

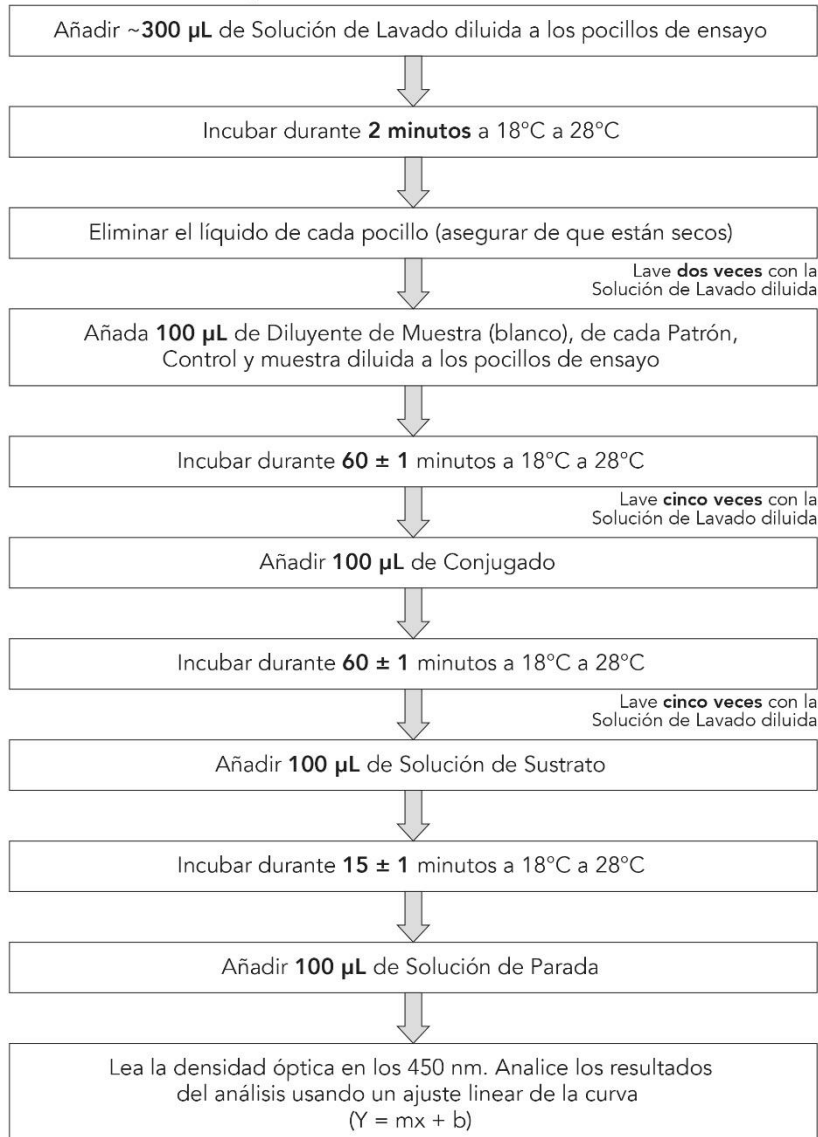
El MicroVue C5a enzoinmunoensayo mide la cantidad de C5a en suero o plasma humanos

RESUMEN

Preparación de los Reactivos y de las Muestras

- Diluir la Solución de Lavado Concentrado 1:20 con agua desionizada.
- Diluir las muestras de suero 1:50 en el Diluyente de Muestras (e.g. 10 µL + 490 µL).
- Diluir las muestras de plasma 1:20 en el Diluyente de Muestras (e.g. 20 µL + 380 µL).

Procedimiento de ensayo





USO PREVISTO

El MicroVue C5a enzimoimmunoensayo mide la cantidad de C5a en suero o plasma humanos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El enzimoimmunoensayo MicroVue C5a es una prueba de captura directa con 96 pocillos para la medición de C5a en suero o plasma humanos.

En condiciones normales, la activación de la vía clásica o alternativa del complemento resulta en la formación de una C5 convertasa multimolecular capaz de fragmentar C5 en C5a y C5b.^{1,2} C5b es un constituyente clave del Complejo Terminal del Complemento con varias funciones. C5a es una molécula de bajo peso molecular (aproximadamente 9kD) con 74 aminoácidos.³ C5a es metabolizado rápidamente por la enzima carboxypeptidasa del suero a una C5a Arg más estable y menos activa.^{2,3} Por conveniencia, se referirá a las dos formas como "C5a."

MicroVue C5a, que proporciona un método de medición de niveles de C5a rápido altamente específico, es utilizado para la investigación del estado de la activación de la vía terminal del complemento y para la monitorización de la generación de C5a *in vivo* o *in vitro*.⁴ Como el más potente de las anafilotoxinas del complemento, C5a tiene multitud de funciones biológicas² incluyendo la degranulación de mastocitos, quimiotaxis, secuestro leucocitario, activación celular mediante unión al receptor de C5a² (C5aR o CD88). Diversas investigaciones han asociado los elevados niveles de C5a con hemoincompatibilidad de algunos materiales, particularmente en circuitos extracorpóreos.⁵⁻⁹ También han asociado niveles de C5a con patogénesis de una variedad de estados patológicos incluyendo infarto de miocardio¹⁰⁻¹⁴, derrame cerebral^{15,16}, así como síndrome vascular asociado a daño renal¹⁷⁻¹⁹. La función de C5a en la patogénesis de malaria²⁰ y otras enfermedades infecciosas, así como en sepsis,²¹⁻²⁴ está bien documentado.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El enzimoimmunoensayo MicroVue C5a es un procedimiento de tres pasos que utiliza (1) una placa de microensayo recubierta de anticuerpo murino monoclonal específico de un neo-epítipo humano C5a, (2) anticuerpos murinos monoclonales conjugados con HRP contra la región C5a de C5, y (3) un sustrato cromogénico.

En el primer paso, se añaden los Patrones, Controles y las muestras diluidas a los pocillos recubiertos de anticuerpos C5a murinos monoclonales. El anticuerpo monoclonal se une al C5a de los Patrones, Controles o muestras. Después de la incubación, un ciclo de lavado elimina el material no unido.

En el segundo paso, se añaden anticuerpos anti-C5(C5a) conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) a cada pocillo. Los anticuerpos conjugados enzimáticos se unen al C5(C5a) inmobilizado capturado en la primera etapa. Después de un periodo de incubación, un ciclo de lavado elimina el conjugado no unido.

En la tercera etapa se añade, 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB), a los pocillos. El conjugado HRP reacciona con el sustrato y forma un color azul. Después de la incubación la reacción es detenida químicamente, lo que induce un cambio de color de azul a amarillo, confirmando que la reacción tuvo lugar. Se mide la intensidad del color por espectrofotometría a A₄₅₀. La intensidad del color de la mezcla de reacción es proporcional a la concentración de C5a presente en las muestras, Patrones, y Controles. Los resultados son calculados a partir de la curva estandar generada usando un análisis mediante regresión lineal.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

96 Ensayos para Complejo C5a

El kit inmunoensayo MicroVue C5a contiene:

A Patrones C5a	Cód. 5131 – 5135	1 de cada, 1,5 mL
B Listo para uso. Contiene suero humano con una concentración C5a conocida (ng/mL), estabilizadores		
C proteicos		
D		
E		
L Control bajo	Cód. 5136	1,5 mL
Listo para uso. Contiene suero humano con una concentración C5a conocida (ng/mL), estabilizadores		
proteicos		
H Control Alto	Cód. 5137	1,5 mL
Listo para uso. Contiene suero humano con concentración C5a conocida (ng/mL), estabilizadores		
proteicos		
1 Tiras recubiertas	Cód. 5129	12 de cada
Tiras fraccionables de ocho pocillos recubiertas de anticuerpo monoclonal murino en recipiente de		
aluminio resellable		
2 Solución de parada	Cód. A9947	12 mL
Contiene 1N (4%) Ácido Hidroclórico		
3 Solución de lavado concentrada 20X	Cód. A9957	2 de cada, 50 mL
Contiene PBS, Tween-20® al 1,0%, y Proclin® 300 al 0.035%		
4 Diluyente de muestras	Cód. A3670	50 mL
Contiene PBS, Tween-20 al 0,05%, Estabilizadores proteicos al 2,5%, y Proclin 300 al 0,035%		
5 Sustrato TMB	Cód. 5059	12 mL
Listo para uso. Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)		
6 Conjugado	Cód. 5130	12 mL
Contiene Anticuerpo anti C5a monoclonal de murino conjugado a peroxidasa de rábano		

Tween-20® es una marca comercial registrada de ICI Américas Inc.
ProClin® es una marca comercial registrada de Rohm and Haas Company.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

- Cronómetro (de 60 minutos)
- Calculadora u otro método de cálculo para validar el ensayo
- Placas de microensayos limpias y/o tubos de muestra y portatubos
- Contenedor graduado para la dilución de la solución de lavado
- Botella para lavado u otro sistema de lavado para inmunoensayos
- Pipeta multicanal ajustable (8 o 12 canales) o micropipetas de repetición (opcional)
- Pipetas limpias, 1 mL, 5 mL, y 10 mL
- Micropipetas y puntas estériles de pipetas desechable
- Lector de placas apto para valores de densidad óptica de A_{450} entre 0,0 y 3,0
- Agua desionizada o destilada

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para diagnóstico *in vitro*.
- No apto para la venta o uso en Estados Unidos o Canadá.
- Trate las muestras como material potencialmente peligroso.
- Sigue las precauciones universales cuando use componentes de este kit o muestras de pacientes.

- Use los reactivos como una unidad integral antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.
- Almacenar los reactivos como se indica.
- No usar las tiras recubiertas si la bolsa está perforada.
- ProClin 300 se usa como conservante. El contacto accidental o la ingestión del tampón o reactivos que contienen ProClin puede causar irritación de la piel, ojos o boca. Utilice buenas prácticas de laboratorio para reducir la exposición. Busque atención médica en caso de experimentar algún síntoma.
- La solución de parada se considera corrosiva y puede causar irritación. No ingerir. Evitar el contacto con los ojos, piel y ropa. En caso de contacto, lavar el área con agua. En caso de ingestión, avisar a un médico.
- Cada unidad de donante utilizada en la preparación de los sueros Calibradores y Controles han sido probados por un método aprobado por la FDA para la detección de anticuerpos contra HIV 1 y 2 y HVC, así como para el antígeno de superficie de la Hepatitis B. Todos los resultados fueron negativos. Sin embargo, como ningún método puede ofrecer la completa seguridad de la ausencia de agentes infecciosos, estos reactivos deben ser manipulados bajo el Nivel 2 de Bioseguridad como se recomienda para cualquier muestra de suero o sangre potencialmente infecciosa en el manual “Biosafety in Micro-biological and Biomedical Laboratories” 2007.
- Se recomienda el uso de pipetas multicanal o un pipeteador de repetición para asegurar dispensación adecuada de los reactivos.
- Para una dispensación precisa de las muestras, añada las muestras y Patrones de forma precisa. Pipetea cuidadosamente usando sólo material calibrado.
- La recolección y el almacenamiento adecuados de las muestras son esenciales para la exactitud de los resultados (véase *MANIPULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA*).
- Evitar la contaminación microbial o cruzada de las muestras o reactivos. Su contaminación puede llevar a la obtención de resultados incorrectos.
- Probar cada muestra por duplicado.
- No usar un pocillo para más de una vez.
- El uso de tiempos y temperaturas de incubación que no sean los indicados en la sección *PROCEDIMIENTO DE ENSAYO* puede dar resultados erróneos.
- El sustrato TMB tiene que estar protegido de la luz durante el almacenamiento e incubación. Evitar el contacto con los ojos, piel y ropa. En caso de contacto, aclarar inmediatamente el área afectada con agua.
- No permitir que se sequen los pocillos una vez empezado el ensayo.
- Cuando añaden o aspiran líquidos de los pocillos de la microplaca, no tocar el fondo del pocillo.
- Las muestras inactivadas por calor, hiperlipémicas o contaminadas pueden dar resultados erróneos.
- Para evitar la formación de aerosoles durante el lavado, utilice un aparato para aspirar el líquido de lavado al interior de un frasco que contenga lejía de uso doméstico.
- Utilice una botella para lavado o un dispositivo de llenado automático para lavar las placas (*PROCEDIMIENTO DE ENSAYO*, paso 8). Para obtener los mejores resultados no utilice una pipeta multicanal para lavar la placa.
- La prueba debe realizarse en una zona que disponga de la ventilación adecuada.
- Deseche los envases y contenido no utilizado conforme a los requerimientos locales, estatales y federales reglamentarios.
- Vista preferentemente ropa protectora, guantes y protección para ojos/cara cuando esté manipulando los componentes del kit.
- Lavarse bien las manos después de manipular el kit.
- Para obtener información adicional sobre símbolos de peligro, seguridad, manipulación y eliminación de los componentes de este kit, consulte la Ficha de datos de seguridad (*Safety Data Sheet, SDS*) que se encuentra en quidel.com.

ALMACENAMIENTO

Conserve los kits sin abrir a 2°C a 8°C. Dejar que los reactivos y materiales lleguen a 18°C a 28°C antes del uso. Vuelva a colocar las tiras no requeridas en la bolsa de conservación, cerrarla y conservar a 2°C a 8°C.

INDICACIONES DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

La nubosidad o decoloración de la Solución de Lavado diluída indica un deterioro de este reactivo. Si esto ocurre, la solución debe ser desechada.

MANIPULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Manipular y desechar todas las muestras utilizando las precauciones universales.

Todas las manipulaciones de las muestras deben ser realizados en 2°C a 8°C.

Colección de muestras

La recolección, procesamiento y almacenamiento correcto de las muestras es fundamental, ya que C5a se puede generar en las muestras con manipulación inadecuada a través de la activación del complemento.

Valores normales para las muestras de suero son más altas que los obtenidos con EDTA o plasma citrato. Los niveles de C5a en plasma EDTA o citrato pueden representar con más exactitud las concentraciones *in vivo*.²⁵

Las muestras de suero, EDTA, o plasma citrato deben recogerse de forma aséptica usando las técnicas convencionales.²⁶ La muestra debe analizarse de inmediato o guardarse a 4°C o en hielo durante una hora antes del análisis.

Si la muestra no se puede analizar en las 4 horas según las pautas antes detalladas, debe congelarse a -70°C o menos.

También se puede usar una **Solución estabilizadora de muestra** (Cod.Nº. A9576) para preparar las muestras de suero y plasma humanos para la conservación. Este producto es 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.

Descongelación de las Muestras

Descongelar las muestras rápidamente en baño de agua a 37°C y ponerlas inmediatamente en hielo (no más de 4 horas) para evitar una activación del complemento antes de la dilución. **No dejar la muestra a 37°C**, porque se podría producir la activación del complemento. No descongelar las muestras a temperatura ambiente o sobre hielo ya que puede conducir a la activación del C5 y afectar los resultados. Las muestras deben analizarse lo antes posible después de su descongelación. Se pueden realizar hasta tres ciclos de descongelación sin afectar las muestras. Si las muestras requieren otra congelación para análisis posterior Quidel sugiere congelar varias alícuotas para evitar el efecto de los ciclos de congelación y descongelación.

Dilución de la Muestra

Advertencia: Tratar todas las muestras como potencialmente peligrosas. Usar las Precauciones Universales. No usar muestras inactivadas por calor, contaminadas o conservadas inadecuadamente.

Nota: Consulte en la sección *MANIPULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS* las notas importantes sobre los métodos adecuados para descongelar las muestras. La manipulación adecuada de la muestra es esencial para obtener resultados exactos.

Quidel sugiere que las muestras de plasma normal se diluyan 1:20 en el diluyente suministrado; las muestras de suero deberían diluirse a 1:50. Una dilución 1:200, o más, puede requerirse para una muestra con altos niveles de C5a. Las muestras **deben** estar diluídas para que los valores de A_{450} estén por encima del LLOQ sin superar el valor A_{450} del Patrón E de C5a. Las muestras con lecturas A_{450} fuera de este rango deben volver a analizarse con una nueva dilución.

Determinar el número (N) de las muestras a analizar. Marcar los tubos de ensayo de # 1 a # N, y el registro de la muestra que corresponde a cada tubo. Preparar una dilución apropiada (véase el párrafo anterior) de cada muestra con el diluyente de muestra. Mezclar bien, pero evitar la formación de espuma y burbujas. No almacenar o reutilizar las muestras diluidas.

Incorporación de las muestras diluidas a la microplaca

Añadir las muestras diluidas a los pocillos en un plazo de 15 minutos. Se puede usar cualquiera de los dos métodos para añadir las muestras diluidas, Patrones, Controles y tampón a los pocillos (consulte Paso 6 de *PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO*). Para pequeños ensayos donde se analizan pocas muestras, los reactivos y muestras diluidas pueden añadirse directamente al pocillo asignado con una micropipeta (100 µL/pocillo). Para trabajos más amplios se recomienda el uso de pipetas multicanal.

Para añadir los Patrones, Controles y muestras diluidas en los pocillos lo más rápidamente posible, un procedimiento "replica plating" puede ser empleado. En lugar de añadir 100 µL de cada Patrón, Control o muestra diluida a los pocillos recubiertos con anticuerpos individualmente, 120-130 µL de cada solución se puede añadir a pocillos individuales en un placa en blanco (no incluido), correspondiente al patrón EIA final deseado. Después, todas las soluciones del ensayo que se hayan añadido a los pocillos en la placa en blanco, rápidamente se transfieren 100 µL de cada pocillo en blanco al pocillo recubierto de anticuerpos usando una micropipeta multicanal. Para evitar la posibilidad de contaminación cruzada, las puntas de pipeta se deben cambiar cada vez que hay un cambio en la composición de las muestras que deben transferirse.

El procedimiento "replica plating" puede usarse también para añadir las soluciones de Conjugado, Sustrato, y de Parada.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Traer los reactivos y materiales de 18°C a 28°C antes de su uso.

Después de retirar los reactivos y materiales necesarios, devolver los artículos no utilizados a las temperaturas de conservación correspondientes (ver *ALMACENAMIENTO*).

1. Patrones y Controles

Los Patrones y controles no necesitan dilución o preparación antes de su uso.

2. Solución de Lavado

Mezclar el concentrado de Solución de Lavado 20X invirtiendo el frasco varias veces. Si la Solución de Lavado 20X concentrada se ha almacenado a 2°C a 8°C, y se han formado cristales, calentar en baño maría a 37°C a 50°C hasta que se disuelvan, y seguir mezclando bien. Preparar la Solución de Lavado diluyendo el contenido completo de una de las botellas de concentrado de Solución de Lavado 20X hasta un litro con agua destilada o desionizada. Mezclar bien. La Solución de Lavado es estable durante 30 días cuando se almacena en un recipiente limpio, a 2°C a 8°C. Si se produce decoloración o nubosidad, deseche el reactivo.

3. Tiras de Microensayo

Determinar el número de pocillos necesarios para el ensayo. Se recomienda probar el Diluyente de Muestra (blanco), los Controles y Patrones por duplicado. Sacar las tiras que no sean necesarias y colocarlas en la bolsa de almacenamiento, cerrar la bolsa, y devolverla a 2°C a 8°C. Colocar las tiras a usar en el ensayo en un armazon de ensayo.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

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

Consulte PREPARACION DE REACTIVOS y ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES antes de proceder.

1. Registre la posición de los pocillos correspondientes a los blancos, muestras, Patrones y Controles así como también el número de lote de los mismos. Marque una esquina de la microplaca para su orientación.
2. Prepare las tiras de microensayo como sigue:
 - a. Rehidrate los pocillos con 300 μ L de solución de lavado usando una botella de lavado o algún dispositivo automático.
 - b. Incubar 2 minutos a 18°C a 28°C.
 - c. Eliminar el líquido de cada pocillo.
 - d. Añadir 300 μ L de solución de lavado a cada pocillo.
 - e. Eliminar el líquido de los pocillos.
 - f. Repetir las etapas “d-e” una vez más para totalizar tres lavados.**
 - g. Invertir la placa y golpear firmemente sobre papel absorbente para sacar todo el líquido residual.
3. Seleccionar un pocillo o más para utilizar de blanco. Añadir 100 μ L del diluyente de muestra en el pocillo(s) que se usará como blanco.
4. Añadir 100 μ L de cada Patrón C5a (A, B, C, D, E) en los pocillos por duplicado. **Nota: Los Patrones están listos para uso y no necesitan dilución.**
5. Añadir 100 μ L de los controles bajo y alto de C5a en los pocillos por duplicado. **Nota: Los Controles están listos para uso y no necesitan dilución.**
6. Añadir 100 μ L de cada muestra diluida al pocillo asignado. (Consulte *Dilución de la Muestra*).
7. Incubar 60 min \pm 1 min a 18°C a 28°C.
8. Lavar los pocillos como sigue:
 - a. Después de la incubación del paso 7 (o paso 10 siguiente) eliminar el líquido de cada pocillo.
 - b. Añadir 300 μ L de Solución de Lavado usando una botella o un dispositivo automático de relleno.
 - c. Eliminar el líquido de cada pocillo.
 - d. Repetir los pasos “b-c” cuatro veces adicionales.**
 - e. Después del quinto ciclo de lavado invertir la placa, y golpearla dos veces sobre papel absorbente para sacar cualquier líquido residual.
9. Usando una pipeta de repetición o multicanal, dispensar 100 μ L de Conjugado C5a en cada pocillo lavado, blancos incluidos.
10. Incubar las tiras 60 \pm 1 minutos a 18°C a 28°C
11. Lavar los pocillos después de 60 minutos de incubación (paso 10) como está descrito en *PROCEDIMIENTO DE ENSAYO*, paso 8.
12. Inmediatamente después del lavado, añadir 100 μ L de la Solución de Sustrato en cada pocillo, blancos incluidos.
13. Incubar las tiras 15 \pm 1 minutos a 18°C a 28°C.
14. Añadir 100 μ L de la Solución de Parada a cada pocillo para parar la reacción enzimática. La Solución de Parada tiene que ser añadida en el mismo orden y proporción que la Solución de Sustrato. Golpear suavemente la placa para distribuir uniformemente el color. **NOTA: Los resultados óptimos se obtienen usando la función auto mix del lector de placa (si existe) antes de la lectura.**
15. Determine el valor de absorbancia a 450 nm (Valor del A_{450}) para cada pocillo dentro de los 60 minutos siguientes después de añadir la Solución de Parada (paso 14), realizando la corrección en blanco necesaria.
16. Determine la concentración de las muestras y controles a partir de la curva estándar.
17. Deshacerse de las muestras diluidas, controles y tiras usados (vea *ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES*).

CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan el uso de controles para asegurarse que el ensayo funciona correctamente. Cada kit C5a contiene controles Alto y Bajo que se pueden usar con este propósito. Se proporcionan los intervalos de Control de calidad. Los valores del 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 en los límites aceptables del laboratorio, los resultados del ensayo pueden considerarse discutibles y las

muestras deberían reanalizarse. Además, se requiere que la curva estándar generada cumpla estrictamente con los requisitos de validación. Si el ensayo no cumple con estos requisitos, repítalo o pongase en contacto con el Servicio Técnico de Quidel.

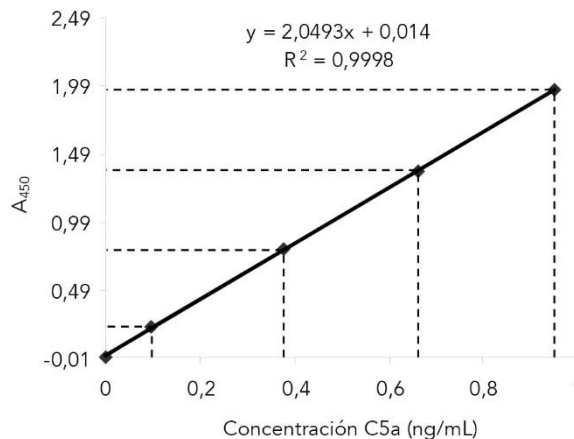
El Certificado de Análisis incluido en este kit es específico de este lote y se debe usar para comprobar que los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Quidel Corporation.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Cálculo de los Resultados

Uso de la Curva Estándar: La curva estándar para el inmunoenzaimoensayo C5a es generada usando el valor A_{450} para cada patrón previa sustracción del valor del blanco (en el eje y) y la concentración asignada a cada patrón (en el eje x). La curva estándar debe cumplir con los requisitos de validación. La mayoría de los ordenadores y calculadoras pueden realizar estos cálculos. Ejemplo de una curva estándar típica (Figura 1).

Figura 1
Curva estándar representativa



Muestra	A_{450}	ng/mL
Patrón A	-0,001	0
Patrón B	0,225	0,095
Patrón C	0,789	0,378
Patrón D	1,369	0,661
Patrón E	1,965	0,953
$r = 0,9998$	$m = 2,0493$	$b = 0,014$

Cálculo de la concentración actual de C5a en la muestra

La concentración asignada a cada vial de estandar son unidades absolutas del Complejo C5a. La concentración de C5a en una muestra se determina multiplicando la concentración determinada por el factor de dilución de muestra adecuado. Por ejemplo, si una muestra de plasma EDTA está diluida a 1:20 para el ensayo, y la curva de regresión lineal da la concentración de 0,5 ng C5a/mL, la concentración de C5a en la muestra sería de 10 ng C5a/mL (o $20 \times 0,5$).

Para obtener una concentración C5a precisa para ensayos que dan valores A_{450} superiores a las del Patrón E C5a (o con valores más bajos que LLOQ), las muestras pueden volver a analizarse con una dilución diferente para que sus valores estén dentro de los límites. En todos estos casos se tiene que repetir el ensayo con los Controles y Patrones C5a.

Validación

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

coeficiente de correlación(r):	> 0,98
pendiente (m):	1,14-2,50
intersección y (b):	(-)0,0145 a (+)0,0532

Consulte en las etiquetas de los viales el intervalo de concentración de C5a aceptable para los Controles Altos y Bajos.

LIMITACIONES

El inmunoensayo enzimático MicroVue C5a se ha utilizado para analizar muestras de suero y plasma EDTA y citrato. No se han analizado otros anticoagulantes.

VALORES OBSERVADOS

El suero y plasma EDTA de 20 donantes aparentemente sanos, ha sido probados con el inmunoensayo enzimático MicroVue C5a. Los resultados son los siguientes:

	n	Concentración (ng/mL)	Rango (ng/mL)
Plasma EDTA	20	20,65	0,37 a 74,33
Suero	20	50,09	13,37 a 179,23

NOTA: Las concentraciones C5a determinadas para las muestras de plasma o suero puede variar entre los laboratorios, por lo tanto, se recomienda que cada laboratorio determine sus propios límites. Las concentraciones previstas anteriores, deberían considerarse como una guía solamente.

RENDIMIENTO DE LA PRUEBA

Límites

LOD: El límite de detección (LOD) para el ensayo C5a es de 0,01 ng/mL, determinado por el límite superior de 3SD basado en un estudio de estándar cero.

LLOQ: El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para el ensayo C5a es 0,050 ng/mL, que es la concentración más baja de la curva estándar que cumpla los criterios del NCCLS para la exactitud y precisión.

Interferencias

Las siguientes sustancias fueron analizadas en el ensayo de C5a y se constató que no interfieren:

Sustancia	Concentración
Bilirubina	40 mg/dL
Hemoglobina	500 mg/dL
Triglicéridos	3000 mg/dL
Na + Heparina	14 U/mL
C5 Proteína	80 mg/L
Glucosa	1200 mg/dL
Colesterol	500 mg/dL

Se ha demostrado que la presencia en muestras limpias de una concentración de albúmina > 118.6 mg/dl o de gamma globulina > 8,9 mg/dl interfiere con la cuantificación en la prueba, por lo que deben ser diluídas como corresponda.

Precisión

La precisión Intra-ensayo y Inter-ensayo fue determinada con 20 réplicas de 2 muestras de plasma y 2 muestras de suero en 10 ciclos diferentes.

Muestra	C5a (ng/mL)	Intra -ensayo ¹ C.V. (%)	Inter -ensayo ² C.V. (%)
Plasma EDTA	12,34	3,8	9,9
	1,41	3,9	13,0
Suero	30,13	3,6	7,1
	21,92	3,5	7,8

¹n = 20 replicados ²n = 10 ciclos

Linealidad

La linealidad fue analizada por dilución en serie de muestras con diluyente de muestras y comparando los valores obtenidos con los esperados.

Muestra	Factor de dilución	Observado C5a (ng/mL) ³	Esperado C5a (ng/mL) ³	Recuperación (%)
Plasma EDTA	10	1,214	1,266	96
	20	0,667	0,633	105
	40	0,343	0,317	108
	80	0,164	0,158	103
	160	0,077	0,079	98
Suero	25	0,873	0,864	99
	50	0,465	0,432	93
	100	0,236	0,216	92
	200	0,115	0,108	94
	400	0,054	0,054	100

³Factor de dilución no incluido

ASISTENCIA

Para realizar un pedido o para recibir asistencia técnica, póngase en contacto con su distribuidor local. Para más información sobre Quidel, sus productos y distribuidores consulte la página web www.quidel.com.

REFERENCIAS

1. Tack, Brian F., Sam C. Morris, and James W. Prahl. "Fifth component of human complement: purification from plasma and polypeptide chain structure." *Biochemistry* 18(8) (1979): 1490-1497.
2. Guo, Ren-Feng and Peter A. Ward. "Role of C5a in Inflammatory Responses." *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005): 821-852.
3. Hugli, T. E. "Biochemistry and biology of anaphylatoxins." *Complement* 3(3) (1986): 111-127.
4. Yancey, K. B. "Biological properties of human C5a: selected *in vitro* and *in vivo* studies." *Clin. Exp. Immunol.* 71 (1988): 207-210.
5. Hoenich, Nicholas A. and Kostas P. Katopodis. "Clinical characterization of a new polymeric membrane for use in renal replacement therapy." *Biomaterials* 23(18) (2002): 3853-3858.

6. Christine S. Rinder et al. "Selective blockade of membrane attack complex formation during simulated extracorporeal circulation inhibits platelet but not leukocyte activation." *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 118(3) (1999): 460-466.
7. Smith, Brian Richard, Henry M. Rinder, and Christine S. Rinder. "Interaction of Blood and Artificial Surfaces." *Thrombosis and Hemorrhage, 3rd ed.* Eds. J. Loscalzo and A. I. Schafer. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 865-885.
8. Yvan Gasche et al. "Complement depletion during haemofiltration with polyacrylonitrile membranes." *Nephrol. Dial. Transplant* 11 (1996): 117-119.
9. Claudia Sperling et al. "In vitro blood reactivity to hydroxylated and non-hydroxylated polymer surfaces." *Biomaterials* 2007, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.041.
10. Frangogiannis, Nikolaos G., Wayne C. Smith, and Mark L. Entman. "The inflammatory response in myocardial infarction." *Cardiovascular Res.* 53 (2002): 31-47.
11. Walter S. Speidl et al. "Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis." *Euro. Heart Journal* 26 (2005): 2294-2299.
12. Langlois, Paul F. and Maria S. Gawryl. "Detection of the terminal complement complex in patient plasma following acute myocardial infarction." *Atherosclerosis* 70 (1988): 95-105.
13. Jawed Fareed et al. "Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes." *Clin. Chem.* 48(8) (1998): 1845-1853.
14. Antti P. Vakeva et al. "Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: Role of the Terminal Complement Components and inhibition by anti C5 therapy." *Circulation.* 97 (1998): 2259-2267.
15. Thiruma V. Arumugam et al. "Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death." *PNAS* 104(35) (2007): 14104-14109. doi:10.1076/pnas.0700.506.104.
16. Van Beek, Johan, Kristina Elward, and Philippe Gasque. "Activation of Complement in the Central Nervous System: Roles in Neurodegeneration and Neuroprotection." *Ann. NY Acad. Sci.* 992 (2003): 56-71.
17. Sheerin, N. S. and S. H. Sacks. "Leaked protein and interstitial damage in the kidney: is complement the missing link?" *Clin. Exp. Immunol.* 130 (2002): 1-3.
18. T. R. Welch et al. "C5a is important in the tubulointerstitial component of experimental immune complex glomerulonephritis." *Clin. Exp. Immunol.* 130 (2002): 43-48.
19. Thomas Muller et al. "Detection of renal allograft rejection by complement components C5a and TCC in plasma and urine." *J. Lab. Clin. Med.* 129 (1997): 62-71.
20. A. Conroy et al. "C5a Enhances Dysregulated Inflammatory and Angiogenic Responses to Malaria *In vitro*: Potential Implications for Placental Malaria." *PLoS ONE* 4(3) 2009: e4953. doi:10.1371/journal.pone.0004953.
21. A. Bengtsson et al. "Anti-TNF Treatment of Baboons with Sepsis Reduces TNF- α IL-6 and IL-8, but not the Degree of Complement Activation." *Scand. J. Immunol.* 48 (1998): 509-514.
22. Haas, Pieter-Jan and Jos van Strijp. "Anaphylatoxins: Their Role in Bacterial Infections and Inflammation." *Immunol. Res.* 37(3) (2007): 161-175.
23. Ren-Feng Guo et al. "In vivo regulation of neutrophil apoptosis by C5a during sepsis." *J. Leukoc. Biol.* 80(6) (2006): 1575-1583.
24. Ward, Peter A. "Role of the complement in experimental sepsis." *J. Leukoc. Biol.* 83(3) (2008): 467-470.
25. Mollnes, T. E., P. Garred, and G. Bergseth. "Effect of time, temperature and anticoagulants on *in vitro* complement activation: consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation." *Clin. Exp. Immunol.* 73(3) (1988): 484-488.
26. Centers for Disease Control. "Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings." *MMWR.* 1987 36 (suppl. No. 2S):001.

REF A025 – MicroVue C5a EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



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

PIA025001ES00 (02/17)

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



Limites de temperatura



Indicaciones



Consulte los instrucciones
e-etiquetado de uso

IVD

Para uso diagnóstico *in vitro*



Contiene una cantidad suficiente para
96 determinaciones

CONT

Contenido / Contiene

CONTROL

Control
