

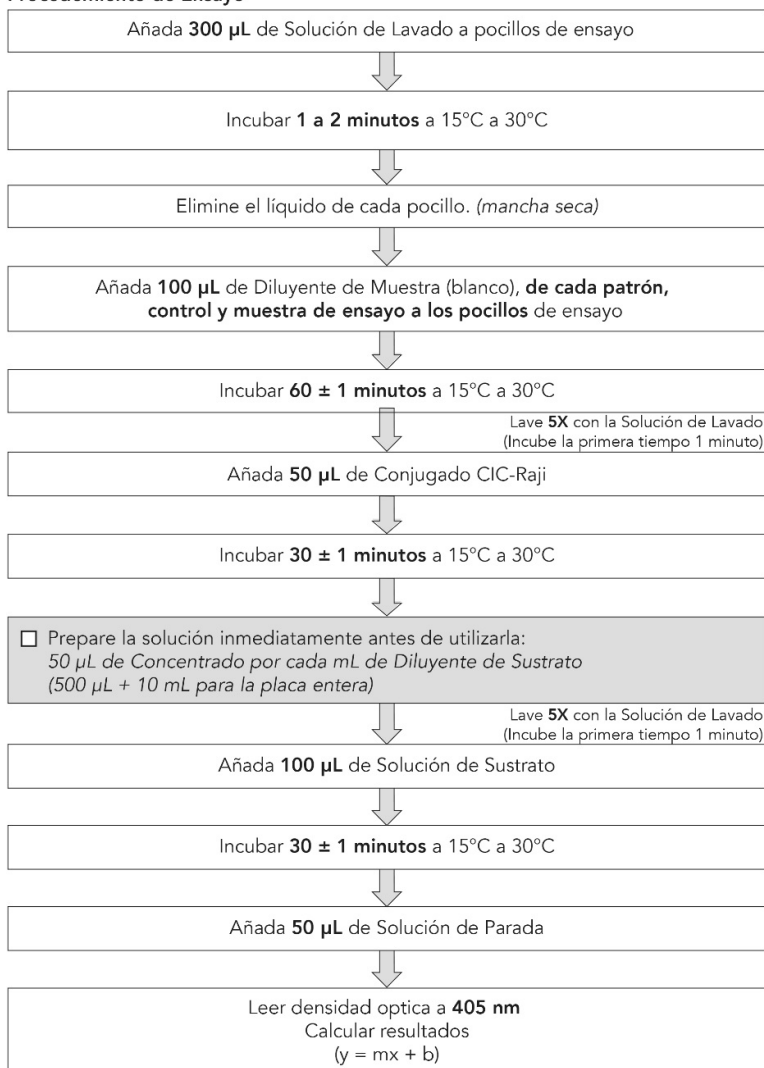
Enzoinmunoensayo para la cuantificación de complejos inmunes circulantes (CIC) que contienen fragmentos de activación de C3 en suero y plasma humanos

RESUMEN

Preparación del Reactivo, Control y de la Muestra

- Diluya la Concentrado de Solución de Lavado 1:20 con agua desionizada.
- Reconstituya cada control con 1.0 mL del Diluyente de Muestras de Complemento, mezcle bien and déjelo por 15 minutos. *(Para confirmar Control Alto, utilice 1 mL del Diluyente de Confirmación para la Reconstitución.)*
- Diluya Muestras 1:50 con Diluyente de Muestras de Complemento (10 µL + 490 µL).
- Para confirmar muestras altas, diluido 1:50 con Diluyente de Confirmación.

Procedimiento de Ensayo





USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzima de CIC-reposición de células Raji de MicroVue mide los complejos inmunes que contienen fragmentos de activación de C3 en suero y plasma humanos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La importancia de los complejos inmunes circulantes (CIC) y su relación con diferentes enfermedades es objeto de investigación desde hace varios años. La formación de complejos inmunes es un proceso de protección continuo y, por lo general, benigno de un sistema inmune normal. Los CIC son eliminados de su huésped mediante una serie de procesos bioquímicos, enzimáticos y celulares complejos. Para que esta eliminación sea eficaz, en muchos casos se requiere la activación del complemento. Su activación da como resultado una deposición de fragmentos de C3 dentro del complejo inmune, seguida de una mayor eliminación por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial. En ciertas condiciones de enfermedad que aún no se comprenden muy bien, los complejos inmunes no son eliminados de forma eficiente del organismo. En estos casos, los complejos inmunes pueden acumularse y producir lesiones dependientes del complemento en diferentes órganos y tejidos. Esta activación del complemento puede comenzar como una serie de episodios potencialmente destructivos en el huésped, incluyendo la producción de anafilatoxina, lisis celular, estimulación leucocitaria y activación de macrófagos y otras células.¹ Cuando los complejos inmunes se fijan a las paredes de los vasos o a las membranas celulares, puede producirse la destrucción de tejido normal, como ocurre en algunos casos de glomerulonefritis.

Ciertas propiedades de los CIC influyen en su patogenicidad potencial. Las más importantes son: (1) la naturaleza, tamaño y concentración del antígeno; (2) la naturaleza, tamaño y concentración del anticuerpo; (3) la velocidad de formación y eliminación de los complejos inmunes.^{1,2}

Los complejos inmunes circulantes se han medido en diferentes condiciones: por ejemplo, infecciones, trastornos autoinmunes, traumatismos y enfermedades proliferativas neoplásicas. Los estudios actuales sugieren que la determinación de los CIC puede ser importante para la evaluación de ciertas enfermedades y, algunas veces, para realizar un seguimiento de la eficiencia de la terapia, como ocurre particularmente con el lupus eritematoso sistémico (LES) y algunas formas de la artritis reumatoide (AR).^{3,4} La primera enfermedad vinculada a la formación de complejos inmunes fue la enfermedad de suero, descrita a comienzos del siglo XX por von Pirquet. Desde entonces, se han descrito niveles elevados de CIC en enfermedades autoinmunes (LES, síndrome relacionado con el LES, AR), glomerulonefritis, enfermedad neoplásica (Hodgkin, leucemia), infecciones bacterianas (endocarditis bacteriana subaguda, lepra), infecciones parasitarias (malaria, esquistosomiasis) e infecciones virales (hepatitis, mononucleosis).

Se han descrito más de 40 técnicas de ensayo para la detección o cuantificación de los CIC, como el ensayo de células Raji, la prueba de desviación del C1q, el ensayo de conglutinina, los procedimientos de unión del C1q en fase fluida, el ensayo del factor reumatoide, la prueba de PEG precipitina y ensayos del C1q en fase sólida.^{1,5} Debido a que el tamaño y las propiedades fisicoquímicas de los CIC varían de forma considerable, ninguno de estos ensayos se ha establecido como norma. Un estudio en colaboración patrocinado por la Organización Mundial de la Salud en 1978 determinó que no había un solo método adecuado para todos los estados de enfermedad sospechados y recomendaba utilizar al menos dos técnicas de ensayo diferentes para detectar y medir los CIC de forma adecuada.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Algunos fragmentos del tercer componente del complemento, C3, suelen unirse de forma covalente a los complejos inmunes activadores del complemento. Las células Raji, que se obtuvieron de una línea celular cultivada de linfocitos B continua, poseen receptores para los componentes del complemento CR2 que unen los fragmentos iC3b, C3d,g y C3d del C3 activado.^{6,7,8} El ensayo de CIC-células Raji se basa en la capacidad de los receptores de CR2 de las células Raji de unir los complejos inmunes que contienen dichos fragmentos de C3.⁶ El ensayo de inmunoenzima de CIC-reposición de células Raji de MicroVue también mide

los fragmentos de C3 que contienen CIC utilizando un anticuerpo monoclonal inmovilizado que une específicamente los fragmentos de activación iC3b, C3d,g y C3d del C3 de forma análoga a la reacción de unión del CR2 de las células Raji.

En la primera etapa, se añaden los patrones y muestras de suero o plasma diluidos en diluyente de muestras de complemento a los pocillos de microensayo recubiertos con anticuerpos monoclonales contra fragmentos de C3 humanos y se los incuban. Durante la incubación, los complejos inmunes que contienen fragmentos de activación de C3 son capturados por el anticuerpo en fase sólida. Después de la incubación, un ciclo de lavado elimina las proteínas de suero o plasma no unidas.

En la segunda etapa, se añade IgG antihumana de ratón conjugada con peroxidasa de rábano a cada pocillo de ensayo y se los incuban. Durante la incubación, el conjugado se une a los complejos inmunes que ahora se encuentran unidos a los pocillos de microensayo. Un ciclo de lavado elimina el conjugado no unido.

En la tercera etapa, se añade un sustrato enzimático a cada pocillo de ensayo. El anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano unido reacciona con el sustrato cromogénico y forma un color verde. Después de la incubación, se añade un reactivo para detener la coloración.

Se miden las absorbancias del patrón y de las muestras de ensayo (valores A_{405}) mediante espectrofotometría. La intensidad del color verde que se forma es proporcional a la cantidad de CIC que se unen a la fase sólida. Se genera una curva estándar representando gráficamente los valores A_{405} obtenidos para cada patrón en función de su concentración indicada. La concentración de complejos inmunes presentes en la muestra de ensayo se determina por referencia a la curva estándar. Los resultados se expresan en microgramos de gammaglobulina humana agregada por calor tratada con suero equivalentes por mL ($\mu\text{g Eq/ml}$). Para confirmar un resultado CIC positivo, la muestra puede analizarse después de diluirse en diluyente de confirmación de CIC-Raji, el cual contiene anticuerpos bloqueantes con especificidades similares a las del anticuerpo inmovilizado sobre el pocillo de microensayo.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

El kit de enzoinmunoensayo de CIC-reposición de células Raji contiene los siguientes elementos:

A Patrones CIC-Raji	Cód. A9970-A9974	1 unidad de 2 mL
B Cada uno contiene una cantidad conocida de gammaglobulina humana agregada por calor tratada con		
C suero en PBS, estabilizadores al 2,5 %, timerosal al 0,01 %		
D		
E		
L Control bajo CIC-RCR	Cód. A9919	3 viales
Contiene niveles bajos de gammaglobulina agregada por calor en suero humano, 20 mM de EDTA, timerosal al 0,01 %		
H Control alto CIC-RCR	Cód. A9920	3 viales
Contiene niveles altos de gammaglobulina agregada por calor en suero humano, 20 mM de EDTA, timerosal al 0,01 %		
① Placa de microensayo	Cód. A9512	12 unidades
96 pocillos con retén y soporte, en tiras de ocho pocillos recubiertas con fragmentos de C3 antihumano de ratón en una bolsa de aluminio resellabl		
② Solución de parada	Cód. A3673	6 mL
Contiene 250 mM de ácido oxálico		
③ Concentrado de solución de lavado 20X	Cód. A9957	2 x 50 mL
Cada uno contiene solución salina tamponada de fosfato (PBS), Tween-20® al 1,0 % y Proclin® 300 al 0,035 %		

4	Diluyente de muestras de complemento	Cód. A3670	50 mL
	Contiene PBS, estabilizadores al 2,5 %, ProClin 300 al 0,035 %		
5	Diluyente de sustrato	Cód. A3672	25 mL
	Contiene 0,1 M de tampón de citrato y H ₂ O ₂ al 0,05 %		
6	Concentrado de sustrato	Cód. A3671	1,5 mL
	Contiene ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) al 0,7 %, sal de diamonio		
7	Conjugado de CIC-Raji	Cód. A9516	2 x 3 mL
	Contiene IgG antihumana (de ratón) conjugada con peroxidasa suspendida en un tampón estabilizador de peroxidasa de rábano con conservante		
8	Diluyente de confirmación de CIC-Raji	Cód. A9517	12 mL
	Contiene PBS, estabilizadores al 2,5 %, anticuerpo de fragmento de C3 antihumano, ProClin 300 al 0,035 %		

Tween-20® es una marca de Atlas Chemical Industries, Inc.
ProClin® es una marca registrada de Rohm and Haas Company

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Cronómetro (de 60 minutos)
- Calculadora u otro método de cálculo para validar el ensayo
- Placas de microensayo limpias y sin usar y/o tubos de ensayo y portatubos
- Recipiente para dilución del tampón de lavado
- Botella para lavado u otro sistema de lavado para inmunoensayo
- Pipeta multicanal ajustable (8 ó 12 canales) o micropipetas de repetición (opcionales)
- Pipetas limpias, 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Micropipetas y puntas de pipeta
- Lector de placas apto para leer valores A_{405} de densidad óptica de 0,0 a 2,0
- Agua desionizada o destilada

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Trate las muestras como material potencialmente biopeligroso.
- Respete las precauciones universales al manipular el contenido de este kit y las muestras de los pacientes.
- Use los reactivos suministrados como una unidad integral antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.
- Guarde los reactivos de ensayo según lo indicado.
- No emplee las tiras recubiertas si la bolsa está pinchada.
- El timerosal se utiliza como conservante. El contacto o la ingestión accidentales de tampones o reactivos que contienen timerosal pueden provocar reacciones de aumento de la hipersensibilidad, incluyendo irritación en la piel, los ojos o la boca. Busque atención médica en caso de experimentar estos síntomas. La exposición al timerosal puede tener efectos mutagénicos potenciales. Evite el contacto con los ácidos y bases fuertes.
- El ProClin 300 se utiliza como conservante. El contacto o la ingestión accidentales de tampones o reactivos que contienen ProClin pueden provocar irritación en la piel, los ojos o la boca. Utilice buenas prácticas de laboratorio para reducir la exposición. Busque atención médica en caso de experimentar estos síntomas.
- Se recomienda utilizar pipetas multicanal o pipeteros de repetición para garantizar la administración de los reactivos en el momento adecuado.
- Para una medición exacta de las muestras, añada las muestras y los patrones con precisión. Pipetee cuidadosamente utilizando sólo equipo calibrado.
- Es fundamental recoger y almacenar de forma adecuada las muestras de ensayo para obtener resultados precisos (vea la sección *RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS*).

- Evite la contaminación microbiana o cruzada de las muestras, reactivos o materiales. Su contaminación puede llevar a la obtención de resultados incorrectos.
- Analice cada muestra por duplicado.
- No utilice un pocillo de microensayo para más de un ensayo.
- El uso de tiempos y temperaturas de incubación que no sean los indicados en la sección Procedimiento de ensayo puede dar resultados erróneos.
- **El concentrado de sustrato es sensible a la luz. Evite la exposición prolongada a la luz fuerte o directa. Guarde los reactivos en un lugar oscuro cuando no los utilice.**
- No permita que los pocillos de microensayo se sequen una vez iniciado el ensayo.
- Al añadir o aspirar líquidos 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.
- Este ensayo puede realizarse con cualquier método de lavado homologado. **Para obtener mejores resultados, no use 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 los símbolos de peligro, seguridad, manejo y desecho de los componentes dentro de este kit, por favor consulte la Hoja de Datos de Seguridad (SDS) situado en quidel.com.

CONSERVACIÓN

Conserve el kit no abierto a 2°C a 8°C. Una vez abierto, el concentrado de solución de lavado 20X puede guardarse a 2°C a 30°C.

Después de seleccionar los reactivos o materiales que se utilizarán en el ensayo, vuelva a guardar inmediatamente los reactivos no utilizados a las temperaturas de conservación adecuadas. Deje que los reactivos y los materiales para el ensayo se estabilicen a temperatura ambiente (15°C a 30°C) antes de su uso.

INDICACIONES DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE REACTIVOS

El color del concentrado de sustrato puede variar entre verde claro y verde oscuro. Esta condición no influirá en su funcionamiento normal. No obstante, la solución de sustrato recién preparada debe ser incolora o de un color verde claro. Un color verde oscuro indica que la solución de sustrato preparada se ha deteriorado. En este caso, debe desecharse y prepararse solución de sustrato fresca en un recipiente de vidrio limpio.

Si la solución de lavado diluida se vuelve turbia o se decolora significa que el reactivo se ha echado a perder y debe desecharse.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

Manipule y deseche todas las muestras utilizando las precauciones universales.

Las muestras de suero o plasma deben recogerse utilizando técnicas asépticas y prepararse según las técnicas habituales para el análisis clínico en laboratorio.¹⁰ No inactive por calor las muestras. Deben eliminarse de las muestras todas las partículas de materia mediante centrifugado a baja velocidad antes de realizar el ensayo.

Las muestras pueden conservarse en hielo, a aproximadamente 0 °C hasta 6 horas. Para conservarlas por períodos más prolongados, deben congelarse a –70 °C o a una temperatura inferior (la conservación a –20°C puede dar lugar a resultados erróneos).

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Vea en la Tabla 1 las cantidades de solución de sustrato y tiras de microensayo requeridas por número de ensayos. Tras retirar los reactivos y materiales necesarios, vuelva a guardar los elementos no utilizados a la temperatura correspondiente indicada (vea la sección *CONSERVACIÓN*). Deje que todos los reactivos y materiales para el ensayo se estabilicen a temperatura ambiente (15°C a 30°C) antes de su uso.

1. 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 guardado a una temperatura de 2°C a 8°C, es posible que se hayan formado cristales. Para disolver los cristales, caliente el frasco en un baño de agua de 37°C a 50°C hasta que todos los cristales se hayan disuelto y, a continuación, mézclelo bien. Prepare la solución de lavado diluyendo todo el contenido de uno de los frascos 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 si se conserva en un recipiente limpio a 2°C a 8°C. En caso de decoloración o turbiedad, deseche el reactivo.

2. Selección de las tiras de microensayo

Determine la cantidad de tiras de microensayo requeridas para el ensayo consultando la Tabla 1. Retire el retén de las tiras de la placa montada. Retire las tiras que no necesita y colóquelas en la bolsa de conservación. Vuelva a sellar la bolsa y guárdela a 2°C a 8°C. Fije las tiras que utilizará en el ensayo.

3. Dilución de muestras

Atención: trate todas las muestras como si fueran potencialmente infecciosas. No utilice muestras inactivadas por calor o contaminadas.

Determine el número (N) de muestras que someterá a ensayo. Identifique los tubos de ensayo con etiquetas con números del 1 al N y anote en la hoja de datos provista qué muestra corresponde a cada tubo. Prepare una dilución de 1:50 de cada muestra utilizando el diluyente de muestras de complemento (p. ej., 10 µL de muestra de ensayo con 490 µL de diluyente de muestras de complemento). Mezcle bien pero evite la formación de espuma y burbujas. No guarde ni vuelva a utilizar las muestras diluidas.

4. Incorporación de las muestras diluidas a los pocillos de microtitulación

Puede utilizarse uno de dos métodos para incorporar las muestras diluidas, los patrones, los controles y el tampón a los pocillos (vea el paso 5 del *PROCEDIMIENTO DE ENSAYO*). Para ciclos de ensayo pequeños en los que sólo se analiza una pequeña cantidad de muestras, las muestras diluidas y otros reactivos pueden añadirse directamente a los pocillos asignados con una micropipeta (100 µL/pocillo). En el caso de ciclos pequeños o grandes, especialmente en estos últimos, recomendamos el uso de un pipetero multicanal para añadir las muestras como se indica a continuación. (También puede utilizarse un pipetero multicanal para facilitar la incorporación del conjugado, la solución de sustrato y la solución de parada.)

A fin de cargar los patrones, controles y muestras diluidas en los pocillos de microensayo lo más rápidamente posible, puede utilizarse un procedimiento de “réplica en placas”. En lugar de añadir 100 µL de cada patrón, control o muestra diluida a los pocillos recubiertos con anticuerpos de forma individual, pueden añadirse 120-130 µL de cada solución a pocillos individuales en una placa testigo (no suministrada) correspondiente al patrón de enzimoimmunoensayo final deseado. Una vez incorporadas a los pocillos de microensayo de la placa testigo todas las soluciones que se desean someter a ensayo, transfiera rápidamente 100 µL de cada pocillo testigo a los pocillos recubiertos con anticuerpos

utilizando un micropipetero multicanal. Para evitar la posibilidad de contaminación cruzada, deben cambiarse las puntas de la pipeta cada vez que cambie la composición de las muestras que se desean transferir.

5. Dilución de confirmación de CIC-Raji (opcional)

Si desea verificar los resultados positivos obtenidos, determine el número (N) de muestras que desea confirmar. Identifique los tubos de ensayo con etiquetas con números del 1c al Nc y anote qué muestra corresponde a cada uno. Prepare una dilución de 1:50 utilizando el diluyente de confirmación de CIC-Raji. Las muestras diluidas en este diluyente deben analizarse de forma **simultánea** en el diluyente de muestras de complemento con la misma dilución.

6. Preparación de la solución de sustrato

Prepare la solución inmediatamente antes de utilizarla. Determine el volumen requerido de solución de sustrato consultando la Tabla 1 a continuación. Prepare la solución de sustrato añadiendo 50 µL de concentrado de sustrato por cada mL de diluyente de sustrato. Mezcle bien.

7. Controles de CIC

Cada control debe reconstituirse con $1,0 \pm 0,05$ mL del diluyente de muestras de complemento. Una vez reconstituídos, mezcle bien cada vial suavemente para asegurar su total rehidratación. Incube las tiras de microensayo a temperatura ambiente (15°C a 30°C) durante 10 a 15 minutos. Vuelva a mezclar bien suavemente y utilícelo. **NO ES NECESARIO VOLVER A DILUIR.**

Tabla 1
Requisitos del Ensayo

Pocillos*	Tiras de 8 pocillos	Solución de sustrato requerida (mL)	Diluyente de sustrato (mL)	Concentrado de sustrato (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

* Determine el número de muestras que desea analizar y añada quince (15) pocillos para los cinco patrones, los controles alto y bajo que desea analizar (por duplicado) y un pocillo testigo. Se recomienda analizar los patrones y controles por duplicado en tiras de microensayo separadas siempre que sea posible.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Lea el prospecto del producto en su totalidad antes de iniciar el ensayo.

Vea las secciones *PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS* y *ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES* antes de continuar.

1. Tome nota de las posiciones de los pocillos de microensayo correspondientes a los pocillos testigo, a las muestras de ensayo, a los patrones y a los controles, así como los números de lote que figuran en las etiquetas de los viales. Marque una esquina de la placa de microensayo a modo de orientación.
2. Prepare las tiras de microensayo de la siguiente forma:
 - a. Rehidrate los pocillos de microensayo añadiendo aproximadamente 300 µL de solución de lavado a cada pocillo utilizando una botella para lavado u otro dispositivo de llenado.
 - b. Incube a temperatura ambiente (15°C a 30°C) durante 1 a 2 minutos.
 - c. Aspire el contenido de cada pocillo.

- d. Invierta la placa y golpéela con fuerza sobre papel absorbente dos veces para eliminar el líquido restante. No deje que los pocillos se sequen.
3. Añada 100 µL de diluyente de muestras de complemento a los pocillos testigo que se utilizarán con el lector de placa.
4. Añada 100 µL de cada patrón CIC-Raji (A, B, C, D y E) a los pocillos correspondientes por duplicado.
5. Añada 100 µL de cada muestra diluida a los pocillos asignados. Vea la sección *PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS*, Paso 4.
6. Incube a temperatura ambiente (15°C a 30°C) durante 60 ± 1 minutos.
7. Lave los pocillos de microensayo como se indica a continuación:
 - a. Después de la incubación del paso 6 (y del paso 9 a continuación), elimine el líquido de cada pocillo.
 - b. Añada aproximadamente 300 µL de solución de lavado a cada pocillo utilizando una botella para lavado u otro dispositivo de llenado.
 - c. Incube los pocillos durante 1 minuto a temperatura ambiente (15 C a 30°C).
 - d. Elimine el líquido de cada pocillo.
 - e. Añada aproximadamente 300 µL de solución de lavado a cada pocillo.
 - f. Elimine el líquido de cada pocillo.
 - g. Repita los pasos e–f tres veces más.
 - h. Después de este quinto ciclo de lavado, invierta la placa y golpéela con fuerza sobre papel absorbente dos veces para eliminar todo el líquido restante.
8. Utilizando una pipeta multicanal o de repetición, aplique 50 µL del conjugado de CIC-Raji en cada pocillo de ensayo lavado, incluyendo los pocillos testigo.
9. Incube las tiras de microensayo a temperatura ambiente (15°C a 30°C) durante 30 ± 1 minutos. **Prepare la solución de sustrato durante la incubación (vea la sección *PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS*, paso 6).**
10. Lave los pocillos de microensayo después de la incubación de 30 minutos del paso 9, tal como se describe en el paso 7 anterior.
11. Inmediatamente después del procedimiento de lavado y utilizando una pipeta multicanal o de repetición, aplique 100 µL de la solución de sustrato recién preparada a cada pocillo, incluyendo los pocillos testigo.
12. Incube las tiras de microensayo a temperatura ambiente (15°C a 30°C) durante 30 ± 1 minutos.
13. Utilizando una pipeta multicanal o de repetición, añada 50 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 a la misma velocidad que la solución de sustrato. Golpee suavemente la placa para que la formación de color sea uniforme.
14. Determine el valor de absorbancia a 405 nm (valor A_{405}) para cada pocillo de ensayo dentro de una hora después de añadir la solución de parada (paso 13), realizando una corrección en blanco según el sistema espectrofotométrico en uso.
15. Conserve el soporte y el retén de la tira para su uso futuro.
16. Deseche las muestras diluidas restantes, el sustrato y las puntas de microensayo usadas conforme a los requerimientos locales, estatales y federales. Conserve el soporte y el retén de la tira para su uso futuro.

MÉTODO DE CONFIRMACIÓN RECOMENDADO

En caso de requerir una confirmación independiente de un resultado positivo, o si un resultado positivo no es congruente con la interpretación clínica, puede realizarse un nuevo ensayo de la muestra positiva utilizando una prueba de confirmación. Los resultados negativos no pueden confirmarse. El método de confirmación utiliza un diluyente de muestras (el diluyente de confirmación de CIC-Raji) que contiene anticuerpos de fragmentos de C3 antihumanos. Para confirmar un resultado positivo, debe diluirse una alícuota de la muestra en el diluyente de confirmación de CIC-Raji y una segunda alícuota en el diluyente de muestras de complemento. A continuación, se analizan ambas muestras según el procedimiento de enzoinmunoensayo de CIC-reposición de células Raji habitual. Vea más detalles en las secciones *PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS* e *INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS*.

CONTROL DE CALIDAD

Si el control positivo y/o negativo no funcionan como corresponde, póngase en contacto con el Servicio técnico de Quidel lo antes posible.

Además de los controles, el ensayo de CIC-reposición de células Raji de MicroVue también incluye un **MÉTODO DE CONFIRMACIÓN** recomendado y parámetros de **VALIDACIÓN**.

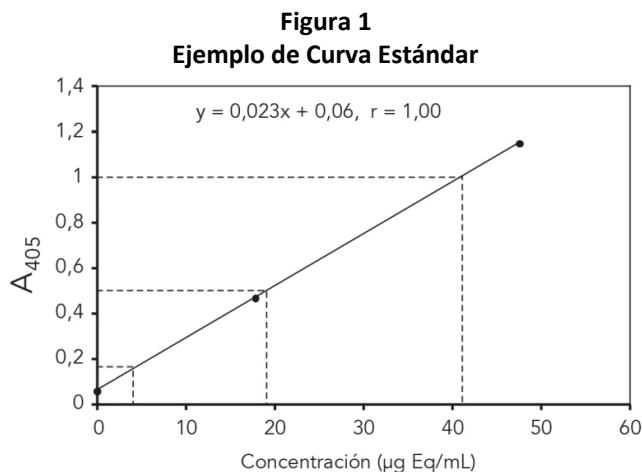
Utilizando los controles, los patrones con validación y el método de confirmación, podrá obtener resultado reproducible y preciso.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Cálculo de los resultados

Cálculos: La curva estándar se genera utilizando el valor A_{405} sustraído del testigo de cada patrón CIC-Raji (en el eje Y) en función de los microgramos asignados de equivalentes gammaglobulina agregada por calor tratada con suero/ml ($\mu\text{g Eq/ml}$) indicados en la etiqueta del vial para cada patrón (en el eje X). Después de la regresión lineal, la curva estándar generada debe cumplir con los requisitos de validación (ver más abajo). A continuación, se calculan directamente las concentraciones de la muestra a partir de la curva estándar. La mayoría de los ordenadores y calculadoras es capaz de realizar estos cálculos.

Como alternativa, pueden representarse gráficamente los datos de forma manual y los valores ($\mu\text{g Eq/ml}$) de las muestras de ensayo pueden leerse directamente de la línea de ajuste óptimo de la curva estándar. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de una curva estándar típica.



Cálculo de la prueba de confirmación: Para confirmar un resultado positivo, la concentración del complejo inmune [CIC] determinada en la muestra diluida en el diluyente de confirmación de CIC-Raji se divide por la concentración del complejo inmune medida en la muestra diluida en el diluyente de muestras de complemento para generar una relación:

$$\text{relación} = \frac{[\text{CIC}] \text{ en diluyente de confirmación CIC-Raji}}{[\text{CIC}] \text{ en diluyente de muestras de complemento}}$$

Muestra	A_{405}	$\mu\text{g Eq/mL}$
Patrón A	0,6	0
Patrón B	0,18	5
Patrón C	0,45	17
Patrón D	0,75	30
Patrón E	1,16	48

Muestra 1	0,15	3,9
Muestra 2	0,50	19,1
Muestra 3	1,00	40,9
$r = 1,00$	$m = 0,023$	$b = 0,06$

Validación

Determine la pendiente, intersección y coeficiente de correlación de la línea de ajuste óptimo derivada. Los valores deben encontrarse dentro de los intervalos especificados para aprobar el ensayo:

coeficiente de correlación (r): $> 0,95$
pendiente (m): $0,013$ to $0,034$
intersección y (b): $(-)0,07$ to $(+)0,10$

La mayoría de los sujetos normales demuestra niveles mensurables de CIC. Debido a que no hay un nivel anormal aceptado de CIC, el usuario debe establecer sus propios niveles normales. A modo de orientación, los niveles de CIC basados en los resultados obtenidos en las poblaciones normales que se describen en la sección *VALORES ESPERADOS* son los siguientes:

Resultados normales: los valores inferiores o iguales a $15 \mu\text{g Eq/ml}$ se consideran niveles de CIC normales.

Resultados anormales: los valores superiores o iguales a $20 \mu\text{g Eq/ml}$ se consideran niveles de CIC anormales. Las muestras que han dado concentraciones de CIC superiores a las del patrón CIC-Raji E deben informarse como superiores a la concentración del patrón CIC-Raji E asignada indicada en la etiqueta del vial.

Valores equívocos: los valores superiores a $15 \mu\text{g Eq/ml}$ e inferiores a $20 \mu\text{g Eq/ml}$ son equívocos. Estas muestras pueden volver a someterse a ensayo o bien puede extraerse y analizarse una nueva muestra, según esté indicado. Si una muestra equívoca vuelve a dar un resultado equívoco, la muestra se considera significativamente superior al valor normal y puede informarse como anormal.

Resultados de confirmación: si la relación es inferior a 0,5, el resultado CIC positivo queda confirmado. En otras palabras, una reducción de más del 50 % en la concentración CIC aparente confirma un resultado positivo.

Ocasionalmente, las muestras positivas no pueden confirmarse. Esto puede deberse a, entre otras razones: (1) la mala manipulación de las muestras (p. ej. contaminadas o inactivadas por calor) o (2) las muestras contienen anticuerpos IgG humanos que se unen a la IgG de ratón. No obstante, estas muestras no son necesariamente negativas en cuanto a la presencia de CIC. El material que causa el resultado positivo falso aparente puede enmascarar la presencia de CIC concomitantes que, si estuvieran presentes solos, darían un resultado positivo confirmable.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Esta prueba mide los complejos inmunes o los agregados de IgG humana que contienen fragmentos de activación de C3. Por lo tanto, deben evitarse las condiciones que promueven la agregación de IgG o la activación del complemento durante la recogida y procesamiento de las muestras.

VALORES ESPERADOS

Se obtuvieron cincuenta (50) sueros seleccionados de un laboratorio de referencia que recibe muestras de todo Estados Unidos. Estos sueros se analizaron con el ensayo de inmunoensayo de CIC-reposición de células Raji de MicroVue y con el ensayo de células Raji del laboratorio de referencia. Hubo una coincidencia del 92 % entre los dos ensayos en la medición de la presencia de CIC.

Se analizaron los sueros obtenidos de sesenta y dos (62) pacientes con LES en dos clínicas del este de los EE.UU. y de veintinueve (29) pacientes con AR en una clínica de reumatología del sur de los EE.UU. con el enzimoimmunoensayo de CIC-reposición de células Raji de MicroVue. Además, se analizaron sueros de veintiséis (26) sujetos sanos y normales en los dos centros clínicos de LES y de veinticinco (25) pacientes no autoinmunes clínica-mente en la clínica reumatológica. Las concentraciones medias de CIC, las desviaciones estándar y la distribución de frecuencia para cada población se presentan en las Figuras 2, 3 y 4.

Figure 2
Enzimoimmunoensayo de CIC- Reposicion de Células Raji
Población con Lupus Eritematoso Sistémico

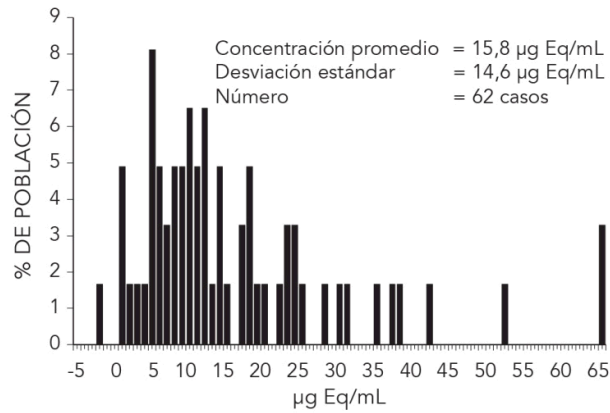


Figure 3
Enzimoimmunoensayo de CIC- Reposicion de Células Raji
Población con Artritis Reumatoide

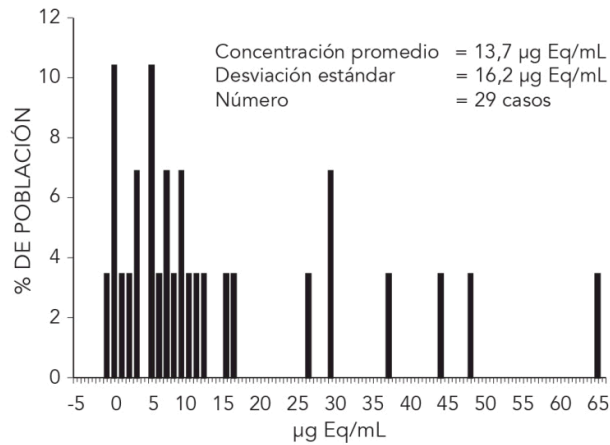
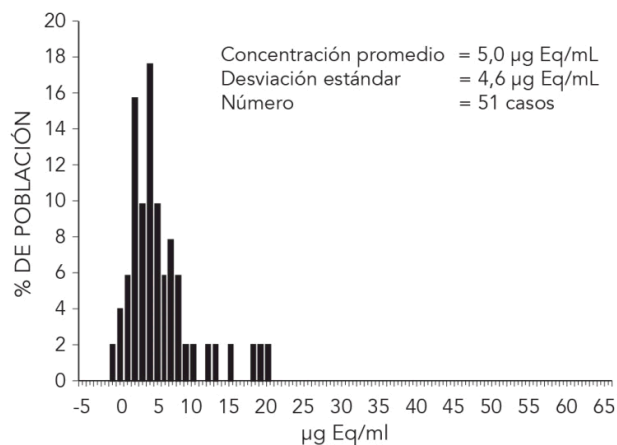


Figure 4
Enzimoimmunoensayo de CIC- Reposición de Células Raji
Población de Control



En uno de los centros de LES y en el centro de AR, el grado de actividad de la enfermedad se asignó independientemente de los datos de los análisis de laboratorio de CIC. Esta evaluación fue realizada por los médicos a cargo del tratamiento. Para asegurar la coherencia de los datos informados, un médico en cada centro revisó posteriormente las historias clínicas de los pacientes y asignó la actividad de la enfermedad. Un paciente con AR se describió como “burnout” en última etapa. El resultado de CIC para este paciente fue de 1 µg Eq/ml. Debido a que no había otros pacientes con AR con características similares, este resultado individual no se incluyó en la Tabla 2. La Tabla 2 muestra la relación observada entre los CIC medidos con el enzimoimmunoensayo de CIC-reposición de células Raji de MicroVue y la actividad de enfermedad de los pacientes.

Tabla 2
Resultados del Ensayo de CIC- Reposición de Celulas Raji Comparados con la Actividad de la Enfermedad
% Anormal*

	Actividad baja	Actividad moderada	Actividad alta
SLE	8 % (1/12)	36 % (4/11)	79 % (11/14)
RA	0 % (0/4)	19 % (3/16)	50 % (4/8)

* Entre paréntesis (después de cada % anormal) se indica el número de pacientes con resultados anormales dividido por el número de pacientes clasificados con la actividad de la enfermedad particular.

CARACTERÍSTICAS DE COMPORTAMIENTO

Exactitud

Se utilizó un patrón de complejo inmune de la Organización Mundial de la Salud (complejos toxoide tetánico-toxoide anti-tetánico preincubados en suero humano normal fresco) para estandarizar el ensayo. Para probar la exactitud del ensayo, se analizaron cinco diluciones del patrón de la OMS por triplicado en nueve ciclos de ensayo con el kit de MicroVue.

Las concentraciones analizadas mostraron una correlación de 0,99 respecto de los valores conocidos.

Reproducibilidad

Se analizaron las muestras de los pacientes y los patrones del kit en nueve ciclos de ensayo con kits de dos lotes diferentes. Cada una se analizó por triplicado dentro de cada ciclo. La Tabla 3 muestra la variación promedio entre cada ciclo para las muestras y los patrones del kit como variación intraensayo. La Tabla 3

muestra la variación promedio dentro de cada ciclo para las muestras y los patrones del kit como variación interensayo.

Tabla 3
Reproducibilidad del Ensayo

		Gennemsnit (µg Eq/mL)	Intra-assay (% CV)	Inter-assay (% CV)
Prøve	1	56	5	9
	2	13	9	23
Standard	1	4	8	30
	2	11	7	15
	3	23	5	9
	4	32	4	6
	5	40	5	6
	6	48	4	5
	7	59	3	4

Sensibilidad

El enzimoimmunoensayo de CIC-reposición de células Raji de MicroVue mide al menos 4 µg Eq/ml o más de analito de CIC, basado en una comparación con el patrón de la OMS.

Especificidad

Los cincuenta y un (51) sueros de control que se describen en la sección *VALORES DE LA MUESTRA* se sometieron al ensayo de CIC-reposición de células Raji de MicroVue. Sólo tres fueron positivos (superiores a los 15 µg Eq/ml de forma reiterada), con una especificidad del 94 %.

ASISTENCIA

Para servicios fuera de los EE.UU., póngase en contacto con su distribuidor local. Información adicional de Quidel, nuestros productos y nuestros distribuidores puede encontrarse en nuestra página web quidel.com.

REFERENCIAS

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.
10. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.

REF A002 – CIC-Raji Cell Replacement

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA002001ES00 (04/17)

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



Límites de temperatura



Indicaciones



Consulte las 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
