF A001 – MicroVue CIC-C1q Eq 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

PIA001004PT00 (09/21)

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
