

**Um imunoenensaio enzimático para a quantificação de fragmentos contendo C4d de C4 activado pela via clássica do complemento**

Só para uso diagnóstico *in vitro*. Apenas para exportação. Não se destina a venda ou utilização nos Estados Unidos ou Canadá.

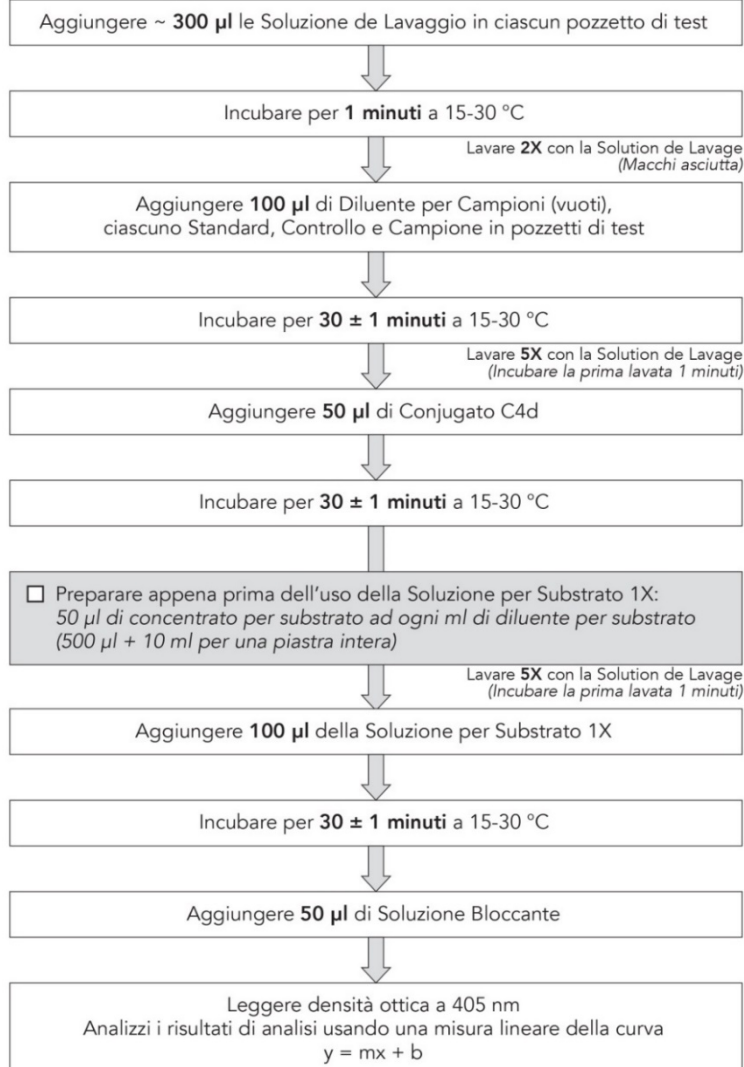
Pode encontrar um glossário dos símbolos em [quidel.com/glossary](http://quidel.com/glossary).

## SUMÁRIO

### Preparato di il Campione ed il reagente

- Diluire la Soluzione di Lavaggio Concentrato 1:20 con acqua deionizzata
- Reidrati ogni Standard e Controllo con 2,0 ml di Reagente Idratante (*miscela delicatamente ed lasciare reidratare 15 minuti*)
- Diluire il Campioni 1:70 con il Diluente per Campioni di Complemento (10 µl + 690 µl) (*Aggiungere in pozzetti di test entro 30 minuti*)

### Procedura del Saggio



## RESUMO E EXPLICAÇÃO

O imunoensaio enzimático de fragmentos de C4d da MicroVue mede a quantidade de fragmentos de activação contendo C4d (C4b, iC4b e C4d) presente no soro humano, plasma EDTA e outras amostras biológicas ou experimentais.

O quarto componente do complemento consiste numa das proteínas do plasma que é exclusiva da activação do complemento pela via clássica.<sup>1</sup> A activação pela via clássica é desencadeada com a ligação do subcomponente de C1q de C1 aos complexos imunes contendo IgG ou IgM. Além disso, o C1 é ligado e activado por uma variedade de outras substâncias incluindo retrovírus, determinadas bactérias, parasitas, células transformadas, membranas subcelulares, polianiões (DNA) e proteína C reactiva em complexo com fosforilcolina.<sup>2</sup> A ligação de C1 a estes activadores da via clássica resulta na conversão do subcomponente C1s da proenzima numa enzima proteolítica activa (C1s). O C1s cliva a cadeia  $\alpha$  de C4 na ligação peptídica 77 resultando na produção de fragmentos C4a e C4b com pesos moleculares de 9.000 e 191.000, respectivamente. O fragmento C4a é um das anafilatoxinas do complemento.<sup>3</sup> O fragmento C4b possui numerosas actividades biológicas importantes.<sup>1,4</sup> Estas actividades incluem a mediação da acentuada fagocitose de alvos activadores do complemento por glóbulos brancos (opsonização) e a participação da ligação C3 e C5 convertase pela via clássica, o que dá origem à activação do componente terminal e subsequente lise mediada pelo complemento de microorganismos alvo e outras células.

A expressão das actividades biológicas de C4b é rigorosa-mente regulada. Por consequência, a possibilidade de C4b participar na activação pela via clássica e nas reacções de opsonização é inibida pela clivagem num único local da cadeia  $\alpha$  de C4b pelo factor I.<sup>5</sup> Esta reacção requer a proteína de ligação de C4 (C4bp)<sup>6</sup> ou o receptor do complemento CR1 como um cofactor.<sup>7,8</sup> C4bp é uma proteína<sup>9</sup> de controlo do complemento e CR1 é o receptor de C3b/C4b encontrado nos eritrócitos, granulócitos, monócitos e macrófagos.<sup>8</sup> A clivagem pelo factor I de C4b produz C4b inactivado, denominado iC4b.<sup>7-10</sup> O iC4b pode ser posteriormente degradado pelo factor I, com a cooperação de fragmentos C4bp ou CR1 a C4c e C4d.<sup>6-10</sup> Os fragmentos C4c e C4d, que se podem produzir na fase líquida, assim como em superfícies alvo, parecem ser os produtos de degradação fisiológica final de C4b.<sup>1,6-10</sup>

O C4d tem sido quantificado em amostras de soro e plasma humanos. Os níveis de C4d, quando normalizados para a presença de C4 endógeno, podem ser significativamente elevados em amostras de plasma obtidas a partir de alguns doentes com artrite reumatóide, angioedema hereditário, lúpus eritematoso disseminado ou urticária crónica com hipocomplementemia.<sup>11,12</sup> Os níveis de C4d podem também ser elevados nos fluidos corporais<sup>13</sup> e amostras de plasma colhidas em doentes em que se sabe ocorrer activação do complemento pela via clássica, por exemplo, em doentes com uma diversidade de doenças autoimunes humorais,<sup>14</sup> septicemia, lesões térmicas, lesões em múltiplos órgãos, enfartes do miocárdio, angioedema hereditário, glomerulonefrite e síndrome de insuficiência respiratória aguda. A correlação entre os níveis do fragmento de activação de C4d e o estado ou prognóstico clínico dos doentes com estas e outras patologias ainda não foi determinada.

O imunoensaio enzimático de fragmento de C4d da MicroVue constitui um procedimento quantitativo altamente específico, imediato e não radioactivo, para a medição da activação de C4. Por este motivo, este teste destina-se a investigações cujo objecto de estudo é o papel ou o estado da activação do complemento pela via clássica em inúmeros ambientes de investigação e clínicos e para a monitorização da produção de fragmentos contendo C4d *in vitro* ou *in vivo*.

## PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO DE ENSAIO

O imunoensaio enzimático de fragmento de C4d da MicroVue para a quantificação de C4d no plasma, soro humanos ou amostras experimentais, é um procedimento em três passos que utiliza (1) uma placa de microensaio revestida com anticorpo monoclonal de rato que liga especificamente aos fragmentos de activação contendo C4d de C4 humano, (2) anti-C4d humano de caprino conjugado a HRP e (3) um substrato cromogénico.

No primeiro passo, são adicionados padrões, controlos e amostras de teste aos poços do microensaio com um anticorpo monoclonal anti-C4d específico. O C4d presente nos padrões, controlos ou amostras, ligar-se-á ao anti-C4d imobilizado. Após a incubação, um ciclo de lavagem remove o material não ligado.

No segundo passo, é acrescentado anticorpo anti-C4d de caprino conjugado a HRP a cada poço do teste. O anti-C4d conjugado com enzimas liga ao C4d que foi capturado pela ligação anti-C4d monoclonal na superfície dos poços do microensaio. Após a incubação, um ciclo de lavagem remove o excesso de conjugado não ligado.

No terceiro passo, é acrescentado um substrato cromogénico de enzimas a cada poço do microensaio. O conjugado HRP ligado reage com o substrato formando uma cor verde. Após a incubação, a reacção enzimática é quimicamente interrompida e a intensidade da cor é medida espectrofotometricamente a 405 nm. A intensidade da cor da mistura de reacção é proporcional à concentração de C4d presente nas amostras de teste, padrões e controlos.

## REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

### 96 ensaios para o fragmento C4d

O kit EIA de fragmento de C4d da MicroVue contém o seguinte:

<b>A</b>	<b>Padrões de C4d</b>	<b>Referências A4638 – A4642</b>	<b>5 x 2 ml</b>
	(Liofilizados) Contém soro humano com quantidades conhecidas de fragmentos contendo C4d em PBS e estabilizadores de proteínas		
<b>H</b>	<b>Controlos altos</b>	<b>Referência A9572</b>	<b>2 x 2 ml</b>
	(Liofilizados) Contém soro humano com fragmentos contendo C4d diluídos em PBS e estabilizadores de proteínas		
<b>L</b>	<b>Controlos baixos</b>	<b>Referência A9573</b>	<b>2 x 2 ml</b>
	(Liofilizados) Contém soro humano com fragmentos contendo C4d diluídos em PBS e estabilizadores de proteínas		
<b>1</b>	<b>Tiras revestidas</b>	<b>Referência A9567</b>	<b>12 de cada</b>
	12 tiras de oito poços separáveis, revestidas com anticorpo monoclonal de ratinho específico para C4d humano numa bolsa de papel de alumínio com fecho reutilizável		
<b>2</b>	<b>Solução de paragem</b>	<b>Referência A3673</b>	<b>6 ml</b>
	Contém 250 mm de ácido oxálico		
<b>3</b>	<b>Concentrado de solução de lavagem 20X</b>	<b>Referência A9957</b>	<b>2 x 50 ml</b>
	Contém solução tampão salina concentrada de fosfato (PBS), 1,0 % de Tween-20® e 0,035 % de ProClin® 300		
<b>4</b>	<b>Diluyente de amostra</b>	<b>Referência A3670</b>	<b>50 ml</b>
	Contém PBS, 0,05 % de estabilizadores de proteínas Tween-20 e 0,035 % de ProClin 300		
<b>5</b>	<b>Diluyente de substrato</b>	<b>Referência A3672</b>	<b>25 ml</b>
	Contém 0,1m de tampão citrato e 0,05 % de H2O2		
<b>6</b>	<b>Concentrado de substrato</b>	<b>Referência A3671</b>	<b>1,5 ml</b>
	Contém 0,7 % de ácido 2-2'-Azino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfónico), persulfato de amónio		
<b>7</b>	<b>Conjugado de C4d</b>	<b>Referência A9945</b>	<b>2 x 3 ml</b>
	Contém anti-C4d humano (caprino) conjugado a peroxidase em tampão de estabilização com conservante		
<b>8</b>	<b>Reagente de hidratação</b>	<b>Referência A3675</b>	<b>25 ml</b>
	Contém 0,035 % de ProClin 300		

Tween-20® e uma marca comercial da ICI Americas Inc.  
ProClin® e uma marca comercial 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 da densidade óptica entre 0,0 e 2,0
- Água desionizada ou destilada

## ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Apenas para fins de investigação nos EUA. Não se destina à utilização em procedimentos de diagnóstico (apenas nos EUA).
- 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.
- Cada unidade dadora utilizada na preparação de padrões e soros de controlo deste produto foi testada (de acordo com os métodos aprovados pela FDA) em relação à presença do anticorpo do vírus da imunodeficiência humana (VIH1 e VIH2) e vírus da hepatite C, bem como ao antigénio de superfície da hepatite B. Uma vez que não existe qualquer método de teste que possa garantir a total ausência de agentes infecciosos, estes reagentes devem ser manuseados ao Nível 2 da Biosegurança, tal como é recomendado para soro humano ou amostras de sangue potencialmente infecciosos no manual dos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças/Instituto Nacional de Saúde "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 2007.
- 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 ou reagentes.
- 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 tem que ser protegido de luz forte ou directa.
- Não permitir que os poços do microensaio sequem depois de iniciar o ensaio.
- Ao remover líquido dos poços do microensaio, não raspar nem tocar no fundo dos poços.

- As amostras inactivadas pelo calor podem produzir resultados erróneos.
- As amostras hiperlipémicas 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.
- Deve ser utilizado um frasco de lavagem ou dispositivo de lavagem automático para lavar a placa (*PROCEDIMENTO DE ENSAIO*, passo 6). Para melhores resultados, não utilizar uma pipeta multicanal para lavar a placa do microensaio.
- Os testes devem ser realizados numa área com ventilação adequada.
- 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](http://quidel.com).

## ARMAZENAMENTO

Conservar o kit não aberto a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C. Colocar os reagentes e os materiais a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C antes de os utilizar. Colocar todas as tiras do microensaio na bolsa de conservação, selar a bolsa e conservar a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C.

## INDICAÇÕES DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES

O concentrado de substrato irá variar na cor, desde incolor a verde pálido ou até mesmo verde-escuro. No entanto, a solução de substrato acabada de preparar deverá apresentar uma cor entre incolor a verde pálido. Uma cor verde-escuro indica que o reagente se deteriorou, deve ser eliminado e que deve ser preparada uma nova solução de substrato num recipiente de vidro limpo.

A turvação da solução de lavagem 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.**

A colheita, o processamento e a conservação correctos das amostras são essenciais, uma vez que o C4d é susceptível a proteólise em amostras inadequadamente colhidas ou conservadas.

Os valores normais das amostras de soro são ligeiramente mais elevados do que os obtidos com amostras de plasma EDTA combinadas. Os níveis de C4d no plasma EDTA poderão, por isso, representar de forma mais precisa as concentrações *in vivo*.

As amostras de soro ou de plasma EDTA devem ser colhidas assepticamente utilizando as técnicas padrão. As amostras devem ser testadas imediatamente ou conservadas a uma temperatura de 4 °C ou em gelo até à realização do ensaio. No entanto, esta conservação a curto prazo em gelo não deve exceder as quatro horas.

Para uma conservação por um período mais longo, o soro ou plasma devem ser congelados a uma temperatura de -70 °C ou inferior, no prazo de duas horas após a colheita.

As amostras congeladas devem ser testadas o mais rapidamente possível depois de serem descongeladas ou conservadas em gelo seco (por um período não superior a quatro horas) antes da realização do ensaio.

A **Solução de Estabilização de Amostra** (item n.º A9576) pode também ser utilizada para preparar amostras de soro ou plasma humanos para conservação. A utilização correcta deste produto, disponível apenas através da Quidel, requer que a amostra seja misturada numa proporção 1:1 com a solução antes de ser congelada. É possível obter informações técnicas adicionais mediante pedido.

As amostras congeladas devem ser testadas o mais rapidamente possível depois de serem descongeladas ou conservadas em gelo seco (por um período não superior a quatro horas) antes da realização do ensaio. A congelação e descongelação repetidas são desaconselhadas.

## PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

**Permitir que todos os reagentes e os materiais atinjam uma temperatura entre 15 °C e 30 °C antes de os utilizar.**

Depois de retirar os reagentes e materiais necessários, voltar a colocar os materiais não utilizados nas respectivas temperaturas de conservação (ver *ARMAZENAMENTO*).

Consultar no quadro 1 as quantidades de reagentes e materiais necessários por número de poços.

### 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 e, depois, misturar bem o conteúdo. Preparar a solução de lavagem, diluindo todo o conteúdo de um dos frascos de concentrado de solução de lavagem 20X num litro de água destilada ou desionizada. Misturar 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.

### Seleção das tiras do microensaio

Determinar o número de poços necessário para o ensaio. Os poços em branco, controlos e padrões devem ser testados em duplicado. Retirar o retentor de tiras da placa montada. Retirar as tiras não necessárias e colocá-las na bolsa de conservação, voltar a selar a bolsa e conservar entre 2 °C e 8 °C. Guardar as tiras a utilizar no ensaio em local seguro.

### Reconstituição de padrões e controlos de C4d

Adicionar 2,0 ml de reagente de hidratação a cada padrão (A-E) e aos controlos baixo e alto. Deixar que os frascos reconstituídos rehidratem durante, pelo menos, 15 minutos a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C. Misturar bem. Evitar a formação de espuma ou bolhas durante a mistura. Os padrões e controlos reconstituídos mantêm-se estáveis durante 30 dias quando conservados a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C.

### Diluição de amostras

**ATENÇÃO: manusear as amostras, seguindo as precauções universais. Não utilizar amostras inactivadas pelo calor, contaminadas ou que tenham sido incorrectamente conservadas.**

Preparar uma diluição adequada de cada amostra, utilizando o diluente de amostra do complemento (ver Cálculo dos resultados). Recomenda-se uma diluição numa proporção de 1:70 para as amostras normais. Misturar bem, contudo, evitando a formação de espuma e bolhas. Não armazenar nem reutilizar amostras diluídas.

### Adição de amostras diluídas aos poços de microtitulação

Pode ser utilizado um de dois métodos para adicionar amostras diluídas, padrões, controlos e tampão, aos poços (ver passo 4 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. (Pode ser convenientemente utilizada uma pipeta multicanal 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 anticorpos, 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 anticorpos, 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.

## Preparação da solução de substrato

Preparar imediatamente antes de utilizar. Determinar o volume necessário de solução de substrato no quadro 1. (Será necessário 1 ml de solução de substrato por tira ou 125 µL/poço.) Preparar a solução de substrato, adicionando 50 µL de concentrado de substrato a cada ml de diluente de substrato. Misturar bem. Não preparar a solução de substrato até chegar ao passo 8 do procedimento de ensaio. Se a solução de substrato ficar verde-escuro antes de utilizar, eliminá-la, e criar nova solução num recipiente limpo.

**Quadro 1. Requisitos Dos Reagentes**

Poços <sup>1</sup>	Tiras de 8 poços	Volume de substrato necessário (ml)	Concentrado de substrato (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>Determinar o número de amostras a testar e adicionar quinze (15) poços para os cinco padrões, os controlos alto e baixo a testar (em duplicado) e um poço em branco. Os controlos e padrões duplicados devem ser 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 e ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES*.

1. Registrar as posições dos poços do microensaio correspondentes ao(s) poço(s) em branco, todas as amostras de teste, padrões e controlos, 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 250-300 µL de solução de lavagem a cada poço, utilizando um frasco de lavagem ou dispositivo de enchimento automático.
  - b. Incubar a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C durante um minuto.
  - c. Remover o líquido de cada poço.
  - d. Adicionar cerca de 250-300 µL de solução de lavagem a cada poço.
  - e. Aspirar o conteúdo de cada poço.

**f. Repetir as etapas d-e mais uma vez.**

- g. Inverter a placa e bater firmemente duas vezes em papel absorvente para remover restos de líquido.
3. Seleccionar um ou mais poços para servir de espaço em branco. Adicionar 100 µL de diluente de amostra 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, D, E) de C4d reconstituído, controlo ou amostra diluída aos respectivos poços.
  5. Incubar a uma temperatura de 15 °C a 30 °C durante 30 ± 1 minutos.
  6. Lavar os poços do microensaio do modo a seguir indicado:
    - a. Após a incubação no passo 5 (ou no passo 8 acima) remover o líquido de cada poço.
    - b. Adicionar cerca de 300 µL de solução de lavagem a cada poço, utilizando um frasco de lavagem ou dispositivo de enchimento automático.
    - c. Incubar os poços durante 1 minuto a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C.
    - d. Remover o líquido de cada poço.
    - e. Adicionar cerca de 300 µL de solução de lavagem a cada poço.
    - f. Remover o líquido 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.
  7. Utilizando uma pipeta multicanal ou de repetição, colocar 50 µL de conjugado de C4d em cada poço de teste lavado, assim como no(s) poço(s) em branco.
  8. 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*).
  9. Lavar os poços do microensaio após o período de incubação de 30 minutos (passo 8), tal como é descrito em *PROCEDIMENTO DO ENSAIO*, passo 6.
  10. Imediatamente após o procedimento de lavagem, colocar 100 µL da solução de substrato acabada de preparar em cada poço, incluindo o(s) poço(s) em branco.
  11. Incubar as tiras do microensaio a uma temperatura de 15 °C a 30 °C durante 30 ± 1 minutos.
  12. 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 o desenvolvimento da cor.
  13. Determinar a leitura da absorvância a 405 nm (valor  $A_{405}$ ) para cada poço de teste, uma hora após a adição da solução de paragem (passo 12), fazendo as necessárias correcções aos itens em branco.
  14. Determinar a concentração de amostras e controlos a partir da curva padrão.
  15. Eliminar as restantes amostras e controlos diluídos, bem como as tiras do microensaio utilizadas (ver *ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES*).

## CONTROLO DE QUALIDADE

As boas práticas laboratoriais recomendam a utilização de controlos para assegurar a eficácia do ensaio. Cada kit de C4d contém controlos alto e baixo que podem ser utilizados para este fim. Estes controlos devem ser testados, pelo menos, uma vez para cada kit. Além disso, o folheto da embalagem requer que a curva padrão gerada com os padrões do kit cumpra os rigorosos requisitos de validação. Se o ensaio não cumprir estes requisitos, repetir o ensaio ou contactar a assistência técnica da Quidel.

O Certificado de Análise incluído neste kit é específico do lote e deve ser utilizado para verificar se os resultados obtidos pelo seu laboratório são semelhantes aos obtidos na Quidel. Os valores da densidade óptica são fornecidos e devem ser utilizados apenas como linha de orientação. Os resultados obtidos pelo seu laboratório podem ser diferentes.

São fornecidos intervalos para o controlo de qualidade. Os valores de controlo destinam-se a verificar a validade da curva e os resultados das amostras. Cada laboratório deve definir os seus próprios parâmetros para os limites aceitáveis dos ensaios. Se os valores de controlo NÃO estiverem dentro dos limites de



aceitação do laboratório, os resultados dos ensaios devem ser considerados questionáveis e as amostras devem ser repetidas.

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

### Cálculo dos resultados

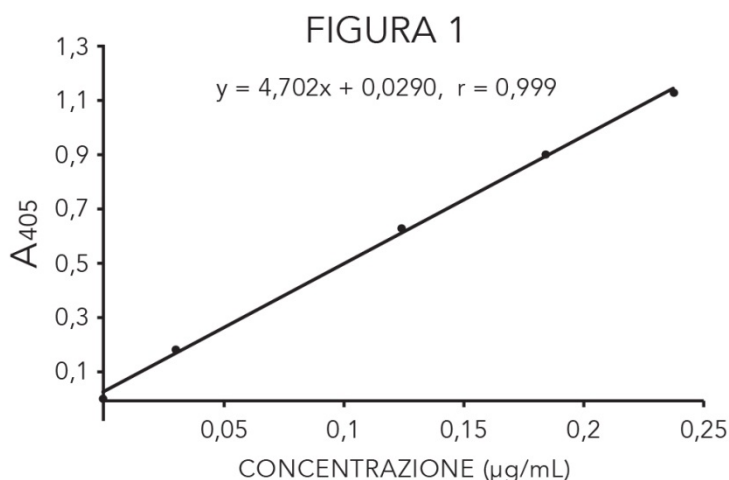
Em geral, verificou-se que uma diluição numa proporção de 1:70 de plasma ou soro humano normal funciona perfeitamente no kit EIA de C4d. As amostras de plasma ou soro total podem ser diluídas numa proporção de 1:40 a 1:100 com quantificação total e precisa do analito de C4d. As amostras de plasma ou soro normal diluídas numa proporção superior a 1:100 podem produzir valores  $A_{405}$  inferiores a 0,1 que, por sua vez, podem apresentar resultados incorrectos.

Dependendo da concentração da amostra e plano experimental, as amostras poderão ter que ser submetidas a maior diluição (ou seja, diluições mais elevadas) para produzir valores  $A_{405}$  dentro dos limites dos padrões do kit, para calcular a concentração analítica de C4d. Alternativamente, o nível de C4d pode ser referido como sendo superior ou igual ao máximo calculável para a diluição específica testada.

**Utilização da curva padrão:** a curva padrão para o EIA de C4d 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 (no eixo x). Após a regressão linear, a curva padrão gerada deve cumprir os requisitos de validação (ver abaixo). A maior parte dos computadores e calculadoras são capazes de realizar estes cálculos.

Em alternativa, os dados podem ser manualmente dispostos em gráficos e os valores ( $\mu\text{g/ml}$ ) das amostras de teste lidas directamente a partir da linha de melhor ajustamento da curva padrão. É apresentado um exemplo de uma curva padrão típica na figura 1.

### Curva padrão representativa



### Validação

Determinar a inclinação, a intercepção e o coeficiente de correlação da linha de melhor ajustamento obtida para os padrões do kit de C4d. Os valores devem encontrar-se dentro dos limites especificados para qualificar o ensaio:

---

coeficiente de correlação (r): > 0,95  
inclinação (m): entre 3,32 e 6,50  
intercepção y (b): entre (-)0,056 e 0,063

---

Consultar nos rótulos dos frascos os limites de concentração de C4d aceitáveis para os controlos alto e baixo.

## LIMITAÇÕES

Este kit destina-se unicamente a fins de investigação, pelo que não deve ser utilizado em procedimentos de diagnóstico.

O imunoensaio enzimático de fragmento de C4d da MicroVue tem sido utilizado para testar amostras colhidas como soro ou plasma em EDTA. Não foram testados outros anticoagulantes.

## VALORES EXEMPLIFICATIVOS

Foram testadas oitenta (80) amostras de plasma EDTA (diluídas numa proporção de 1:70 em diluente de amostra) e cinquenta e quatro (54) amostras de soro (diluídas numa proporção de 1:70 em diluente de amostra) no imunoensaio enzimático de fragmento de C4d da MicroVue. Os limites para as amostras de plasma e soro são indicados a seguir.

	n	Média	Limites	
			± 2 DP	± 3 DP
Plasma EDTA	80	3,5	0,7 µg-6,3 µg/ml	0-7,7 µg/ml
Soro	54	4,6	1,2 µg-8,0 µg/ml	0-9,7 µg/ml

## DESEMPENHO DO TESTE

### Limites

**LOD:** o limite de detecção (LOD) para o ensaio de C4d é de 0,001 µg/ml, determinado pelo limite superior de 3 DP num estudo de padrão zero.

**LLOQ:** o limite de quantificação inferior (LLOQ) para o ensaio de C4d é de 0,022 µg/ml, a concentração mais baixa na curva padrão que cumpriu os critérios NCCLS relativamente a exactidão e precisão.

### Substâncias interferentes

Foram testados citrato de sódio e EDTA tetrasódico em concentrações de 1000 mg/dl e 800 mg/dl respectivamente, tendo sido concluído que não interferem com o ensaio.

### Precisão

A precisão intra e entre ensaios foi determinada através da análise a 20 réplicas de 3 amostras de plasma em 9 ensaios diferentes.

C4d (µg/ml)	Intra-ensaios <sup>1</sup> C.V. (%)	Inter-ensaios <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 ensaios

### Linearidade

A linearidade foi realizada misturando uma amostra de plasma elevado com uma amostra de plasma reduzido em várias proporções para criar níveis intermédios de analito. A recuperação média foi de 92,7 % com limites absolutos de 87,0-99,0 %.

## ASSISTÊNCIA

Para fazer uma encomenda ou para obter assistência técnica, contacte um representante da Quidel através do número (800) 874-1517 (número grátis nos EUA) ou (858) 552-1100 (fora dos EUA), de segunda a sexta, entre as 8h00 e as 17h00 horas, horário da Costa Leste dos EUA. As encomendas também podem ser feitas

por fax pelo número (740) 592-9820. Para assistência via e-mail, contacte customerservice@quidel.com ou technicalsupport@quidel.com.

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

## REFERÊNCIAS

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**

**PIA008002PT00 (08/19)**

## 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

---