

**Enzimoimmunoensayo para la cuantificación del fragmento de C3a de la proteína de complemento C3 presente en suero o plasma humanos.**

## RESUMEN

### Preparación de los Reactivos

- Diluir la Solución de Lavado Concentrado 1:20 con agua desionizada

### Preparación de las Muestras (Plasma – 1:200; Serum – 1:5000)

- Pipetear Diluyente de muestras para dilución-1 en tubos o placas separadas:  
*90 µL para cada muestra de plasma (para Dilución-1 de plasma)*  
*490 µL para cada muestra de sueros (para Dilución-1 de suero)*
- Pipetear Diluyente de muestras para dilución-2 en tubos o placas separadas:  
*475 µL para cada muestra de plasma (para Dilución-2 de plasma)*  
*495 µL para cada muestra de sueros (para Dilución-2 de suero)*
- Descongelar las muestras rápidamente mediante incubación a 37°C hasta que aproximadamente el 90% de las muestras estén descongeladas. Colocar inmediatamente en hielo.
- Mezclar con cuidado cada una de las muestras, transferir 10 µL de cada muestra de plasma o suero a la correspondientes en plasma o suero de Dilución-1, y mezclar cuidadosamente.
- Transferir las siguientes cantidades de cada Dilución-1 a la Dilución-2 especificada, y mezclar cuidadosamente:  
*25 µL de Dilución-1 de plasma → 475 µL de Dilución-2 de plasma*  
*5 µL de Dilución-1 de suero → 495 µL de Dilución-2 de suero*

### Procedimiento de ensayo





## USO PREVISTO

El inmunoensayo enzimático MicroVue C3a Plus cuantifica la cantidad de C3a en suero o plasma humano.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

MicroVue C3a Plus es un inmunoensayo enzimático de captura directa de 96 pocillos para la medición de C3a en suero humano, plasma y otras muestras biológicas.

En condiciones normales, la activación de la vía clásica o alternativa del complemento resulta en la formación de una C3 convertasa multimolecular capaz de fragmentar C3 en C3a y C3b<sup>(1)</sup> C3a es una molécula de bajo peso molecular (aproximadamente 9kD) con 77 aminoácidos.<sup>(2)</sup> C3a es metabolizado rápidamente por la enzima carboxypeptidasa N del suero a una C3a Arg más estable y menos activa.<sup>(3)</sup> Por conveniencia, se referirá a las dos formas como "C3a".

MicroVue C3a Plus, un método de medición de niveles de C3a 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 C3a *in vivo* o *in vitro*. Se ha demostrado que el C3a aumenta la permeabilidad vascular, es espasmogénico y quimiotáctico e induce la liberación de mediadores farmacológicamente activos de distintos tipos de células. Se ha documentado suficientemente el papel del C3a en la patogénesis de reacciones inflamatorias observadas en septicemias bacterianas gram-negativas, traumatismos, cardiopatías isquémicas, isquemias cerebrales, síndromes postdiálisis y varias enfermedades autoinmunes (que incluyen artritis reumatoide, lupus eritematoso y glomerulonefritis) aguda.<sup>(4, 6-23)</sup>

## PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El enzimoimmunoensayo MicroVue C3a Plus es un procedimiento de tres pasos que utiliza (1) una placa de microensayo recubierta de anticuerpo murino monoclonal específico de un neo-epítipo humano C3a, (2) anticuerpos policlonales conjugados con HRP contra la región C3a de C3, y (3) un sustrato cromogénico.

En Paso 1, se añaden los Patrones, Controles y las muestras diluidas a los pocillos recubiertos de anticuerpos C3a murinos monoclonales. El anticuerpo monoclonal se une al C3a de los Patrones, Controles o muestras. Después de la incubación, un ciclo de lavado elimina el material no unido.

En Paso 2, se añaden anticuerpos anti-C3(C3a) conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) a cada pocillo. Los anticuerpos conjugados enzimáticos se unen al C3(C3a) inmobilizado capturado en la primera etapa. Después de un periodo de incubación, un ciclo de lavado elimina el conjugado no unido.

En Paso 3, 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 A<sub>450</sub>. La intensidad del color de la mezcla de reacción es proporcional a la concentración de C3a presente en los Patrones, Controles, y muestras. Los resultados son calculados a partir de la curva estandar generada usando un análisis de 4 parámetros.

## REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

### 96 Ensayos para Complejo C3a

El kit inmunoensayo MicroVue C3a Plus contiene:

- |          |   |                         |                          |
|----------|---|-------------------------|--------------------------|
| <b>A</b> | <b>Patrones C3a Plus</b>  | <b>Cód. 5140 – 5145</b> | <b>1 de cada, 1,5 mL</b> |
| <b>B</b> | Listo para uso. Contiene suero humano con una concentración C3a conocida (ng/mL), estabilizadores |                         |                          |
| <b>C</b> | proteicos   |                         |                          |
| <b>D</b> |   |                         |                          |
| <b>E</b> |   |                         |                          |

<b>L Control bajo</b>	<b>Cód. 5146</b>	<b>1,5 mL</b>
Listo para uso. Contiene suero humano con una concentración C3a conocida (ng/mL), estabilizadores proteicos		
<b>N Control Alto</b>	<b>Cód. 5147</b>	<b>1,5 mL</b>
Listo para uso. Contiene suero humano con concentración C3a conocida (ng/mL), estabilizadores proteicos		
<b>1 Tiras recubiertas</b>	<b>Cód. 5148</b>	<b>12 de cada</b>
Tiras fraccionables de ocho pocillos recubiertas de anticuerpo monoclonal murino en recipiente de aluminio resellable		
<b>2 Solución de parada</b>	<b>Cód. A9947</b>	<b>12 mL</b>
Contiene 1N (4%) Ácido Hidroclórico		
<b>3 Solución de lavado concentrada 20X</b>	<b>Cód. A9957</b>	<b>2 de cada, 50 mL</b>
Contiene PBS, Tween-20® al 0,1%, y Proclin® 300 al 0.035%		
<b>4 Diluyente de muestras</b>	<b>Cód. 5150</b>	<b>50 mL</b>
Contiene una base de proteínas tamponada con Proclin 300 al 0,05%		
<b>5 Sustrato TMB</b>	<b>Cód. 5059</b>	<b>12 mL</b>
Listo para uso. Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		
<b>6 Conjugado</b>	<b>Cód. 5151</b>	<b>12 mL</b>
Contiene Anticuerpo anti C3a polyclonal 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)
- Placa de dilución de 96 pocillos (VWR REF: 47743-828) o tubos de ensayo y portatubos para una dilución de muestra (opcional)
- Placas de microensayos limpias para método de réplica en placas (opcional)
- Contenedor graduado para la dilución de la solución de lavado
- Botella para lavado u otro sistema de lavado homologado para inmunoensayos
- Micropipetas y puntas estériles de pipetas desechable
- Depósitos de reactivos para agregar las soluciones de conjugado, sustrato y de parada (utilice depósitos limpios y sin usar para cada reactivo)
- Pipeta multicanal ajustable (8 o 12 canales) o micropipetas de repetición
- Lector de placas apto para valores de densidad óptica de A<sub>450</sub> entre 0,0 y 3,0
- Agua desionizada o destilada

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

- Para diagnóstico *in vitro*.
- Trate las muestras como material potencialmente peligroso. Siga 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".<sup>(24)</sup>
- 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 añadens 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 10). 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](http://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 25°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.

La nubosidad o decoloración de la Diluyente de Muestras diluída indica un deterioro de este reactivo. Si esto ocurre, la solución debe ser desechada. El color del diluyente de muestras puede variar de rosado a café, lo que es normal y no indica deterioro ni inestabilidad.

## 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 C3a se puede generar en las muestras con manipulación inadecuada a través de la activación del complemento. Para obtener resultados óptimos con plasma, se recomienda usar tubos de recogida K2 EDTA (Fisher REF: 22-040-161).

Valores normales para las muestras de suero son más altas que los obtenidos con EDTA. Los niveles de C3a en plasma EDTA pueden representar con más exactitud las concentraciones *in vivo*.<sup>(25)</sup>

Las muestras de suero, EDTA deben recogerse de forma aséptica usando las técnicas convencionales.<sup>(26)</sup> La muestra debe analizarse de inmediato o guardarse en hielo durante dos horas antes del análisis. Si la muestra no se puede analizar en las dos 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

Para minimizar el tiempo de manipulación de muestras, prepare una placa de dilución (o tubos) y agregue el volumen apropiado de diluyente (como se describe en la sección *Dilución de Muestras* más adelante) antes de descongelar las muestras para su evaluación.

Descongelar las muestras rápidamente en baño de agua a 37°C y ponerlas inmediatamente en hielo para evitar una activación del complemento antes de la dilución. **Mantenga las muestras en hielo durante un máximo de dos horas. 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 C3 y afectar los resultados. Las muestras deben analizarse lo antes posible después de su descongelación. Se pueden realizar hasta sólo un ciclo 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 infecciosas. Usar las Precauciones Universales. No usar muestras inactivadas por calor, contaminadas o conservadas inadecuadamente.**

**NOTA: Consulte en la sección *Descongelación 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.**

**NOTA CRITICA: es fundamental que la recogida de muestras y la dilución se realicen de forma correcta para evitar la activación del complemento y la generación resultante de C3a en las muestras.**

Las muestras **deben** estar diluidas para que los valores de  $A_{450}$  estén por encima del LLOQ sin superar el valor  $A_{450}$  del ULOQ de C3a Plus kit. 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. Identifique 2 juegos de tubos de ensayo mediante etiquetas con números del 1 al N y anote qué muestra corresponde a cada tubo. Como alternativa, puede usarse una placa de dilución de 96 pocillos para hacer las diluciones.

Prepare una dilución adecuada (véase la siguiente sección) de cada muestra utilizando el Diluyente de Muestras. Para cada dilución, mezcle con suavidad para evitar la formación de espuma y burbujas. No almacenar o reutilizar las muestras diluidas.

## Método de dilución

Para obtener resultados óptimos, realice una dilución de dos pasos para preparar cada muestra.

### Plasma

Diluya muestras de plasma en una proporción 1:200 en el Diluyente de Muestras provisto como se indica a continuación:

- Para cada dilución, pipetee 90  $\mu$ l de diluyente de muestras para la dilución 1 y 475  $\mu$ l para la dilución 2 en tubos o placas de dilución independientes.
- Prepare la dilución 1 agregando 10  $\mu$ l de la muestra de ensayo a 90  $\mu$ l de diluyente de muestras (el tubo o placa de dilución 1 de plasma). Mezcle con suavidad.
- Prepare la dilución 2 agregando 25  $\mu$ l de dilución 1 a 475  $\mu$ l de diluyente de muestras (el tubo o placa de dilución 2 de plasma). Mezcle con suavidad.

### Suero

Diluya muestras de suero en una proporción 1:5000 en el Diluyente de Muestras provisto como se indica a continuación:

- Para cada muestra de ensayo, pipetee 490  $\mu$ l de diluyente de muestras para la dilución 1 y 495  $\mu$ l para la dilución 2 en tubos o placas de dilución independientes.
- Prepare la dilución 1 agregando 10  $\mu$ l de la muestra de ensayo a 490  $\mu$ l de diluyente de muestras (el tubo o placa de dilución 1 de suero). Mezcle con suavidad.
- Prepare la dilución 2 agregando 5  $\mu$ l de dilución 1 a 495  $\mu$ l de diluyente de muestras (el tubo o placa de dilución 2 de suero). Mezcle con suavidad.

## Incorporación de las muestras diluidas a la microplaca

**Añadir las muestras diluidas a los pocillos en un plazo de 15 minutos de la aplicación de la primera muestra.** 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 ensayos donde se analizan pocas muestras, los reactivos y muestras diluidas pueden añadirse directamente al pocillo asignado con una micropipeta (100  $\mu$ L/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  $\mu$ L de cada Patrón, Control o muestra diluida a los pocillos recubiertos con anticuerpos individualmente, 120  $\mu$ L a 130  $\mu$ L de cada solución se puede añadir a pocillos individuales en una 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  $\mu$ L 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 25°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*).

### Patrones y Controles

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

### 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.

### 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. Marca una esquina de la microplaca para su orientación.
2. Identifique las placas/ tubos de dilución con etiquetas que correspondan a todas las muestras de ensayo.
3. Agregue diluyente de muestras a las placas/ tubos de dilución. (Consulte *Dilución de la Muestra*).
4. Descongele las muestras de ensayo y dilúyalas de inmediato.
5. Seleccionar un pocillo o más para utilizar de blanco. Añadir 100 µL del diluyente de muestra en el pocillo(s) que se usará como blanco.
6. Añadir 100 µL de cada Patrón C3a (A, B, C, D, E) en los pocillos por duplicado. **NOTA: Los Patrones están listos para uso y no necesitan dilución.**
7. Añadir 100 µL de los controles bajo y alto de C3a en los pocillos por duplicado. **NOTA: Los Controles están listos para uso y no necesitan dilución.**
8. Añadir 100 µL de cada muestra diluida al pocillo asignado. (Consulte *Dilución de la Muestra*).
9. Incubar 60 min ± 10 min a 18°C a 25°C.
10. Lavar los pocillos como sigue:
  - a. Después de la incubación del paso 9 (o paso 12 siguiente) eliminar el líquido de cada pocillo.
  - b. Añadir 300 µL 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” tres veces adicionales.**

- e. Después del cuarto ciclo de lavado invertir la placa, y golpearla con fuerza dos veces sobre papel absorbente para sacar cualquier líquido residual (en caso de lavado manual).
11. Usando una pipeta de repetición o multicanal, dispensar 100 µL de Conjugado C3a en cada pocillo lavado, blancos incluidos.
  12. Incubar las tiras 60 ± 10 minutos a 18°C a 25°C
  13. Lavar los pocillos después de 60 minutos de incubación (paso 12) como está descrito en *PROCEDIMIENTO DE ENSAYO*, paso 10.
  14. Inmediatamente después del lavado, añadir 100 µL de la Solución de Sustrato en cada pocillo, blancos incluidos.
  15. Incubar las tiras 15 ± 1 minutos a 18°C a 25°C.
  16. Añadir 100 µL 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.**
  17. 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 16), realizando la corrección en blanco necesaria.
  18. Determine la concentración de las muestras y controles a partir de la curva estándar.
  19. 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 C3a Plus contiene controles Bajo y Alto 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.

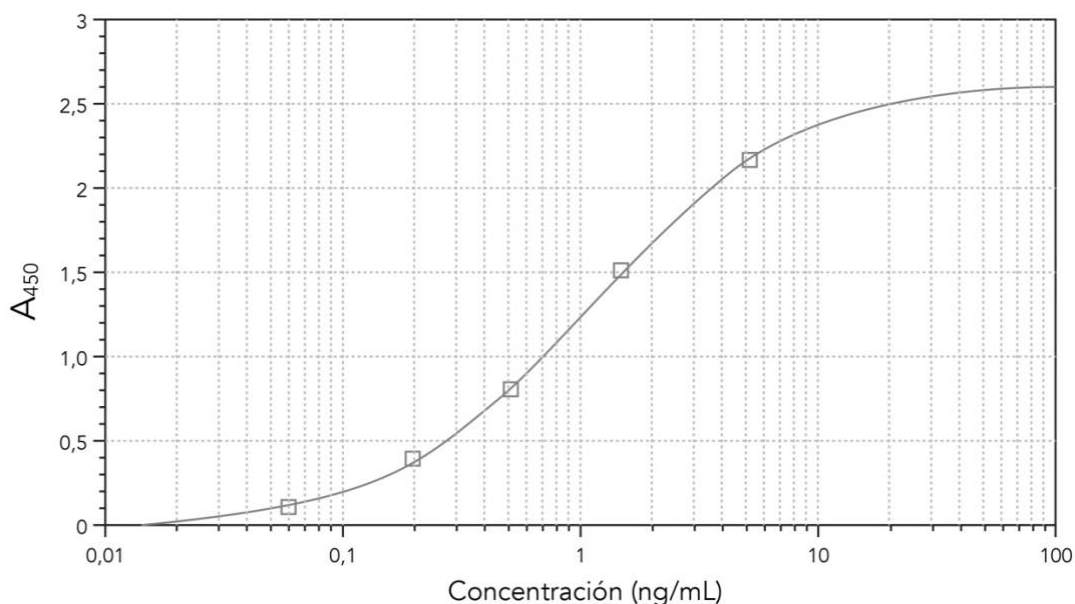
## INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

### Cálculo de los Resultados

**Uso de la Curva Estándar:** La curva estándar para el inmunoensayo C3a Plus 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. Ejemplo de una curva estándar típica (Figura 1).



**Figura 1**  
**Curva estándar representativa**



### Cálculo de la concentración actual de C3a en la muestra

La concentración asignada del certificado de análisis son unidades absolutas de C3a. La concentración de C3a 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 1:200 para el ensayo, y la curva logística de 4 parámetros da la concentración de 0,5 ng C3a/ml, la concentración de C3a en la muestra sería de 100 ng C3a/ml (o  $200 \times 0,5$ ).

Cuando ensayos dan valores  $A_{450}$  superiores al ULOQ o dan valores más bajos que el LLOQ, formular diluciones nuevas y repetir el ensayo para obtener una concentración más precisa donde los nuevos valores  $A_{450}$  estén entre los límites deseados.

### Validación

Determine la asíntota superior (D) y el coeficiente de correlación del ajuste de la curva logística de 4 parámetros derivado de los estándares de C3a Plus A, B, C, D y E. Los valores deben encontrarse dentro de los intervalos especificados para aprobar el ensayo:

---

Coeficiente de correlación( $r^2$ ):  $> 0,98$

Asíntota superior (D):  $\geq 1,49$

---

Consulte el certificado de análisis para conocer el rango de concentración de C3a aceptable para los controles alto y bajo.

### LIMITACIONES

El inmunoensayo enzimático MicroVue C3a Plus se ha utilizado para analizar muestras de suero y plasma K2 EDTA. 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 C3a Plus. Los resultados son los siguientes:

	n	Concentración (ng/mL)	Rango (ng/mL)
Plasma EDTA	20	129,6	33,8 a 268,1
Suero	20	240,4	71,0 a 589,2

NOTA: Las concentraciones C3a 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 C3a Plus es de 0,012 ng/ml, determinado por el límite superior de 3SD basado en un estudio de estandar cero.

**LLOQ:** El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para el ensayo C3a Plus es 0,023 ng/ml, que es la concentración más baja de la curva estándar que cumpla los criterios del interior para la exactitud y precisión.

**ULOQ:** El límite de cuantificación superior (ULOQ) del ensayo C3a Plus es de 2,531 ng/ml, la concentración más alta en la curva estándar que cumplió con los criterios internos de exactitud y precisión. Las muestras diluidas con una concentración por encima de este límite deberían volver a analizarse en una dilución mayor.

### Interferencias

Las siguientes sustancias fueron analizadas en el ensayo de C3a Plus y se constató que no interfieren:

Sustancia	Concentración
Albúmina	6000 mg/dL
y Globulina	6000 mg/dL
Bilirubina	20 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Triglicéridos	3000 mg/dL
Na + Heparina	3 U/mL
Glucosa	1000 mg/dL
Colesterol	500 mg/dL
EDTA	10 mM
C3 Proteína	5 µg/mL
C5 Proteína	5 µg/mL
C5a	5 µg/mL

## 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	C3a	Intra-ensayo <sup>1</sup>	Inter-ensayo <sup>2</sup>
	(ng/mL)	C.V. (%)	C.V. (%)
Plasma EDTA	55,80	4,7	14,7
	119,5	5,0	19,6
Suero	533,3	5,3	8,3
	2308	4,5	5,9

<sup>1</sup>n = 20 replicados    <sup>2</sup>n = 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 C3a (ng/mL)	Recuperación (%)
Plasma EDTA	175	67,88	105,5
	200	64,36	100,0
	225	63,67	98,9
	250	62,99	97,9
	275	65,13	101,2
	300	65,54	101,8
Suero	1250	2097	96,5
	2500	2128	97,9
	5000	2173	100,0
	10000	2160	99,4
	20000	2196	101,1
	40000	2423	111,5

## Recuperación

Se realizó la recuperación de la concentración máxima mediante la cromatografía de muestras con una cantidad conocida de C3a purificado y comparando los valores observados con los esperados.

Maestra	C3a (ng/mL)	Spike (ng/mL)	Resultado (ng/mL)	Recuperación (%)
Serum 1	1021		2788	99,7
Serum 2	615,1	1775	2343	98,0
Serum 3	2080		3677	95,4
Plasma 1	53,4		230,5	99,7
Plasma 2	87,4	177,8	240,7	90,8
Plasma 3	118,3		278,8	94,1

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

## REFERENCIAS

1. Markiewski, M. Maciej, Dimitrios Mastellos, Ruxandra Tudoran, Robert A. DeAngelis, Christoph W. Strey, et al. 2004. C3a and C3b Activation Products of the Third Component of Complement (C3) Are Critical for Normal Liver Recovery after Toxic Injury. *The Journal of Immunology*. 173: 747-754. <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/173/2/747>.
2. Hugli, Tony E. 1975. Human Anaphylatoxin (C3a) from the Third Component of Complement. Primary Structure. *Journal of Biological Chemistry*. 250(21):8293-8301.
3. Morgan, Edward L., William O. Weigle and Tony E. Hugli. 1982. Anaphylatoxin-Mediated Regulation of the Immune Response, I. C3a-mediated Suppression of Murine Humoral Immune Responses. *J. Exp. Med.* 155:1412-1426.
4. Hugli, Tony E. and Hans J. Muller-Eberhard. 1978. Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Advances in Immunology*. 26:1-53.
5. Hugli, Tony E. 1986. Biochemistry and Biology of Anaphylatoxins. *Complement*. 3:111-127.
6. Purwar, Rahul, Miriam Wittmann, Jorg Zwirner, Martin Oppermann, et al. 2006. Induction of C3 and CCL2 by C3a in Keratinocytes: A Novel Autocrine Amplification Loop of Inflammatory Skin Reactions. *J. Immunol.* 177: 4444-4450.
7. Mack, W.J., A.F. Ducruet, Z.L. Hickman, M.C. Garrett, et al. 2007. Early plasma complement C3a levels correlate with functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 61(2):255-60; discussion 260-1.
8. Burns, Victoria E., Kate M. Edwards, Christopher Ring, Mark Drayson, and Douglas Carroll. 2008. Complement Cascade Activation After an Acute Psychological Stress Task. *Psychosom Med.* 70:387-396.
9. Marcheix, B., Michel Carrier, Catherine Martel, Marieve Cossette, et al. 2008. Effect of Pericardial Blood Processing on Postoperative Inflammation and the Complement Pathways. *Ann. Thorac. Surg.* 85:530-535. doi: 10.1016/j.athoracsur.207.08.050.
10. Gerasimidis, Thomas, Giorgos Sfyroeras, Giorgos Trellopoulos, Lemonia Skoura, Konstantinos Papazoglou, Konstantinos Konstantinidis, ... Efthimia Parapanisiou. 2005. Impact of Endograft Material on the Inflammatory Response After Elective Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *Angiology*. 56(6):743-753.
11. Hoenich, Nicholas A. and Kostas P. Katopodis. 2002. Clinical characterization of a new polymeric membrane for use in renal replacement therapy. *Biomaterials*. 23:3853-3858.
12. Rinder, Christine S., Henry M. Rinder, Michael J. Smith, Jayne B. Tracey, Jane Fitch, Lan Li, ... Brian R. Smith. 1999. Selective Blockade of Membrane Attack Complex Formation During Simulated Extracorporeal Circulation Inhibits Platelet but not Leukocyte Activation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 118:460-466.
13. Smith, Brian Richard, Henry M. Rinder, and Christine S. Rinder. 2002. Interaction of Blood and Artificial Surfaces. *Thrombosis and Hemorrhage, 3rd Edition*. Chapter 42.
14. Gasche, Yvan, Manuel Pascual, Peter M. Suter, Herve Favre, Jean-Claude Chevrolet and Jurg A. Schifflerli. 1996. Complement depletion during haemofiltration with polyacrylonitrile membranes. *Nephrol Dial Transplant*. 11:117-119.
15. Sperling, Claudia, Manfred F. Maitz, Sandra Talkenberger, Marie-Francoise Gouzy, Thomas Groth, and Carsten Werner. 2007. *In vitro* blood reactivity to hydroxylated and nonhydroxylated polymer surfaces. *Biomaterials*. doi:10.1016/j. biomaterials.2007.04.041.
16. Frangogiannis, Nikolaos G., C. Wayne Smith, and Mark L. Entman. 2002. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Res.* 53:31-47.
17. Fareed, Jawed, Debra A. Hoppensteadt, Fred Leya, Omer Iqbal, Helmut Wolf, and Roger Bick. 1998. Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes. *Clin Chem.* 44:8(B):1845-1853.
18. Arumugam, Thiruma V., Sung-Chun Tang, Justin D. Lathia, Aiwu Cheng, Mohamed R. Mughal, ... Mark P. Mattson. 2007. Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *PNAS*. 104(35):14104-14109. [www.pnas.org](http://www.pnas.org) doi:10.1073.pnas.0700506104.
19. Van Beek, Johan, Kristina Elward, and Philippe Gasque. 2003. Activation of Complement in the Central Nervous System: Roles in Neurodegeneration and Neuroprotection. *Ann NY Acad Sci.* 992:56-71.

20. Sheerin, N.S. and S.H. Sacks. 2002. Leaked protein and interstitial damage in the kidney: is complement the missing link? *Clin Exp Immunol.* 130:1-3.
21. Bengtsson, A., H. Redl, G. Schlag, K Hogasen, O. Gotze, and T.E. Mollnes. 1998. Anti-TNF Treatment of Baboons with Sepsis Reduces TNF- $\alpha$  IL-6 and IL-8, but not the Degree of Complement Activation. *Scand J Immunol.* 48:509–514.
22. Haas, Pieter-Jan and Jos van Strijp. 2007. Anaphylatoxins: Their Role in Bacterial Infection and Inflammation. *Immunol Res.* 37(3):161-175.
23. Black, Sylvester M., John F. Grehan, Andrew L. Rivard, Barbara A. Benson, Andrea E. Wahner, ... Agustin P. Dalmasso. 2006. Porcine Endothelial Cells and Iliac Arteries Transduced with AdenoIL-4 Are Intrinsically Protected, through Akt Activation, against Immediate Injury Caused by Human Complement. *J. Immunol.* 177:7355-7363.
24. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 2007. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition.* Washington: U.S. Government Printing Office.  
<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>.
25. Mollnes, T.E., P. Garred, and G. Bergseth. 1988. 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. Immunology.* 73:484 488.
26. Centers for Disease Control. 1987. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR.* 36 (suppl. No. 2S):001.

**REF** A032 – MicroVue C3a 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)

**PIA032002ES00 (09/21)**

## GLOSARIO

---

**REF**

Número del catálogo



Marca CE de conformidad

---

**EC REP**

Representante autorizado  
en la Comunidad Europea

**LOT**

Código de lote

---



Fecha de caducidad



Fabricante

---



Limites de temperatura



Indicaciones

---



Consulte los instrucciones  
e-etiquetado de uso



Riesgo biológico

---

**IVD**

Para uso diagnóstico *in vitro*



Contiene una cantidad suficiente para  
96 determinaciones

---

**CONT**

Contenido / Contiene

**CONTROL**

Control

---