

**Um imunoenensaio enzimático para a quantificação do complexo SC5b-9 presente em plasma ou soro humanos**

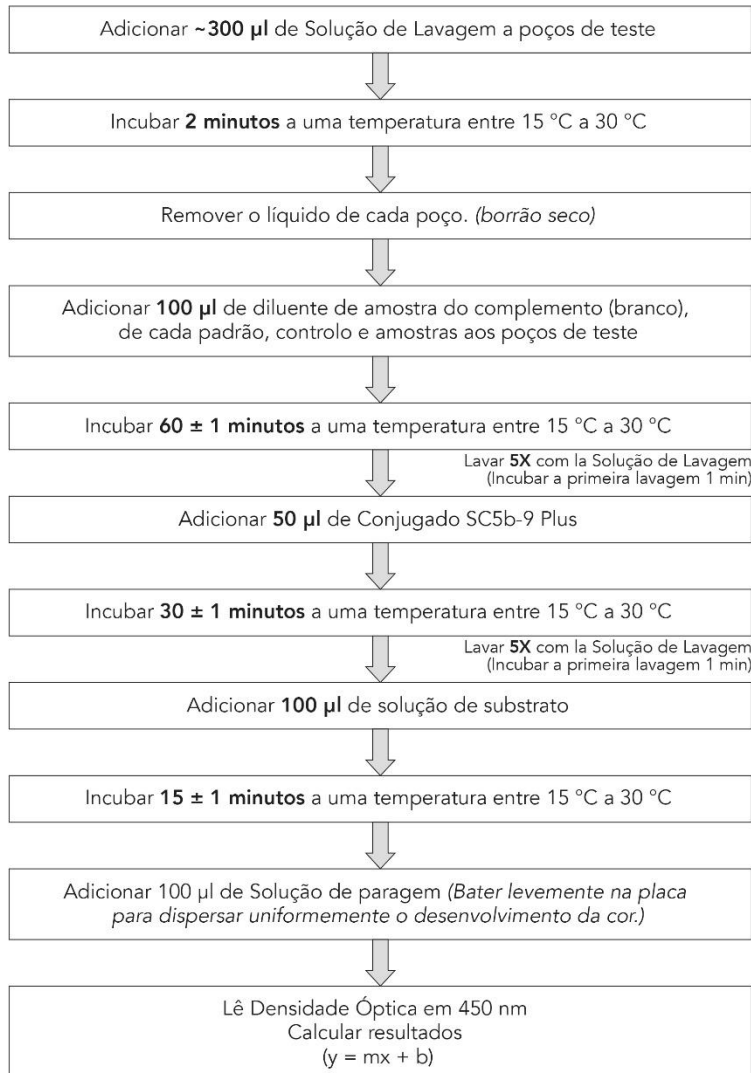
Só para uso diagnóstico *in vitro*. Apenas para exportação.  
Não se destina a venda ou utilização nos Estados Unidos ou Canadá.

## SUMÁRIO

### Preparação do Reagent e da Amostra

- Diluir la Concentrado de Solução de Lavagem 1:20 com água desionizada.
- Diluir as Amostras de Soro 1:40 com el diluente de amostra (e.g. 10  $\mu$ l + 390  $\mu$ l).
- Diluir as amostras de plasma 1:10 com el diluente de amostra (e.g. 50  $\mu$ l + 450  $\mu$ l).

### Procedimento de Ensaio





## FINALIDADE

O imunoensaio enzimático de SC5b-9 Plus da MicroVue mede a quantidade de complexos de SC5b-9 presentes em amostras de soro ou plasma humanos.

## RESUMO E EXPLICAÇÃO

O complexo terminal do complemento (TCC, SC5b-9) é gerado pela constituição de C5 através de C9, em consequência da activação do sistema do complemento, pela via clássica, lectina ou alternativa.<sup>1</sup> O complexo de ataque à membrana (CAM), uma forma do complexo terminal do complemento que actua como mediador nos danos irreversíveis à membrana das células-alvo, associados à activação do complemento.<sup>1-4</sup> Os complexos que se formam na ausência de uma membrana alvo ligam-se a proteínas do soro reguladoras que se produzem naturalmente, por exemplo, a proteína S<sup>5-7</sup> na fase de constituição, formando complexo terminal do complemento (TCC) solúvel, não lítico.<sup>1,5</sup>

Neste documento, referimo-nos a todas as formas do complexo terminal do complemento como TCC e SC5b-9, reconhecendo que outras proteínas reguladoras do complemento, como a Clusterina, também formam estes complexos estáveis e são detectáveis no ensaio SC5b-9 Plus.

O imunoensaio enzimático de SC5b-9 Plus da MicroVue mede a concentração de TCC, fornecendo assim uma indicação do estado da via terminal do complemento na amostra. Serve-se de um anticorpo monoclonal para o anel C9 de TCC para capturar o complexo. O TCC retido é posteriormente detectado através de anticorpos conjugados a HRP que ligam a antigénios do complexo de SC5b-9. Este teste, que oferece um procedimento rápido, altamente específico e quantitativo para a medição dos níveis de TCC, destina-se a investigações que estudam o papel ou estado de activação da via terminal do componente em inúmeros cenários de investigação, bem como à produção de complexos de SC5b-9 *in vivo* ou *in vitro*. Os níveis de TCC são indicativos do nível de activação do complemento na amostra. Têm sido demonstrados elevados níveis de activação do complemento numa diversidade de estados patológicos, incluindo lúpus eritematoso disseminado (LED), outras doenças autoimunes, artrite reumatóide, insuficiência respiratória aguda e outras patologias inflamatórias, tais como enfarte do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC).

## PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O imunoensaio enzimático de SC5b-9 Plus da MicroVue para a quantificação de SC5b-9 no plasma e soro humano ou em amostras experimentais, é um procedimento em três passos que utiliza (1) uma placa de microensaio revestida com anticorpo monoclonal de rato que liga especificamente ao anel C9 de SC5b-9, (2) anticorpos conjugados a HRP para antigénios de SC5b-9 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-SC5b-9 específico. O SC5b-9 presente nos padrões, controlos ou amostras ligar-se-á ao anti-SC5b-9 imobilizado. Após a incubação, um ciclo de lavagem remove o material não ligado. As proteínas que compõem TCC, incluindo C9, não se ligam a este anticorpo e são eliminadas durante o ciclo de lavagem.

No segundo passo, são acrescentados anticorpos conjugados a peroxidase de rábano (HRP) para antigénios de SC5b-9 a cada poço do teste. Os anticorpos conjugados com enzimas ligam ao SC5b-9 que foi capturado pela ligação anti-SC5b-9 monoclonal na superfície dos poços do microensaio. Após a incubação, um ciclo de lavagem remove o 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 azul. Após a incubação, é adicionado um reagente para parar o desenvolvimento da cor, resultando numa cor amarela. As absorvâncias (valores A<sub>450</sub>) dos padrões, controlos e amostras de teste são medidas espectrofotometricamente. A intensidade da

cor da mistura de reacção é proporcional à concentração de SC5b-9 (TCC) presente nas amostras de teste, padrões e controlos.

## REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

### 96 ensaios para o complexo de SC5b-9

O kit EIA de SC5b-9 Plus da MicroVue contém o seguinte:

<b>A</b>	<b>Padrões de SC5b-9 Plus</b>	<b>Referências A9958-62</b>	<b>5 x 1,5 ml</b>
<b>B</b>	Contém soro humano com quantidades conhecidas de SC5b-9 em PBS, estabilizadores de proteínas e		
<b>C</b>	conservantes		
<b>D</b>			
<b>E</b>			
<b>H</b>	<b>Controlos altos/baixos</b>	<b>Referências A9581, A9582</b>	<b>2 X 1,5 ml</b>
<b>L</b>	Contém plasma humano com um nível alto/baixo de complexos de SC5b-9 e conservantes		
<b>1</b>	<b>Tiras revestidas</b>	<b>Referência A3840</b>	<b>12 de cada</b>
	Tiras de oito poços, revestidas com anticorpo monoclonal de rato específico para SC5b-9 humano numa bolsa de papel de alumínio com fecho reutilizável		
<b>2</b>	<b>Solução de paragem</b>	<b>Referência 4978</b>	<b>12 ml</b>
	Contém 2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
<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), 0,05% de Tween-20® e 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>Substrato TMB</b>	<b>Referência A9946</b>	<b>12 ml</b>
	Substrato de peroxidase pronto a utilizar e 3,3',5,5'-tetrametilbenzideno (TMB)		
<b>6</b>	<b>Conjugado de SC5b-9 Plus</b>	<b>Referência A9577</b>	<b>7 ml</b>
	Contém anticorpos (de caprinos) conjugados a peroxidase de rábano para antígenos de SC5b-9		

Tween-20® é uma marca comercial registada da ICI Americas Inc.

ProClin® é 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
- Embora não necessário, recomenda-se a utilização de um leitor de placas com capacidade de mistura automática.

## ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Para diagnóstico *in vitro*.
- Tratar as amostras como material que possa constituir perigo biológico. Seguir as precauções universais ao manusear o conteúdo deste kit e quaisquer amostras dos doentes.

- Utilizar os reagentes fornecidos como uma unidade inteira antes da data de validade inscrita na etiqueta da embalagem.
- Conservar os reagentes do ensaio conforme indicado.
- Não utilizar as tiras revestidas se a bolsa estiver perfurada.
- 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.
- A solução de paragem para este ensaio de produto é 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Evitar o contacto com os olhos, a pele e o vestuário. Em caso de contacto, lavar imediatamente a área afectada com água.
- 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 antígeno 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.
- 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 substrato TMB deve ser protegido da luz durante o armazenamento e incubação.** Evitar o contacto com os olhos, a pele e o vestuário. Em caso de contacto, lavar imediatamente a área afectada com água.
- 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 8). Para melhores resultados, não utilizar uma pipeta multicanal para lavar a placa do microensaio.**
- Os testes devem ser realizados numa área com ventilação adequada.
- Elimine os recipientes e conteúdo não utilizado de acordo com federais, estatais e requisitos regulamentares locais.
- Usar vestuário adequado, luvas e protecção de rosto e olhos sempre que manusear o conteúdo deste kit.
- Lave bem as mãos após o manuseamento.
- Para obter informações adicionais sobre os símbolos de perigo, segurança, o manuseamento e a eliminação dos componentes contidos neste kit, consulte a Ficha de Dados de Segurança (SDS) disponível em quidel.com.

## ARMAZENAMENTO

Conservar o kit não aberto a uma temperatura entre 2 °C a 8 °C. Colocar os reagentes e os materiais a uma temperatura entre 15 °C a 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 a 8 °C.

## 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 SC5b-9 pode ser gerado em amostras inadequadamente manuseadas através de activação artefactual do complemento.

Os valores das amostras de soro normal serão, normalmente, mais elevados do que os obtidos com amostras de plasma normal EDTA ou citrato. Os níveis de SC5b-9 no plasma EDTA ou citrato poderão, por isso, representar de forma mais precisa as concentrações *in vivo*.

As amostras de soro ou de plasma EDTA ou citrato 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, por um período não superior a quatro horas antes da realização do ensaio.

Se não for possível testar a amostra no prazo de quatro horas, seguindo as directrizes acima, deve ser congelada a uma temperatura de -70 °C ou inferior.

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.

Descongelar as amostras congeladas rapidamente a 37 °C até descongelarem apenas. Transferir as amostras descongeladas imediatamente para gelo (durante um período não superior a quatro horas) para evitar a activação do complemento antes da diluição. Não deixar as amostras a 37 °C, uma vez que poderá ocorrer activação do complemento. Não descongelar amostras à temperatura ambiente ou 4 °C dado que tal poderá originar activação do complemento. As amostras devem ser testadas o mais rápido possível após a descongelação. A congelação e descongelação repetidas são desaconselhadas. Se for necessário recongelar as amostras para posterior análise, a Quidel sugere a congelação de vários alíquotas da amostra para evitar ciclos múltiplos de congelação/dcongelação.

## PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

**Permitir que todos os reagentes e os materiais atinjam uma temperatura entre 15 °C a 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*).

Os padrões e controlos não requerem diluição ou preparação antes da utilização.

### 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 a 8 °C, poderão ter-se formado cristais. Para os dissolver, aquecer o frasco em banho-maria entre 37 °C a 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 a 8 °C. Caso ocorra descoloração ou turvação, eliminar o reagente.

## Seleccção 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 a 8 °C. Guardar as tiras a utilizar no ensaio na estrutura da placa do ensaio.

## Diluição de amostras

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

**NOTA: Consultar notas importantes sobre os métodos adequados de descongelação de amostras congeladas na secção Colheita e conservação de amostras. Um manuseamento adequado das amostras é essencial para a obtenção de resultados precisos.**

A Quidel sugere que as amostras de plasma sejam diluídas numa proporção de 1:10 no diluente de amostra fornecido; as amostras de soro devem ser diluídas numa proporção de 1:40. Poderá ser necessária uma diluição numa proporção de 1:200 ou superior para uma amostra com níveis elevados de SC5b-9. As amostras **têm que** ser diluídas, de modo a que os valores  $A_{450}$  obtidos sejam superiores ao limite de quantificação inferior (LLOQ) e não excedam o valor  $A_{450}$  do padrão E do Kit de SC5b-9 com leituras de  $A_{450}$  fora destes limites devem ser novamente submetidas a ensaio com uma nova diluição.

Determinar o número (N) de amostras a testar. Rotular os tubos de ensaio desde o n.º 1 ao n.º N e registar qual a amostra que corresponde a cada tubo. Preparar uma diluição adequada (ver o parágrafo anterior) de cada amostra, utilizando o diluente de amostra. 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 6 do *PROCEDIMENTO DE ENSAIO*). Para a realização de pequenos ensaios em que apenas são testadas algumas amostras, as amostras diluídas e outros reagentes podem ser adicionados directamente nos respectivos poços com uma micropipeta (100 µl/poço). Para grandes ou pequenos ensaios, mas, especialmente, para os maiores, deve ser utilizada uma pipeta multicanal para a adição de amostras, tal como é indicado a seguir. **(Este procedimento pode ser convenientemente utilizado para adicionar o conjugado, o substrato, bem como a solução de paragem.)**

Para colocar os padrões, os controlos e as amostras diluídas nos poços do microensaio tão rápido quanto possível, poderá ser empregue um procedimento de “réplica de placas”. Em vez de adicionar 100 µl de cada padrão, controlo ou amostra diluída individualmente nos poços revestidos com anticorpos, é possível adicionar 120 µl 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.

## 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 300 µl de solução de lavagem a cada poço, utilizando um frasco de lavagem ou dispositivo de enchimento automático.
  - b. Incubar a uma temperatura de 15 °C a 30 °C durante dois minutos.
  - c. Remover o líquido de cada poço.
  - d. 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 SC5b-9 a poços duplicados. **NOTA: os padrões já foram diluídos e estão prontos a ser utilizados.**
5. Adicionar 100 µl de ambos os controlos alto SC5b-9 e baixo SC5b-9 a poços duplicados. **NOTA: os controlos já foram diluídos e estão prontos a ser utilizados.**
6. Adicionar 100 µl de cada amostra diluída ao respectivo poço de microensaio. (Ver *PREPARAÇÃO DOS REAGENTES*, Diluição de amostras).
7. Incubar a uma temperatura de 15 °C a 30 °C durante 60 ± 1 minutos.
8. Lavar os poços do microensaio do modo a seguir indicado:
  - a. Após a incubação no passo 7 (ou no passo 10 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 a 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.
9. Utilizando uma pipeta multicanal ou de repetição, colocar 50 µl de conjugado de SC5b-9 em cada poço de teste lavado, assim como no(s) poço(s) em branco.
10. Incubar as tiras do microensaio a uma temperatura de 15 °C a 30 °C durante 30 ± 1 minutos.
11. Lavar os poços do microensaio após o período de incubação de 30 minutos (passo 10), tal como é descrito em *PROCEDIMENTO DO ENSAIO*, passo 8.
12. Imediatamente após o procedimento de lavagem, colocar 100 µl da solução de substrato em cada poço, incluindo o(s) poço(s) em branco.
13. Incubar as tiras do microensaio a uma temperatura de 15 °C a 30 °C durante 15 ± 1 minutos.
14. Adicionar 100 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. **NOTA: Podem ser obtidos resultados excelentes utilizando a função de mistura automática (se disponível) do leitor de placas imediatamente antes da leitura da placa.**
15. Determinar a leitura da absorvância a 450 nm (valor  $A_{450}$ ) para cada poço de teste, 30 minutos após a adição da solução de paragem (passo 14), fazendo as necessárias correcções aos itens em branco.
16. Determinar a concentração de amostras e controlos a partir da curva padrão.
17. 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 SC5b-9 Plus contém controlos alto e baixo que podem ser utilizados para este fim. São fornecidos intervalos para o controlo. 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 novamente testadas. 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 Corporation. Os valores da densidade óptica fornecidos devem ser utilizados apenas como linha de orientação. Os resultados obtidos pelo seu laboratório podem ser diferentes.

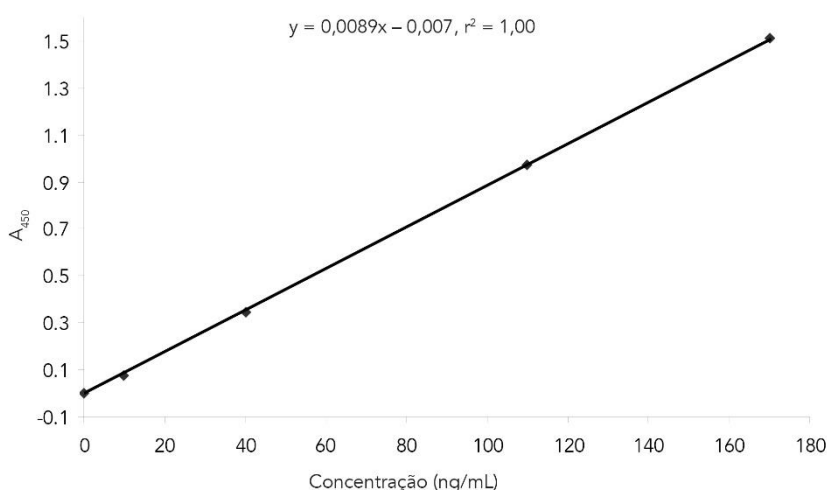
## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

### Cálculo dos resultados

**Utilização da curva padrão:** a curva padrão para o EIA de SC5b-9 Plus é gerada utilizando os valores  $A_{450}$  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 (ng/ml) das amostras de teste lidas directamente da linha de melhor ajustamento da curva padrão. É apresentado um exemplo de uma curva padrão típica na figura 1.

**Figura 1**  
**Curva padrão representativa**



Amostra	$A_{450}$	ng/ml
Padrão A	0	0
Padrão B	0,079	10
Padrão C	0,347	40
Padrão D	0,975	110
Padrão E	1,512	170



## Cálculo da concentração actual de SC5b-9 nas amostras

A concentração atribuída no certificado de análise são subunidades absolutas do complexo SC5b 9. A concentração de SC5b-9 numa amostra é determinada através da multiplicação da concentração determinada pelo factor de diluição da devida amostra. Por exemplo, se uma amostra de plasma EDTA for diluída numa proporção de 1:10 para o ensaio e a curva de regressão linear apresentar uma concentração de 20 ng de SC5b-9/ml, então a concentração de SC5b-9 na amostra seria de 200 ng de SC5b-9/ml (ou 20 x 10).

Para se obterem determinações da concentração de SC5b-9 precisas para as amostras de teste que apresentam valores  $A_{450}$  superiores aos do padrão E de SC5b-9 (ou que apresentam valores  $A_{450}$  inferiores ao limite de quantificação inferior), as amostras devem ser novamente submetidas a ensaio com uma diluição diferente, de modo a que os novos valores  $A_{450}$  fiquem dentro destes limites. Em todos os ensaios repetidos, os padrões e controlos de SC5b-9 devem também ser novamente testados.

## Validação

Determinar a inclinação, a intercepção e o coeficiente de correlação da linha de melhor ajustamento obtida para os padrões A, B, C, D e E de SC5b-9. Os valores devem encontrar-se dentro dos limites especificados para qualificar o ensaio:

---

coeficiente de correlação (r): > 0,95  
inclinação (m): 0,0039 a 0,0123  
intercepção y (b): (-)0,189 a (+)0,201

---

Consulte o certificado de análise para obter o intervalo de concentração de SC5b-9 aceitável para os Controlos Alto e Baixo.

## LIMITAÇÕES

O imunoensaio enzimático de SC5b-9 Plus da MicroVue tem sido utilizado para testar amostras colhidas como soro ou plasma em EDTA e citrato. Não foram testados outros anticoagulantes.

## VALORES DAS AMOSTRAS

Amostras de plasma em EDTA e de soro de quarenta (40) dadores normais foram testadas no kit SC5b-9 Plus EIA. Os resultados são apresentados a seguir:

	n	Média (ng/ml)	Intervalo: $\pm$ 2DP (ng/ml)
Plasma em EDTA	40	147	75 a 219
Soro	40	356	187 a 525

**NOTA:** a média e o comportamento de Desvio Padrão (DP) das concentrações do complexo de SC5b-9 determinados para as amostras de plasma ou soro podem variar entre laboratórios. Por conseguinte, recomenda-se que cada laboratório determine os seus próprios intervalos normais. Os valores fornecidos acima devem ser encarados apenas como uma referência.

## DESEMPENHO DO TESTE

### Limites

**LOD:** o limite de detecção (LOD) para o ensaio de SC5b-9 Plus é de 3,7 ng/ml, determinado pelo limite superior de 3 DP num estudo de padrão zero.

**LLOQ:** o limite de quantificação inferior (LLOQ) para o ensaio de SC5b-9 é de 8,8 ng/ml, a concentração mais baixa na curva padrão que cumpriu os critérios NCCLS relativamente a exactidão e precisão.

## Substâncias interferentes

As seguintes substâncias (testadas nas concentrações especificadas) não interferem com o ensaio.

Substância	Concentração
Bilirubin	40 mg/dl
Hemoglobin	500 mg/dl
Triclycerides	3000 mg/dl
Li + Heparin	14 U/ml
Na + Heparin	14 U/ml
C9 Protein	180 mg/l
Albumin	6000 mg/dl
Glucose	1200 mg/dl
Cholesterol	500 mg/dl

## Precisão

A precisão intra e entre ensaios foi determinada através da análise a 20 réplicas de 2 amostras de plasma e 2 amostras de soro em 10 ensaios diferentes.

Amostra	SC5b-9 (ng/ml)	Intra-ensaios <sup>1</sup> C.V. (%)	Inter-ensaios <sup>2</sup> C.V. (%)
Plasma	139,0	6,8	13,1
	462,9	1,9	5,2
Serum	803,6	2,8	10,4
	1410,6	1,6	5,0

<sup>1</sup>n = 20 réplicas    <sup>2</sup>n = 10 ensaios

## Linearidade

A linearidade foi realizada misturando uma amostra de plasma fortificada com uma pequena amostra de plasma em várias proporções para criar níveis intermédios de analito. A recuperação média foi de 94% com limites absolutos de 86% a 104%.

## ASSISTÊNCIA

Para serviços fora dos EUA, contactar o distribuidor local. A informações adicionais sobre Quidel, nossos produtos, e nossos distribuidores pode ser encontrada em nosso web site em [quidel.com](http://quidel.com).

## REFERÊNCIAS

1. Müller-Eberhard, H.J., The Membrane Attack Complex, Springer Seminars in Immunopathology, Vol. 7, p.93, 1984.
2. Lachmann, P.J. and Thompson, R.A., Reactive lysis: The complement-mediated lysis of unsensitized cells. II. The characterization of activated reactor as C56 and the participation of C8 and C9. J. Exp. Med., Vol. 131, p.643, 1970.
3. Götze, O., and Müller-Eberhard, H.J., Lysis of erythrocytes by complement in the absence of antibody. J. Exp. Med., Vol. 132, p.898, 1970.
4. Kolb, W.P., Haxby, J.A., Arroyave, C.M., and Müller-Eberhard, H. J., Molecular analysis of the membrane attack mechanism of complement. J. Exp. Med., Vol. 135, p.549, 1972.
5. Kolb, W.P., and Müller-Eberhard, H.J., The membrane attack mechanism of complement. Isolation and subunit composition of the C5b-9 complex, J. Exp. Med., Vol. 141, p.724, 1975.

6. Podack, E.R., Kolb, W.P., and Müller-Eberhard, H.J., The C5b-6 complex: formation, isolation, and inhibition of its activity by lipoprotein and the S-protein of human serum. J. Immunol., Vol. 120, p.1841, 1978.
7. Podack, E.R. and Müller-Eberhard, H.J., Isolation of human S-protein, of an inhibitor of the membrane attack complex of complement. J. Biol. Chem., Vol. 254, p.9808, 1979.

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

**REF** A029 – MicroVue SC5b-9 Plus 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](http://quidel.com)

**PIA029002PT00 (09/21)**

## GLOSSÁRIO

---

**REF**

Número de catálogo



Marca CE de conformidade

---

**EC REP**

Representante autorizado na Comunidade Europeia

**LOT**

Número do lote

---



Utilizar até



Fabricante

---



Limitação de temperatura



Utilização prevista

---



Consulte as instruções e-rotulagem de utilização



Risco biológico

---

**IVD**

Para diagnóstico *in vitro*



Contém o suficiente para 96 determinações

---

**CONT**

Conteúdo / Contem

**CONTROL**

Controlo

---