

Um imunoenensaio enzimático para a quantificação do fragmento C4a da proteína do complemento C4 em soro ou plasma de humanos

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

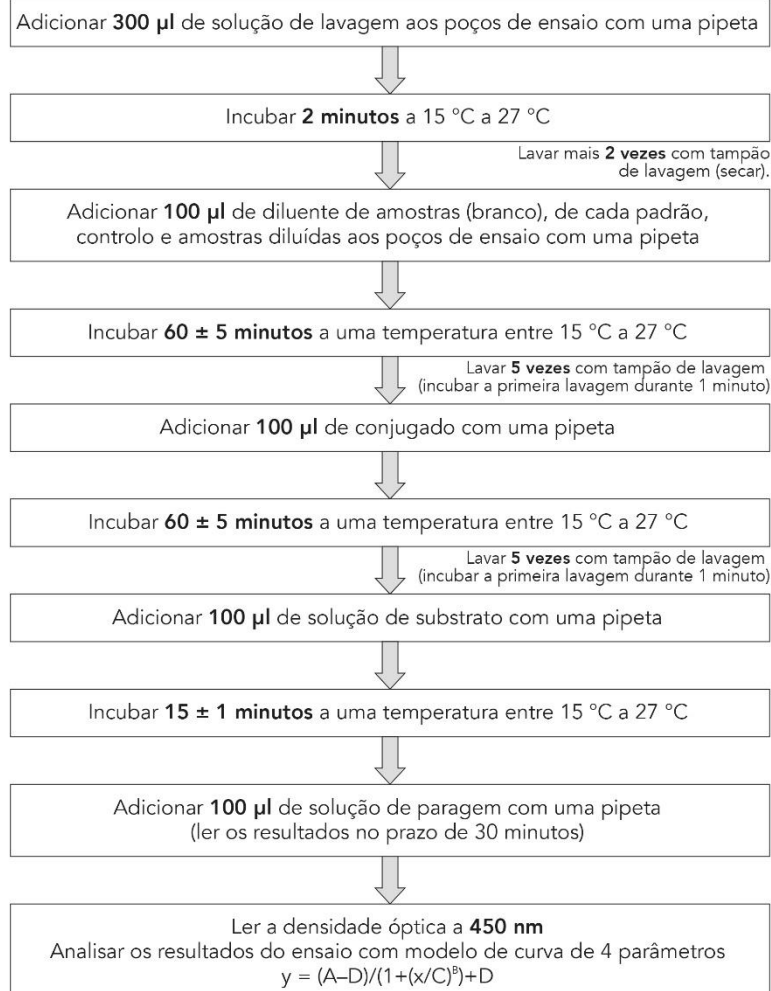
Pode consultar um glossário de símbolos em quidel.com/glossary.

SUMÁRIO

Preparação do Reagente, dos Padrões, dos Controlos e da Amostra

- Diluir concentrado de tampão de lavagem na proporção de 1:20 com água desionizada.
- Diluir amostras de plasma na proporção de 1:40 com diluente de amostras (por exemplo, 10 µl de amostra + 390 µl de diluente)
- Diluir amostras de soro na proporção de 1:80 com diluente de amostras (por exemplo, 10 µl de amostra + 790 µl de diluente)

Procedimento do Ensaio





FINALIDADE

O kit de imunoensaio enzimático MicroVue C4a mede a quantidade de fragmento C4a do complemento, um fragmento de activação da proteína do complemento C4 em plasma ou soro de humanos e de primatas. A medição de C4a em plasma ou soro humano fornece provas do envolvimento das vias clássica ou da lectina do complemento.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O imunoensaio enzimático MicroVue C4a é um ensaio com 96 poços, de captura directa, que mede a quantidade de C4a em soro, plasma e outras amostras biológicas ou experimentais de humanos ou primatas. Em condições normais, a activação das vias clássica ou da lectina do complemento resulta na clivagem da proteína do complemento, C4 em C4a e C4b pela protease C1s. O C4a é rapidamente clivado na sua forma mais estável e menos activa, o C4a-des Arg, pela enzima endógena carboxipeptidase N no soro. Por conseguinte, a quantificação de C4a-des Arg deve facultar uma medição fiável da activação pelas vias clássica ou da lectina, ocorrida nas amostras de ensaio.¹⁻⁴

O ensaio MicroVue C4a, que oferece um procedimento rápido, altamente específico e quantitativo para a medição dos níveis de C4a, destina-se a investigações que estudam o papel ou estado de activação da via do complemento em inúmeros cenários de investigação, bem como à monitorização da produção de C4a *in vivo* ou *in vitro*. C4a é a mais fraca das anafilatoxinas, em comparação com a C3a e a C5a, no entanto, desempenha um importante papel de produção de alterações de permeabilidade vascular, indução de contracção muscular suave e libertação de histamina dos mastócitos e basófilos. Crê-se que o fragmento C4a é importante em várias doenças auto-imunes incluindo artrite reumatóide, lúpus eritematoso disseminado (LED) e glomerulonefrite aguda.⁵⁻¹⁵ Foi recentemente identificado como marcador da doença de Lyme aguda e crónica borreliose.¹⁶⁻¹⁷

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O imunoensaio enzimático MicroVue C4a para a quantificação de C4a no plasma ou soro humano é um procedimento de três passos que utiliza (1) uma placa de microensaio revestida com anticorpo monoclonal de rato que liga especificamente a C4a humano, (2) um anticorpo monoclonal anti-C4a humano, conjugado com HRP e (3) um substrato cromogénico.

No passo 1, são adicionados padrões, controlos e amostras de teste aos poços do microensaio previamente revestidos com um anticorpo monoclonal anti-C4a específico. O C4a, mas não o C4 ou outros produtos de activação do complemento, presente nas amostras irá ligar-se ao anticorpo monoclonal anti-C4a imobilizado. Após a incubação, um ciclo de lavagem remove o material não ligado.

No passo 2, é adicionado anticorpo monoclonal anti-C4a humano conjugado com peroxidase de rábano (HRP) a cada poço do ensaio. O anticorpo anti-C4a humano conjugado com enzimas liga-se ao C4a capturado nos poços do microensaio. Após a incubação, um ciclo de lavagem remove o excesso de conjugado não ligado.

No passo 3, é adicionado um substrato cromogénico de enzimas a cada poço do microensaio. O conjugado de HRP ligado reage com o substrato, formando uma cor azul. Após a incubação, a reacção enzimática é quimicamente interrompida, a cor altera-se para amarelo e a intensidade da cor é medida espectrofotometricamente A_{450} nm. A intensidade da cor da mistura de reacção é proporcional à concentração de C4a presente nas amostras de teste, nos padrões e controlos.

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

96 Ensaios para fragmento C4a da proteína do complemento, C4

O kit de imunoenensaio enzimático MicroVue C4a contém o seguinte:

- | | | | |
|----------|---|--------------------------------|-------------------------|
| A | Padrões C4a | Referências 5204 – 5208 | 1,5 ml cada |
| B | Prontos a usar. Cada um contém proteína C4a humana nativa, purificada, com uma concentração de | | |
| C | proteínas atribuída (ng/ml), estabilizadores de proteínas | | |
| D | | | |
| E | | | |
| L | Controle Baixo de C4a | Referência 5209 | 1,5 ml |
| | Pronto a usar. Contém proteína C4a humana nativa, purificada, com uma concentração atribuída (ng/ml), estabilizadores de proteínas | | |
| H | Controle Alto de C4a | Referência 5210 | 1,5 ml |
| | Pronto a usar. Contém proteína C4a humana nativa, purificada, com uma concentração atribuída (ng/ml), estabilizadores de proteínas | | |
| 1 | Placa de Microensaio | Referência 5198 | 12 x 8 poços |
| | Tiras de oito poços, revestidas com anticorpo monoclonal murínico, específicas para C4a humano, numa bolsa de alumínio com fecho reutilizável | | |
| 2 | Solução de Parada | Referência A9947 | 12 ml |
| | Contém ácido hidrocloreídrico 1N (4%) | | |
| 3 | Concentrado da Solução de Lavagem 20X | Referência A9957 | 2 de cada, 50 ml |
| | Contém solução tampão salina de fosfato (PBS), 1,0% de TWEEN-20® e 0,035% de ProClin® 300 | | |
| 4 | Diluição de Amostras | Referência A3670 | 50 ml |
| | Contém PBS, 0,05% de TWEEN-20, 2,5% de estabilizadores de proteínas e 0,035% de ProClin 300 | | |
| 5 | Substrato TMB | Referência 5059 | 12 ml |
| | Pronto a usar. Contém 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂) | | |
| 6 | Conjugado | Referência 5211 | 12 ml |
| | Contém anticorpo monoclonal anti-C4a humano, conjugado com peroxidase de rábano suspenso em tampão de estabilização de HRP com conservante | | |

TWEEN® é uma marca comercial registada da Croda Americas LLC.

ProClin® é uma marca comercial registada da Dow Chemical Company (Dow) ou de uma empresa afiliada da Dow.

MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Temporizador (60 minutos)
- Placas de microensaio limpas, não utilizadas, placa de diluição com 96 poços e/ou tubos de ensaio e suportes.
- Recipiente para diluição do tampão de lavagem
- Frasco de lavagem ou outro sistema de lavagem válido para o imunoenensaio
- Micropipetas e pontas de pipetas esterilizadas, descartáveis
- Pipeta multicanal (8 ou 12 canais) ajustável ou micropipetas de repetição
- Pipetas limpas de 1 ml, 5 ml e 10 ml.
- Reservatórios de reagentes para adicionar conjugado, substrato e soluções de paragem à placa (utilizar reservatórios limpos, não utilizados para cada reagente)
- Leitor de placas com capacidade para efectuar leituras de A₄₅₀ entre 0,0 e 3,0
- Água desionizada ou destilada

AVISOS E PRECAUÇÕES

- Só para uso 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 única, 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 a 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 é considerada corrosiva e pode provocar irritação. Não ingerir. Evitar o contacto com os olhos, a pele e o vestuário. Em caso de contacto, lavar imediatamente a área afectada com água. Em caso de ingestão, consultar um médico.
- Cada unidade dadora utilizada na preparação de padrões e de controlos deste produto foi testada (segundo métodos aprovados pela FDA) em relação à presença do anticorpo do vírus da imunodeficiência humana (VIH1 e VIH2) e do vírus da hepatite C, bem como do antigénio de superfície da hepatite B. Uma vez que não existe qualquer método de teste que possa garantir a total ausência de agentes infecciosos, estes reagentes devem ser manuseados ao Nível 2 da Biossegurança, tal como é recomendado para amostras de soro ou de sangue humano potencialmente infecciosas no manual dos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças/Instituto Nacional de Saúde (EUA), "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories".¹⁸
- Para assegurar a distribuição atempada dos reagentes, recomenda-se a utilização de pipetas multicanal ou de repetição.
- Para uma medição precisa das amostras, adicionar as amostras e os padrões com precisão. Utilizar a pipeta com cuidado, recorrendo apenas a equipamento calibrado.
- A colheita e a conservação correctas das amostras de teste são essenciais para a obtenção de resultados precisos (ver *PREPARAÇÃO E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS*).
- Evitar a contaminação microbiana ou contaminação cruzada de amostras ou reagentes.
- Analisar cada amostra em duplicado.
- Não usar um poço de microensaio mais do que uma vez.
- 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 e do contacto com metal ou borracha durante o armazenamento e a 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 se iniciar o ensaio.
- Ao remover líquido dos poços do microensaio, não raspar nem tocar no fundo dos poços.
- As amostras hiperlipémicas, inactivadas pelo calor 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 dentro de um frasco com lixívia doméstica.
- Deve ser utilizado um frasco de lavagem ou dispositivo de enchimento automático para lavar a placa (*PROCEDIMENTO DO ENSAIO*, passo 6). Para melhores resultados, não utilizar uma pipeta multicanal para lavar a placa do microensaio.
- Os testes devem ser realizados numa área com ventilação adequada.
- 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.

INDICAÇÕES DE INSTABILIDADE OU DE DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES

A turvação ou descoloração da solução de lavagem diluída indica a sua deterioração. Se isso acontecer, eliminar a solução.

PREPARAÇÃO E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Manusear e eliminar todas as amostras, seguindo as precauções universais.

Todos os procedimentos de manuseamento de amostras devem ser realizados a uma temperatura entre 2 °C a 8 °C.

Colheita de Amostras

Soro/Plasma

Devido à activação do complemento, que ocorre durante a coagulação, a concentração de C4a nas amostras de soro humano normal será superior à concentração obtida nas amostras de plasma EDTA. Os níveis de C4a no plasma EDTA poderão, por isso, representar as concentrações *in vivo* com maior precisão.

O fragmento C4a é susceptível a proteólise em amostras colhidas ou conservadas de modo inapropriado e poderá ser gerado C4a em amostras incorrectamente manuseadas, através da activação do complemento artificial; por conseguinte, é essencial a colheita, a conservação e o manuseamento das amostras de modo correcto.¹⁹ Para obter óptimos resultados de plasma, recomenda-se a utilização de tubos de colheita EDTA K2 ou K3.

As amostras de soro e plasma EDTA devem ser colhidas assepticamente utilizando técnicas padrão.²⁰ As amostras devem ser imediatamente testadas ou armazenadas em gelo por um período não superior a quatro horas antes da realização do ensaio.

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

Descongelamento das Amostras

Para minimizar o tempo de manuseamento das amostras, preparar uma placa (ou tubos) de diluição e adicionar o volume apropriado de diluente (conforme descrito na secção "Diluição de Amostras" abaixo), antes de descongelar amostras para avaliação.

Descongelar as amostras congeladas rapidamente a 37 °C. Colocar imediatamente as amostras descongeladas em gelo para evitar a activação do complemento antes da diluição. Manter as amostras em gelo por um período não superior a quatro horas. Não deixar as amostras à temperatura de 37 °C, uma vez que poderá ocorrer activação do complemento. Não descongelar amostras à temperatura ambiente ou sobre gelo, dado que tal poderá originar a activação do complemento e afectar o resultado do ensaio. As amostras devem ser analisadas o mais rápido possível após a descongelação. Poderão ser realizados até cinco ciclos de congelação e descongelação, sem afectar as amostras. Se for necessário recongelar as amostras para posterior análise, a Quidel sugere a congelação de várias alíquotas da amostra, para não exceder o número de ciclos de congelação/descongelação recomendados.

Diluição de Amostras

ATENÇÃO: tratar todas as amostras como potencialmente infecciosas. Seguir as precauções universais. Não utilizar amostras inactivadas pelo calor, contaminadas ou que tenham sido conservadas incorrectamente.

NOTA: consultar notas importantes sobre os métodos adequados de descongelamento de amostras congeladas na secção Descongelamento das Amostras. Um manuseamento adequado das amostras é essencial para a obtenção de resultados precisos.

As amostras **devem** ser diluídas para que os valores observados fiquem acima do limite de quantificação inferior (LLOQ) e não excedem o limite de quantificação superior (ULOQ). As amostras com leituras fora destes limites devem ser novamente analisadas com uma nova diluição.

Preparar uma diluição adequada (ver a secção seguinte) de cada amostra, utilizando o diluente de amostras. Misturar suavemente cada diluição, evitando a formação de espuma e de bolhas. Não armazenar nem reutilizar amostras diluídas.

Plasma

A proporção de diluição recomendada para amostras de plasma no diluente de amostras é de 1:40. Realizar a diluição da seguinte forma:

10 µl de amostra + 390 µl de diluente de amostras

Soro

A proporção de diluição recomendada para amostras de soro no diluente de amostras é de 1:80. Realizar a diluição da seguinte forma:

10 µl de amostra + 790 µl de diluente de amostras

Nas amostras com níveis elevados de activação do complemento, poderá ser necessária uma diluição das amostras maior do que as indicadas acima.

Adição de Amostras Diluídas aos Poços de Microtitulação

Concluir a adição de amostras diluídas nos poços de microtitulação até 15 minutos após a aplicação da primeira amostra.

Podem ser utilizados dois métodos para adicionar amostras diluídas, padrões, controlos e tampão aos poços (ver passo 4 do *PROCEDIMENTO DO ENSAIO*). Para a realização de ensaios em que apenas são analisadas algumas amostras, as amostras diluídas e outros reagentes podem ser adicionados directamente nos respectivos poços com uma micropipeta (100 µl/poço). Para a realização de grandes ou pequenos ensaios, mas especialmente grandes, a Quidel recomenda utilizar o procedimento “réplica de placas” descrito abaixo, para colocar padrões, controlos e amostras diluídas nos poços do microensaio o mais rapidamente possível.

Utilizar uma pipeta multicanal para adicionar 120 µl a 130 µl de cada solução nos poços individuais de uma placa em branco (não fornecida), correspondente ao padrão final do EIA pretendido. Depois de todas as soluções a testar terem sido adicionadas aos poços de 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.

O procedimento de “réplica de placas” pode ser convenientemente utilizado para adicionar o conjugado, o substrato, bem como a solução de paragem.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Permitir que todos os reagentes e materiais atinjam uma temperatura entre 15 °C a 27 °C, antes de os utilizar.

Depois de retirar os reagentes e materiais necessários, voltar a armazenar os materiais não usados respeitando as respectivas temperaturas de conservação (*ver ARMAZENAMENTO*).

Tiras de Microensaio

Determinar o número de tiras necessário para o ensaio. A Quidel recomenda testar os poços em branco, os controlos e os padrões em duplicado. 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 na estrutura da placa de ensaio.

Solução de Lavagem

Homogeneizar o concentrado da solução de lavagem 20X, invertendo o frasco várias vezes. Se 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 e 50 °C até à dissolução completa de todos os cristais e, depois, misturar bem o conteúdo. Preparar a solução de lavagem, diluindo todo o conteúdo de um dos frascos de concentrado de solução de lavagem 20X num litro de água destilada ou desionizada. Misturar bem. A solução de lavagem mantém-se estável durante 30 dias, quando conservada num recipiente limpo a uma temperatura entre 2 °C a 8 °C. Caso ocorra descoloração ou turvação, eliminar o reagente.

Padrões e Controlos

Os padrões e controlos são fornecidos prontos a usar e não requerem diluição ou preparação antes da utilização.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Ler o folheto informativo do produto na íntegra antes de iniciar o ensaio.

Consultar ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES e PREPARAÇÃO DOS REAGENTES.

1. Registrar as posições dos poços do microensaio correspondentes ao(s) poço(s) em branco, todas as amostras de ensaio, padrões e controlos, bem como os números de lote indicados nos rótulos dos frascos. Colocar uma etiqueta de orientação num canto da placa de microensaio.
2. Preparar as tiras do microensaio do modo a seguir indicado.
 - a. Re-hidratar 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 entre 15 °C a 27 °C, durante 2 minutos.
 - c. Remover o líquido de cada poço.
 - d. Adicionar cerca de 300 µl de solução de lavagem a cada poço.
 - e. Remover o líquido de cada poço.
 - f. Repetir os passos d-e mais uma vez para obter um total de três lavagens.**
 - g. Inverter a placa e bater firmemente duas vezes sobre papel absorvente para remover o líquido remanescente.
3. Seleccionar um ou mais poços para serem utilizados como branco. Adicionar 100 µl de diluente de amostras ao(s) poço(s) onde será colocado o leitor de placas para ensaio em branco.
4. Adicionar 100 µl de padrões, controlos ou amostras diluídas aos poços duplicados atribuídos. A placa deve ser enchida na totalidade, até 15 minutos depois de se colocar a primeira amostra na placa.
5. Incubar a uma temperatura entre 15 °C a 27 °C, durante 60 ± 5 minutos.
6. Lavar os poços do microensaio 5 vezes, no total, utilizando o seguinte procedimento:

- a. Aspirar o conteúdo de cada poço.
 - b. Adicionar cerca de 300 µl de solução de lavagem a cada poço, utilizando um frasco de lavagem ou dispositivo automático de lavagem de placas.
 - c. Incubar os poços durante 1 minuto, a uma temperatura entre 15 °C a 27 °C.
 - d. Aspirar o conteúdo de cada poço.
 - e. Inverter a placa e bater firmemente sobre papel absorvente, para remover o líquido remanescente.
 - f. Adicionar cerca de 300 µl de solução de lavagem a cada poço.
 - g. Aspirar o conteúdo de cada poço.
 - h. Inverter a placa e bater firmemente sobre papel absorvente, para remover o líquido remanescente entre cada lavagem.
 - i. Repetir os passos f-h mais quatro vezes para obter um total de cinco lavagens.**
 - j. Após o quinto ciclo de lavagem, inverter a placa e bater firmemente sobre papel absorvente, para remover o líquido remanescente.
7. Utilizando uma pipeta multicanal ou de repetição, colocar 100 µl de conjugado de C4a em cada poço de teste lavado, assim como no(s) poço(s) em branco.
 8. Incubar as tiras do microensaio a uma temperatura entre 15 °C a 27 °C, durante 60 ± 5 minutos.
 9. Lavar os poços do microensaio após o período de incubação de 60 minutos (passo 8), tal como é descrito em *PROCEDIMENTO DE ENSAIO*, passo 6.
 10. Imediatamente após o procedimento de lavagem, colocar 100 µl da solução de substrato TMB em cada poço, incluindo o(s) poço(s) em branco.
 11. Incubar as tiras do microensaio a uma temperatura entre 15 °C a 27 °C, durante 15 ± 1 minutos.
 12. 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.
 13. Bater levemente a placa na parte superior da bancada para dispersar uniformemente e completamente 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.
 14. Determinar a leitura da absorvância a 450 nm para cada poço de teste, até 30 minutos após a adição da solução de paragem (passo 12), fazendo uma correcção dos brancos, em conformidade com o sistema espectrofotométrico utilizado.
 15. Determinar a concentração de amostras e controlos a partir da curva padrão.
 16. Eliminar as restantes amostras diluídas, o substrato, bem como as tiras do microensaio utilizadas (ver *ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES*).

CONTROLO DE QUALIDADE

O Certificado de Análise incluído neste kit é específico do lote e deve ser utilizado para verificar se os resultados obtidos no 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 laboratório podem ser diferentes.

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

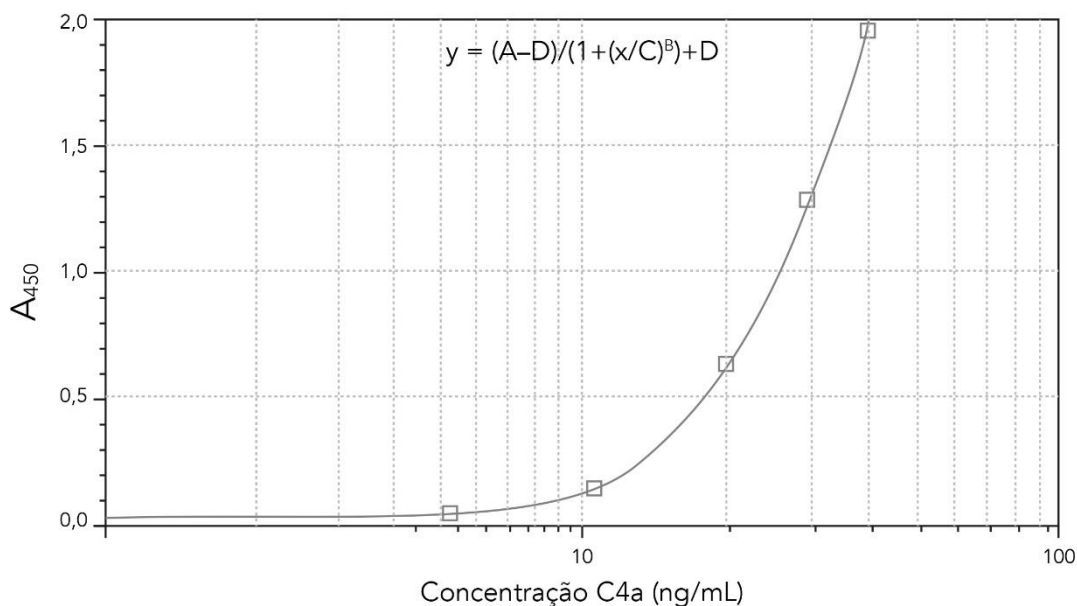
INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Utilização da Curva Padrão: A curva padrão para o EIA C4a é gerada utilizando os valores A_{450} com subtração dos valores de branco para cada padrão (no eixo y) e a concentração atribuída a cada padrão de C4a (no eixo x). Após a regressão de 4 parâmetros, a curva padrão gerada deve cumprir com os requisitos de validação (ver abaixo). A maior parte do software e computadores de leitura de placas 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.

Curva Padrão Representativa

Figura 1



Amostra	A ₄₅₀	ng/ml
Padrão A	0,05	5,19
Padrão B	0,179	10,51
Padrão C	0,657	20,29
Padrão D	1,301	29,57
Padrão E	1,956	40,34

Cálculo da Concentração Real de C4a nas Amostras para Ensaio

A concentração real de C4a presente em cada amostra não diluída é determinada multiplicando a concentração de C4a em ng/ml, calculada a partir da curva padrão do kit, pelo valor recíproco do factor de diluição da amostra utilizado.

Se os valores A₄₅₀ para uma determinada amostra forem superiores aos valores do padrão mais elevado (E), os resultados devem ser comunicados como sendo “maiores do que” a concentração de C4a do padrão mais elevado (E), multiplicado pelo factor de diluição da amostra. Se for necessário um valor de concentração de C4a mais preciso, a amostra deve ser novamente submetida a ensaio, utilizando um factor de diluição superior. Em todos os ensaios repetidos, os padrões e controlos de C4a devem também ser novamente analisados.

VALIDAÇÃO

coeficiente de correlação (r): ≥ 0,98
branco: ≤ 0,150

Consulte o certificado de análise para obter o intervalo de concentração de C4a aceitável para os Controlos Baixo e Alto.

LIMITAÇÕES

O imunoensaio enzimático MicroVue C4a tem sido utilizado para analisar amostras colhidas, como soro ou plasma em EDTA K2 ou K3. Não se recomenda a utilização de plasma citratado ou plasma com heparina no ensaio MicroVue C4a, uma vez que produzirão resultados erróneos. Não foram analisados outros anticoagulantes.

VALORES OBSERVADOS

Foi realizado um ensaio a soro e plasma EDTA de 32 e 44 dadores normais, respectivamente, no kit de imunoensaio enzimático MicroVue C4a. Os resultados são apresentados a seguir.

Amostra	n	Média (ng/ml)	Intervalo (ng/ml)
EDTA-plasma	32	1694,65	383,50 a 8168,17
Serum	44	1098	20,92 a 4437,24

NOTA: O valor médio e o desvio padrão (DP) das concentrações do fragmento C4a determinados para as amostras de plasma ou de soro podem variar entre laboratórios. Por conseguinte, recomenda-se que cada laboratório determine os valores da concentração média do fragmento C4a e do desvio padrão das amostras.

DESEMPENHO DO ensaio

Limites

LOD: o limite de detecção (LOD) para o EIA C4a é de 0.29 ng/ml, determinado pelo limite superior de 3DP num estudo de padrão zero.

LLOQ: o limite de quantificação inferior (LLOQ) para o EIA C4d é de 5,0 ng/ml, a concentração mais baixa na curva padrão que cumpriu com os critérios CLSI relativamente a exactidão e precisão.

ULOQ: o limite de quantificação superior (ULOQ) para o EIA C4a é de 61 ng/ml, a concentração mais alta que cumpriu com os critérios CLSI relativamente a exactidão e precisão.

Substâncias Interferentes

As seguintes substâncias foram testadas na EIA C4a e encontrados para não interferir com o ensaio através da utilização de amostras de plasma ou soro:

Substância	Concentração
Bilirrubina	40 mg/dl
Hemoglobina	200 mg/dl
Triglicéridos	3000 mg/dl
Glucose	1000 mg/dl
Colesterol	500 mg/dl
Albumina	6000 mg/dl
Gamaglobulina	6000 mg/dl
EDTA	10 mM
Heparina	3 U/ml

Precisão

As precisões intra e entre ensaios foram determinadas através da análise de 20 réplicas de 1 amostra de plasma e 1 amostra de soro em 10 ensaios diferentes.

Amostra	C4a (ng/ml)	Intra ensaios ¹ CV. (%)	Entre ensaios ² CV. (%)
Plasma EDTA	833,9	3,7 %	4,4 %
Soro	1941,5	4,3 %	4,0 %

¹ n = 20 réplicas ² n = 10 ensaios

Linearidade

A linearidade foi realizada diluindo as amostras com o diluente de amostras e comparando os valores observados com os valores esperados. Os resultados típicos são apresentados a seguir.

Amostra	Factor de diluição	C4a Observado (ng/ml) ³	C4a Esperado (ng/ml) ³	Recuperação (%)
Plasma EDTA	60	35,27	35,27	100 %
	80	27,247	26,45	103 %
	100	21,678	21,16	102 %
	120	18,156	17,64	103 %
Soro	80	23,657	23,657	100 %
	95	20,331	19,92	102 %
	110	17,743	17,21	103 %
	125	15,885	15,14	105 %

³Factor de diluição não incluído.

Recuperação por Fortificação

A recuperação por fortificação foi realizada, adicionando uma quantidade conhecida de C4a purificado às amostras e comparando os valores observados com os valores esperados.

Amostra	C4a (ng/ml)	Fortificação (ng/ml)	Resultado (ng/ml)	Recuperação (%)
Plasma 1	899,598		1211,02	92%
Plasma 2	996,199	416,91	1288,55	91%
Plasma 3	902,898		1257,25	95%
Soro 1	1000,298		1526,67	84%
Soro 2	1522,56	807,258	2090,01	90%
Soro 3	675,658		1570,40	106%

ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Para serviços fora dos EUA, contactar o distribuidor local. Estão disponíveis informações adicionais sobre a Quidel, os nossos produtos e distribuidores no nosso website em quidel.com.

REFERÊNCIAS

1. Moon K.E., Gorski J.P., Hugli T.E. 1981. "Complete primary structure of human C4a anaphylatoxin." *J BIOL CHEM* 256(16):8685-8692.
2. Gorski J.P., Hugli T.E., Muller-Eberhard H.J. 1979. "C4a: The third anaphylatoxin of the human complement system." *PROC NATL ACAD SCI (USA)* 76(10):5299-5302.
3. Gorski J.P., Hugli T.E., Muller-Eberhard H.J. 1981. "Characterization of human C4a anaphylatoxin." *J BIOL CHEM.* 256(6):2707-2711.
4. Hugli, T.E. 1986. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *COMPLEMENT* 3:111-27.
5. Fukuoka Y, Xia H-Z, Sanchez-Nunoz L.B., Dellinger A.L., Escribano L., Schwartz L.B. 2008. "Generation of anaphylatoxins by human β -Tryptase from C3, C4, and C5." *J IMMUNOL.* 180:6307-6316.
6. Mateja M.M., Korosec P., Kern I., Flezar M., Suskovic S., Sorli J. 2004. "Complement factors C3a, C4a, and C5a in chronic obstructive pulmonary disease and asthma." *AM J RESPIR CELL MOL BIOL.* 31:216-219.
7. Lee S-H, Rhim T., Choi Y-S, Kim S-H, Cho S-Y, Paik Y-K, Park C-S. 2006. "Complement C3a and C4a increased in plasma of patients with aspirin-induced asthma." *AM J RESPIR CRIT CARE MED.* 173:370-378.
8. Hass P-J, van Strijp J., 2007. "Anaphylatoxins: Their role in bacterial infection and inflammation." *IMMUNOL RES.* 37(3):161-175.
9. Abou-Ragheb H.H.A., Williams A.J., Brown C.B., Milford-Ward A. 1992. "Plasma levels of the anaphylatoxins C3a and C4a in patients with IgA nephropathy/Henoch-Shonlein nephritis." *NEPHRON* 62:22-26.
10. Tsuruta T., Yamamoto T., Matsubara S., Nagasawa S., Tanase S., Tanaka J., Takagi K., Kambara T. 1993. "Novel function of C4a anaphylatoxin: Release from monocytes of protein which inhibits monocyte chemotaxis." *AM J PATHOL* 142(6):1848-1857.
11. Wild G., Watkins J., Milford-Ward A., Hughes P., Hume A., Rowell N.R. 1990. "C4a anaphylatoxin levels as an indicator of disease activity in systemic lupus erythematosus." *CLIN EXP IMMUNOL* 80:167-170.
12. Ingram G., Hakobyan S., Robertson N.P., Morgan B.P. 2010. "Elevated plasma C4a levels in multiple sclerosis correlate with disease activity." *J NEUROIMMUNOL.* 223:124-127.
13. Olu K., Atsumi T., Bohgaki M., Amengual O., Kataoka H., Horita T., Yasuda S., Koike T. 2009. "Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome." *ANN RHEUM DIS.* 68:1030-1035.
14. Nyakoe N.K., Taylor R.P., Makumi J.N., Waitumbi J.N. 2009. "Complement consumption in children with Plasmodium falciparum malaria." *MALARIA J.* 8:7-15.
15. Marcheix B., Carrier M., Martel C., Cossette M., Pellerin M., Bouchard D., Perrault L.P. 2008. "Effect of pericardial blood processing on postoperative inflammation and the complement pathways." *ANN THORAC SURG.* 85:530-535.
16. Shoemaker R.C., Giclas P.C., Crowder C., House D., Glovsky M.M. 2008. "Complement split products C3a and C4a are early markers of acute lyme disease in tick bite patients in the United States." *INT ARCH ALLERGY IMMUNOL* 146:255-261.
17. Stricker R.B., Savely V.R., Motanya N.C., Giclas P.C. 2008. "Complement split products C3a and C4a in chronic lyme disease." *SCAND J IMMUNOL.* 69:64-69.
18. 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>.
19. 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.* 73:484-88.
20. Centers for Disease Control. 1987. "Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings." *MMWR.* 36 (suppl. No. 2S):001.

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

REF A036 – MicroVue C4a Fragment 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

PIA036004PT00 (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
