

## Enzimoimmunoensayo para la cuantificación de fragmentos de activación C4 con C4d en la vía clásica del complemento

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

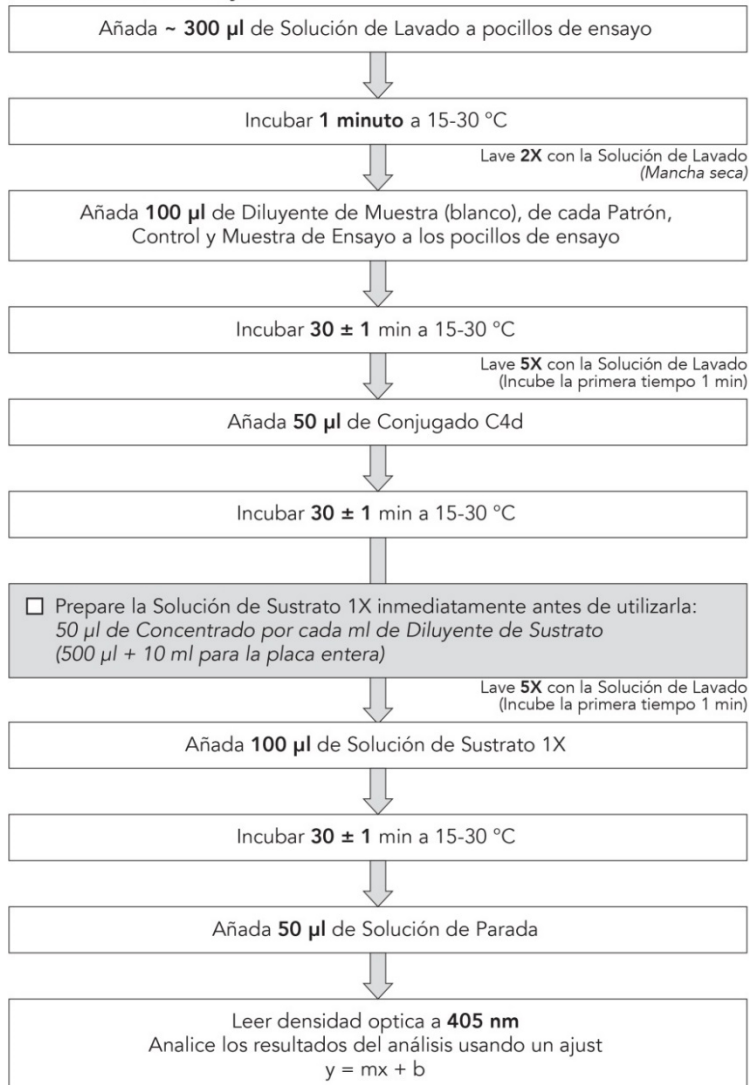
Puede encontrar un glosario de símbolos en [quidel.com/glossary](http://quidel.com/glossary).

### RESUMEN

#### Preparación del Reactivo, Control y de la Muestra

- Diluya el Concentrado de Solución de Lavado 1:20 con agua desionizada.
- Reconstituya cada Patrón y Control con 2,0 ml del Reactivo Hidratante (*mezcle suavemente y déjelo por 15 minutos*)
- Diluya Muestras 1:70 con Diluyente de Muestras de Complemento (10  $\mu$ l + 690  $\mu$ l) (*Añada a los pocillos de ensayo en el plazo de 30 minutos*)

#### Procedimiento de ensayo



## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El ensayo de inmunoensayo C4d Fragment de MicroVue mide la cantidad de fragmentos de activación de C4 que contienen C4d (C4b, iC4b y C4d) presentes en suero humano, plasma EDTA y otras muestras biológicas o experimentales.

El cuarto componente del complemento es una de las proteínas del plasma exclusivamente presentes en la vía clásica de activación del complemento.<sup>1</sup> La vía clásica se activa después de la unión del subcomponente C1q de C1 con complejos inmunes que contienen IgG o IgM. Además, C1 se une y activa por la acción de muchas otras sustancias, como retrovirus, ciertas bacterias, parásitos, células transformadas, membranas subcelulares, polianiones (ADN) y proteína C-reactiva en un complejo con fosforilcolina.<sup>2</sup> La unión de C1 a estos activadores de la vía clásica produce la conversión del subcomponente C1s inactivo en una enzima proteolítica activa (C1s). C1s divide la cadena  $\alpha$  de C4 en la unión péptida 77, lo cual genera fragmentos C4a y C4b con pesos moleculares de 9.000 y 191.000, respectivamente. El fragmento C4a es una de las anafilatoxinas del complemento.<sup>3</sup> El fragmento C4b cumple numerosas funciones biológicas importantes,<sup>1,4</sup> como la mediación de fagocitosis aumentada de las sustancias activadoras del complemento por los glóbulos blancos (opsonización) y la participación en la unión de convertasa C3 y C5 de la vía clásica, que lleva a la activación del componente terminal y a la posterior lisis mediada por complemento de los microorganismos y otras células.

La expresión de las actividades biológicas de C4b está estrictamente regulada. En consecuencia, la capacidad de C4b de participar en reacciones de activación de la vía clásica y opsonización se ve inhibida por la división en un solo lugar de la cadena  $\alpha$  de C4b por el Factor I.<sup>5</sup> Esta reacción requiere proteína de unión C4 (C4bp)<sup>6</sup> o receptor del complemento CR1 como cofactor.<sup>7,8</sup> C4bp es una proteína de control del complemento<sup>9</sup> y CR1 es el receptor de C3b/C4b que se encuentra en eritrocitos, granulocitos, monocitos y macrófagos.<sup>8</sup> La división de C4b por el Factor I produce C4b inactivado, conocido como iC4b.<sup>7-10</sup> El Factor I puede degradar aún más el iC4b, con la cooperación de C4bp o CR1, a fragmentos C4c y C4d.<sup>6-10</sup> Los fragmentos C4c y C4d, que pueden ser producidos en fase líquida y en superficies específicas, parecen ser los productos finales de la degradación de C4b.<sup>1,6-10</sup>

El C4d se ha cuantificado en muestras de suero y plasma humanos. Los niveles de C4d, cuando se normalizan para la presencia de C4 endógeno, pueden ser considerablemente elevados en las muestras de plasma obtenidas de algunos pacientes con artritis reumatoide, angioedema hereditario, lupus eritematoso sistémico o urticaria crónica con hipocomplementemia.<sup>11,12</sup> Los niveles de C4d también pueden ser elevados en los fluidos corporales<sup>13</sup> y en las muestras de plasma obtenidas de otros pacientes con activación de la vía clásica del complemento, p. ej. pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes humorales,<sup>14</sup> septicemia, lesiones térmicas, traumatismos en varios órganos, infartos del miocardio, angioedema hereditario, glomerulonefritis y síndrome de dificultad respiratoria agudo. Aún no se ha establecido la correlación entre los niveles de fragmentos de activación C4d y el estado clínico o pronóstico de los pacientes con estas y otras enfermedades.

El ensayo de inmunoensayo C4d Fragment de MicroVue es un procedimiento cuantitativo rápido, no radioactivo y altamente específico para medir la activación de C4. En consecuencia, este ensayo está diseñado para el estudio de la función o estado de la activación de la vía clásica del complemento en numerosas situaciones de investigación y clínicas y para la monitorización de la generación de fragmentos con C4d *in vitro* o *in vivo*.

## PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

El ensayo de inmunoensayo C4d Fragment de MicroVue para la cuantificación de C4d en suero humano, plasma o muestras experimentales es un procedimiento de tres pasos que utiliza (1) una placa de microensayo recubierta con un anticuerpo monoclonal de ratón que se une específicamente a fragmentos de activación de C4 humano que contienen C4d, (2) un anticuerpo anti-C4d humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) y (3) un sustrato cromogénico.

En el primer paso, se añaden patrones, controles y muestras de ensayo a los pocillos de microensayo previamente recubiertos con un anticuerpo anti-C4d monoclonal específico. El C4d presente en los patrones, controles o muestras se unirá al anticuerpo anti-C4d inmovilizado. Después de la incubación, un ciclo de lavado elimina el material no unido.

En el segundo paso, se añade anticuerpo anti-C4d de cabra conjugado con HRP a cada pocillo de ensayo. El anticuerpo anti-C4d conjugado con enzima se une al C4d capturado por el anticuerpo anti-C4d monoclonal unido a la superficie de los pocillos de microensayo. Después de la incubación, un ciclo de lavado elimina el conjugado sobrante no unido.

En el tercer paso, se añade un sustrato enzimático cromogénico a cada pocillo de microensayo. El conjugado HRP unido reacciona con el sustrato y forma un color verde. Después de la incubación, se interrumpe químicamente la reacción enzimática y se mide la intensidad del color mediante una espectrofotometría a 405 nm. La intensidad del color de la mezcla de reacción es proporcional a la concentración de C4d presente en las muestras, patrones y controles del ensayo.

## REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

### 96 ensayos para fragmento C4d

El kit de inmunoensayo C4d Fragment de MicroVue contiene lo siguiente:

<b>A Patrones C4d</b>	<b>Cód. A4638 – A4642</b>	<b>5 x 2 ml</b>
E (Liofilizados) Contienen suero humano con cantidades conocidas de fragmentos con C4d en PBS, estabilizadores proteicos		
<b>H Controles alto</b>	<b>Cód. A9572</b>	<b>2 x 2 ml</b>
E (Liofilizados) Contienen suero humano con fragmentos con C4d diluidos en PBS, estabilizadores proteicos		
<b>L Controles bajo</b>	<b>Cód. A9573</b>	<b>2 x 2 ml</b>
E (Liofilizados) Contienen suero humano con fragmentos con C4d diluidos en PBS, estabilizadores proteicos		
<b>1 Tiras recubiertas</b>	<b>Cód. A9567</b>	<b>2 x 2 ml</b>
E 12 tiras de ocho pocillos recubiertas con un anticuerpo monoclonal de ratón específico a C4d humano en una bolsa de papel de aluminio resellable		
<b>2 Solución de parada</b>	<b>Cód. A3673</b>	<b>6 ml</b>
E Contiene 250 mM de ácido oxálico		
<b>3 Concentrado de solución lavado 20X</b>	<b>Cód. A9957</b>	<b>2 x 50 ml</b>
E Contiene solución salina tamponada de fosfato (PBS), Tween-20® al 1,0% y ProClin® 300 al 0,035%		
<b>4 Diluyente de muestras</b>	<b>Cód. A3670</b>	<b>50 ml</b>
E Contiene PBS, estabilizadores proteicos Tween-20 al 0,05%, ProClin 300 al 0,035%		
<b>5 Diluyente de sustrato</b>	<b>Cód. A3672</b>	<b>25 ml</b>
E Contiene 0,1 M de tampón de citrato y H2O2 al 0,05%		
<b>6 Concentrado de sustrato</b>	<b>Cód. A3671</b>	<b>1,5 ml</b>
E Contiene ácido 2-2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) al 0,7%, sal de diamonio		
<b>7 Conjugado de C4d</b>	<b>Cód. A9945</b>	<b>2 x 3 ml</b>
E Contiene anticuerpo anti-C4d humano (de cabra) conjugado con peroxidasa en un tampón estabilizador de HRP con conservante		
<b>8 Reactivo hidratante</b>	<b>Cód. A3675</b>	<b>25 ml</b>
E Contiene ProClin 300 al 0,035%		

Tween-20® es una marca de ICI Americas 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 gradillas
- 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 de 1 ml, 5 ml y 10 ml
- Micropipetas y puntas de pipeta
- Lector de placas apto para valores de densidad óptica de 0,0 a 2,0
- Agua desionizada o destilada

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso investigativo únicamente en los EE.UU. No utilizar para procedimientos diagnósticos (sólo en los EE.UU.).
- Trate las muestras como material potencialmente biopeligroso. Respete las precauciones universales al manipular el contenido de este kit y las muestras de los pacientes.
- Deseche los recipientes y el contenido no utilizado de acuerdo con la normativa internacional, nacional y local.
- Use los reactivos suministrados como una unidad integral antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.
- Use ropa protectora adecuada, guantes y protección ocular/ facial al manipular el contenido de este kit.
- Guarde los reactivos de ensayo según lo indicado.
- No emplee las tiras recubiertas si la bolsa está pinchada.
- Analice cada muestra por duplicado.
- 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.
- Cada unidad donante utilizada en la preparación de las muestras y sueros de control de este producto fue analizada con un método aprobado por la FDA para detectar la presencia de anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH1 y VIH2) y contra el virus de la hepatitis C y antígenos de superficie de la hepatitis B. Debido a que ningún método puede garantizar totalmente que no hay agentes infecciosos, estos reactivos deben manipularse a un nivel de bioseguridad 2, como cualquier suero humano o muestra de sangre potencialmente infecciosos, según se recomienda en el manual de los Centers for Disease Control/National Institutes of Health "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2007.
- 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 o reactivos.
- No utilice un pocillo de microensayo para más de un ensayo.
- Descontamine todas las muestras, reactivos y materiales dejándolos en remojo durante 30 minutos como mínimo en una solución 1:10 de lejía de uso doméstico (hipoclorito sódico) o procéselos en el autoclave a 121°C durante 30 minutos a una presión de 15 psi.
- 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 debe protegerse de la luz fuerte o directa.
- No permita que los pocillos de microensayo se sequen una vez iniciado el ensayo.
- Al eliminar líquidos de los pocillos de microensayo, no raspe ni toque el fondo de los pocillos.

- Las muestras inactivadas por calor pueden dar resultados erróneos.
- Las muestras 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.
- 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](http://quidel.com).

## CONSERVACIÓN

Conserve el kit sin abrir a 2°C a 8°C. Deje que los reactivos y los materiales se estabilicen a 15°C a 30°C antes de su uso. Vuelva a colocar las tiras no requeridas en la bolsa de conservación, séllela y guárdela a 2°C a 8°C.

## INDICACIONES DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

El color del concentrado de sustrato puede variar de incoloro a verde claro e incluso verde oscuro. No obstante, la solución de sustrato recién preparada debe ser incolora o de un color verde claro. Un color verde oscuro indica que el reactivo 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 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.**

Es fundamental recoger, procesar y almacenar las muestras de forma adecuada ya que el C4d es susceptible a proteólisis en muestras mal recogidas o almacenadas.

Los valores normales para las muestras de suero son ligeramente más altos que los obtenidos con muestras de plasma EDTA equivalentes. En consecuencia, los niveles de C4d en el plasma EDTA pueden representar con más exactitud las concentraciones *in vivo*.

Las muestras de suero o plasma EDTA deben recogerse utilizando técnicas asépticas convencionales. Deben analizarse de inmediato o guardarse a 4°C o sobre hielo hasta el momento de su análisis. En este último caso, el tiempo de conservación no debe superar las cuatro horas.

Para conservarlas por tiempos más prolongados, el suero o el plasma deben congelarse a -70°C o a una temperatura inferior dentro de las dos horas de recogidas. Las muestras congeladas deben analizarse lo antes posible después de descongelarlas o guardarse en hielo (no más de cuatro horas) hasta su ensayo.

También puede utilizarse una **Solución Estabilizadora de la Muestra** (código A9576) para preparar las muestras de suero y plasma humanos para su conservación. Este producto es exclusivo de Quidel y requiere mezclar la muestra con la solución en una proporción 1:1 antes de congelarla. Si lo desea, puede solicitar información técnica adicional sobre esta solución.

Las muestras congeladas deben analizarse lo antes posible después de descongelarlas o guardarse en hielo (no más de cuatro horas) hasta su ensayo. Se recomienda no congelar y descongelar la muestra varias veces.

## PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

**Deje que todos los reactivos y materiales se estabilicen a 15°C a 30°C antes de su uso.**

Tras retirar los reactivos y materiales necesarios, vuelva a guardar los elementos no utilizados a la temperatura correspondiente indicada (vea la sección *CONSERVACIÓN*).

Vea en la Tabla 1 las cantidades de reactivos y materiales requeridas por número de pocillos.

### 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 turbidez, deseche el reactivo.

### Selección de las tiras de microensayo

Determine la cantidad de pocillos requeridos para el ensayo. Se recomienda realizar el ensayo de los pocillos testigo, controles y patrones por duplicado. 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 utilizara en el ensayo.

### Reconstitución de los patrones y controles de C4d

Añada 2,0 ml de reactivo hidratante a cada patrón (A-E), al control bajo y al control alto. Deje que los viales reconstituidos se rehidraten durante al menos 15 minutos a 15°C a 30°C y, a continuación, mézclelos bien. Evite la formación de espuma o burbujas al mezclar. Los patrones y controles reconstituidos son estables durante 30 días cuando se los conserva a 2°C a 8°C.

### Dilución de muestras

**Atención: trate todas las muestras utilizando las precauciones universales. No utilice muestras inactivadas por calor o contaminadas ni muestras mal conservadas.**

Prepare una dilución adecuada de cada muestra utilizando el diluyente de muestras de complemento (vea la sección *Cálculo de los resultados*). Se recomienda utilizar una dilución de 1:70 para las muestras normales. Mezcle bien pero evite la formación de espuma y burbujas. No guarde ni vuelva a utilizar las muestras diluidas.

### 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 4 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

rápida mente 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.

## Preparación de la solución de sustrato

Prepare inmediatamente antes de usar. Determine el volumen de solución de sustrato requerido según la Tabla 1. (Necesitará 1 ml de solución de sustrato por tira o 125 µL/pocillo.) Prepare la solución de sustrato añadiendo 50 µL de concentrado de sustrato por cada ml de diluyente de sustrato. Mezcle bien. No prepare la solución de sustrato hasta el paso 8 del Procedimiento de ensayo. Si la solución de sustrato toma un color verde oscuro antes de utilizarla, deséchela y prepare solución fresca en un recipiente limpio.

**Tabla 1. Requisitos de los Reactivos**

Pocillos <sup>1</sup>	Tiras de 8 pocillos	Volumen de solución de sustrato (ml)	Concentrado de sustrato (µL)
16	2	2,0	100
24	3	3,0	150
32	4	4,0	200
40	5	5,0	250
48	6	5,0	250
56	7	6,0	300
64	8	7,0	350
72	9	8,0	400
80	10	9,0	450
88	11	9,0	450
96	12	10,0	500

<sup>1</sup> Determine la cantidad de muestras que desea analizar y añada quince (15) pocillos para los cinco patrones y los controles bajos y altos 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 la sección PREPARACION DE LOS REACTIVOS y ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.*

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 250-300 µL de solución de lavado a cada pocillo utilizando una botella para lavado o un dispositivo de llenado automático.
  - b. Incube a 15°C a 30°C durante un minuto.
  - c. Elimine el líquido de cada pocillo.
  - d. Añada aproximadamente 250-300 µL de solución de lavado a cada pocillo.
  - e. Aspire el contenido de cada pocillo.
  - f. Repita los pasos d y e una vez más.**
  - g. Invierta la placa y golpéela con fuerza sobre papel absorbente dos veces para eliminar el líquido restante.

3. Seleccione uno o más pocillos para utilizar como pocillo testigo. Añada 100  $\mu\text{L}$  de diluyente de muestras de complemento a los pocillos testigo que se utilizarán con el lector de placa.
4. Añada 100  $\mu\text{L}$  de cada patrón de C4d reconstituido (A, B, C, D, E), control o muestra diluida a los pocillos asignados.
5. Incube a 15°C a 30°C durante  $30 \pm 1$  minutos.
6. Lave los pocillos de microensayo como se indica a continuación:
  - a. Después de la incubación del paso 5 (o del paso 8 a continuación), elimine el líquido de cada pocillo.
  - b. Añada aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  de solución de lavado a cada pocillo utilizando una botella para lavado o un dispositivo de llenado automático.
  - c. Incube los pocillos durante 1 minuto a 15°C a 30°C.
  - d. Elimine el líquido de cada pocillo.
  - e. Añada aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  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 del quinto ciclo de lavado, invierta la placa y golpéela con fuerza sobre papel absorbente dos veces para eliminar todo el líquido restante.
7. Utilizando una pipeta multicanal o de repetición, aplique 50  $\mu\text{L}$  de C4d en cada pocillo de ensayo lavado, incluyendo los pocillos testigo.
8. Incube las tiras de microensayo a 15°C a 30°C durante  $30 \pm 1$  minutos. Prepare la solución de sustrato durante la incubación (vea la sección *PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS*).
9. Lave los pocillos de microensayo después de la incubación de 30 minutos del paso 8, tal como se describe en la sección *PROCEDIMIENTO DE ENSAYO*, paso 6.
10. Inmediatamente después del procedimiento de lavado, aplique 100  $\mu\text{L}$  de la solución de sustrato recién preparada a cada pocillo, incluyendo los pocillos testigo.
11. Incube las tiras de microensayo a 15°C a 30°C durante  $30 \pm 1$  minutos.
12. Añada 50  $\mu\text{L}$  de 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.
13. 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 12), realizando la corrección en blanco necesaria.
14. Determine la concentración de las muestras y los controles a partir de la curva estándar.
15. Deseche las muestras y controles diluidos restantes y las puntas de microensayo usadas (vea la sección *ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES*).

## CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan el uso de controles para asegurarse de que el ensayo funciona correctamente. Cada kit C4d contiene controles altos y bajos que pueden utilizarse para este propósito. Estos controles deben analizarse al menos una vez en cada kit. Asimismo, el prospecto del producto requiere que la curva estándar generada con los patrones del kit cumplan con estrictos requisitos de validación. Si el ensayo no cumple con estos requisitos, repítalo o póngase en contacto con el Servicio técnico de Quidel.

El certificado de análisis incluido en este kit es específico a este lote y debe emplearse para verificar que los resultados obtenidos por su laboratorio son similares a los obtenidos por Quidel. Se proporcionan los valores de densidad óptica, pero deberán utilizarse únicamente a efectos orientativos. Los resultados obtenidos por su laboratorio pueden ser diferentes.

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



## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### Cálculo de los resultados

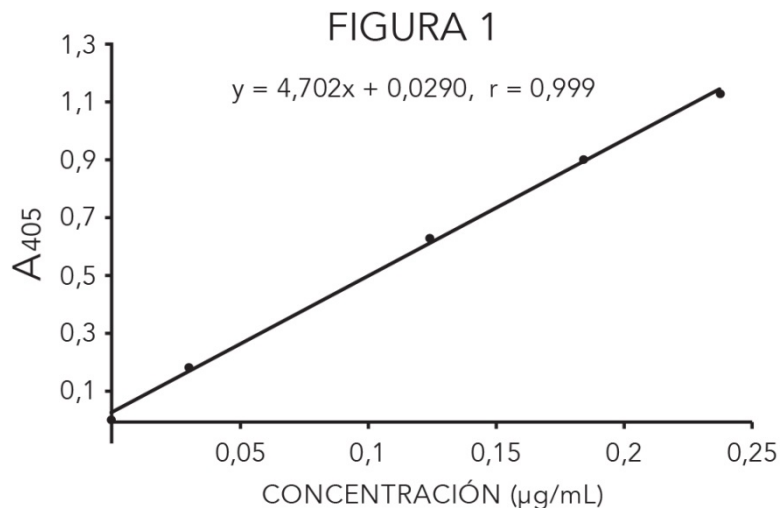
Por lo general, una dilución 1:70 de plasma o suero humanos normales funciona de forma óptima con el kit de inmunoensayo de C4d. Las muestras de plasma o suero enteras pueden diluirse de 1:40 a 1:100, con una cuantificación total y exacta del analito de C4d. Las muestras de plasma o suero normales diluidas a más de 1:100 pueden dar valores de  $A_{405}$  inferiores a 0,1, lo cual puede dar resultados erróneos.

Según la concentración de la muestra y el diseño experimental, puede ser necesario diluir aún más las muestras (a diluciones más altas) para obtener valores de  $A_{405}$  dentro del intervalo de los patrones del kit y poder calcular la concentración de analito de C4d. Como alternativa, el nivel de C4d puede informarse como mayor o igual al máximo calculable para la dilución particular analizada.

**Uso de la curva estándar:** la curva estándar del enzoinmunoensayo de C4d se genera utilizando el valor  $A_{405}$  sustraído del testigo de cada patrón (en el eje Y) en función de la concentración asignada a 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). 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 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 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.

### Curva representativa estándar



### Validación

Determine la pendiente, intersección y coeficiente de correlación de la línea de ajuste óptimo derivada para los patrones del kit C4d. Los valores deben encontrarse dentro de los intervalos especificados para aprobar el ensayo:

---

coeficiente de correlación( $r$ ):  $> 0,95$   
pendiente ( $m$ ): entre 3,32 y 6,50  
Intersección Y ( $b$ ): entre  $(-)$ 0,056 y 0,063

---

Consulte en las etiquetas de los viales el intervalo de concentración de C4d aceptable para los controles bajo y alto.

## LIMITACIONES

Este kit es para uso investigativo únicamente y no está diseñado para procedimientos de diagnóstico.

El enzimoimmunoensayo C4d Fragment de MicroVue se ha utilizado para analizar muestras recogidas como suero o plasma en anticoagulante EDTA. No se han analizado otros anticoagulantes.

## VALORES DE REFERENCIA

Se analizaron ochenta (80) muestras de plasma EDTA (diluidas 1:70 en diluyente de muestras) y cincuenta y cuatro (54) muestras de suero (diluidas 1:70 en diluyente de muestras) con el enzimoimmunoensayo C4d Fragment de MicroVue. A continuación se indican los intervalos para las muestras de plasma y suero.

	n	Media	Intervalo	
			± 2 DE	± 3 DE
Plasma EDTA	80	3,5	0,7 µg-6,3 µg/ml	0-7,7 µg/ml
Serum	54	4,6	1,2 µg-8,0 µg/ml	0-9,7 µg/ml

## RENDIMIENTO DE LA PRUEBA

### Límites

**LOD:** el límite de detección del ensayo C4d es de 0,001 µg/ml, determinado por el límite superior de DE 3 en un estudio de patrón cero.

**LLOQ:** el límite de cuantificación inferior del ensayo C4d es de 0,022 µg/ml, la concentración más baja en la curva estándar que cumplió con los criterios de la NCCLS de exactitud y precisión.

### Sustancias que interfieren

Se analizaron el citrato de sodio y el EDTA tetrasódico en concentraciones de 1000 mg/dl y 800 mg/dl, respectivamente, y no se comprobaron interferencias con el ensayo.

### Precisión

Se determinó la precisión intra-ensayo e inter-ensayo analizando 20 réplicas de 3 muestras de plasma en 9 ciclos diferentes.

C4d (µg/ml)	Intra-ensayo <sup>1</sup> C.V. (%)	Inter-ensayo <sup>2</sup> C.V. (%)
4,4	9,7	11,2
4,7	7,4	8,8
7,9	6,1	8,5

<sup>1</sup>n=20 réplicas    <sup>2</sup>n=9 ciclos

### Linealidad

Se realizó la linealidad mezclando una muestra de plasma elevado con una muestra de plasma bajo en diferentes proporciones para crear niveles de analito intermedios. La recuperación promedio fue de 92,7% con un intervalo absoluto de 87,0-99,0%.

## ASISTENCIA

Para realizar un pedido o solicitar asistencia técnica, póngase en contacto con un representante de Quidel en el 800.874.1517 (en los EE. UU.) o en el 858.552.1100 (en otros países), de lunes a viernes, de 8:00 de la mañana a 5:00 de la tarde, horario del este. Los pedidos se pueden realizar también por fax en el 740.592.9820. Para recibir servicio técnico por correo electrónico, póngase en contacto con [customerservice@quidel.com](mailto:customerservice@quidel.com) o [technicalsupport@quidel.com](mailto:technicalsupport@quidel.com).

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 [www.quidel.com](http://www.quidel.com).

## REFERENCIAS

1. Müller-Eberhard, H.J. 1975. Complement. *Annu. Rev. Biochem.* 44:697.
2. Cooper, N.R. 1985. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol.* 37:151
3. Gorski, J.P., Hugli, T.E., and Müller-Eberhard, H.J. 1979. C4a: The third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc. Natl. Acad., Sci, (USA)* 76:5299.
4. Bokisch, V.A. and Sobel, A.T. 1974. Receptor for the fourth component of complement on human B lymphocytes and cultured human lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* 140: 1336.
5. Fearon, D.T. 1977. Purification of C3b inactivator and demonstration of its two polypeptide chain structure. *J. Immunol.* 119: 1248.
6. Scharfstein, J., Ferreira, A., Gigli, I., and Nussenzweig, V. 1978. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J. Exp. Med.* 148:207.
7. Medof, M.E., and Nussenzweig, V. 1984. Control of the function of substrate-bound C4b-C3b by the complement receptor Cr1. *J. Exp. Med.* 159:1669.
8. Ross, G.D., and Medof, M.E. 1985. Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3. *Adv. Immunol.* 37:217.
9. Fujita, T., Gigli, I., and Nussenzweig, V. 1978. Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b Inactivator. *J. Exp. Med.* 148: 1044.
10. Nagasawa, S., Ichihara, C., and Stroud, R.M. 1980. Cleavage of C4b by C3b inactivator: production of a nicked form of C4b, C4b', as an intermediate cleavage product of C4b by C3b inactivator. *J. Immunol.* 125:578.
11. Milgrom, H., Curd, J.G., Kaplan, R.A., Müller-Eberhard, H.J., and Vaughan, J.H. 1980. Activation of the fourth component of complement (C4): assessment by rocket immunoelectrophoresis and correlation with the metabolism of C4. *J. Immunol.* 124:2780.
12. Nitsche J. F., Tucker, E.S., Sugimoto, S., Vaughan, J.H., and Curd, J.G. 1981. Rocket immunoelectrophoresis of C4 and C4d. A simple sensitive method for detecting complement activation in plasma. *Am. J. Clin. Path.* 76:679.
13. Perrin, L.H., Shiraishi, S., Stroud, R.M., and Lambert, P.H. 1975. Detection and quantitation in plasma and synovial fluid of a fragment of human C4 with  $\alpha$  mobility generated during the activation of the complement system. *J. Immunol.* 115:32.
14. Tucker, E.S. 1984. Complement activation in autoimmune disease. *J. Clin. Immunol.* 7:310.
15. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
16. Centers for Disease Control/National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. U.S. *Department of Health and Human Services*, 2007.

**REF** A008 – MicroVue C4d 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**

**PIA008002ES00 (08/19)**

## 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

---