

Um imunoenensaio enzimático para medir a quantidade de proteína inibidora de C1 funcional em plasma ou soro humanos

Para utilização em diagnósticos *in vitro*.

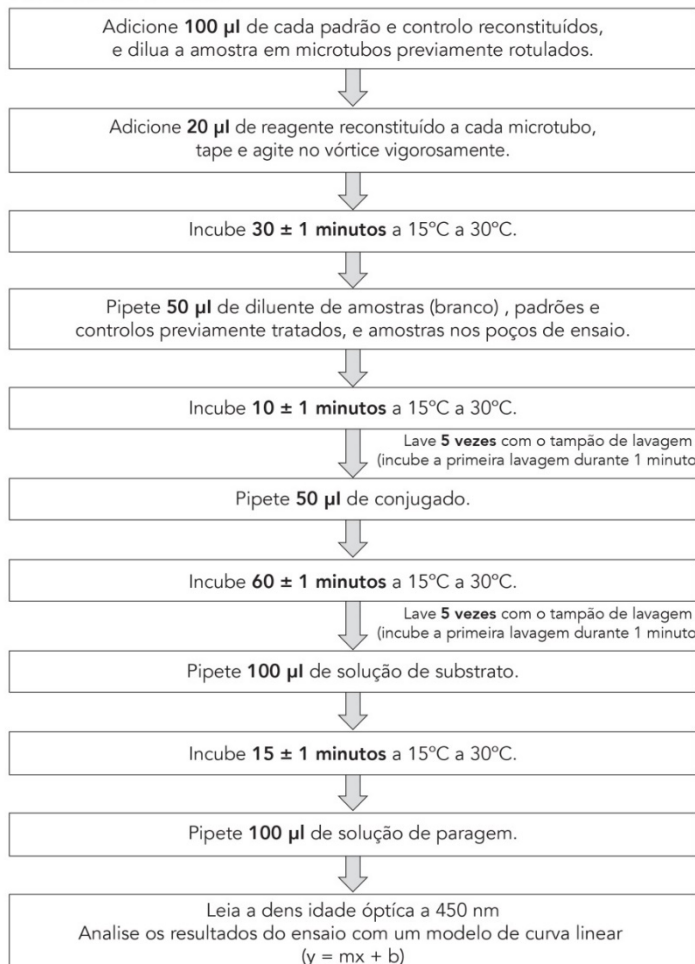
Pode encontrar um glossário dos símbolos em Quidel/glossary.

SUMÁRIO

Preparação do Reagente, dos Padrões, dos Controlos e das Amostras

- Dilua o Concentrado de Tampão de Lavagem 1:20 com água desionizada.
- Dilua o Concentrado de Diluente de Amostras 1:5 com água desionizada.
- Reconstitua cada Padrão Controlo com 1,0 ml de Reagente de Hidratação (*deixe assentar durante 15 minutos, depois misture completamente*).
- Reconstitua o Reagente de Inibidor de C1 com 0,5 ml de Reagente de Hidratação (*agite suavemente e deixe assentar durante 15 minutos*) (1 frasco processará cerca de 25 amostras de teste).
- Dilua o Diluente de Amostras 1:101 com o Diluente de Amostras 1X (*por exemplo, 10 µl + 1 ml*).

Procedimento do Ensaio





FINALIDADE

O Imunoensaio Enzimático do Inibidor de C1 da MicroVue mede a quantidade de proteína inibidora de C1 funcional em plasma ou soro humanos.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O inibidor de C1 (C1-INH) é um inibidor de protease multiespecífico presente no plasma e soro humanos normais, que regula as enzimas dos sistemas de complemento, coagulação, fibrinolítico e formação de quinina.¹ As enzimas (proteases) reguladas por esta proteína incluem as subunidades C1r e C1s do primeiro componente activado do complemento, factor de Hageman activado (factor XIIa), fragmentos do factor de Hageman, antecedente da tromboplastina do plasma activado (PTA ou factor XIa), calicreína (factor de Fletcher) e plasmina.²

Uma deficiência de C1-INH funcionalmente activo pode causar angioedema potencialmente fatal. Duas formas principais de deficiência de C1-INH foram referidas: a forma congénita, denominada angioedema hereditário (AH)^{3,4} e a forma adquirida, que é associada a uma diversidade de patologias, incluindo malignidades linfóides.⁵ O angioedema hereditário é caracterizado como transitório, mas verificam-se ataques recorrentes de inchaço sem prurido de vários tecidos em todo o corpo. A sintomatologia depende dos órgãos envolvidos. Os ataques intestinais dão origem a uma diversidade de sintomas incluindo dor, câibras, vômitos e diarreia. A causa mais frequente de morte nesta patologia é a obstrução das vias respiratórias após o edema laríngeo que pode ocorrer durante um ataque. Existem também dois tipos de angioedemas hereditários que podem ser bioquimicamente identificados. Os pacientes com um tipo mais comum (85% dos pacientes com AH) possuem níveis baixos de C1-INH funcional e antigénio de C1-INH. Os pacientes com a segunda forma (15% dos pacientes com AH) possuem níveis baixos de C1-INH funcional, mas níveis normais ou aumentados de antigénio de C1-INH, que estão associados a uma proteína disfuncional.⁶

A natureza variável dos sintomas em nove períodos de tempo diferentes durante o desenvolvimento da doença exclui um diagnóstico definitivo, baseado unicamente na observação clínica. O angioedema hereditário ou adquirido só pode ser definitivamente diagnosticado através de testes laboratoriais que demonstrem uma redução acentuada nos níveis de C1-INH funcional no plasma ou soro do paciente.

Têm sido referidos vários métodos para medir os níveis de C1-INH funcional ou antigénico. Estes métodos incluem ensaios à inibição de enzimas,^{7,8} imunodifusão radial,⁹ imunolectroforese e inibição de hemólise imune.¹⁰ Cada um destes métodos tem desvantagens. Os ensaios à inibição de enzimas⁷ são difíceis de preparar e realizar rotineiramente, os métodos imunoquímicos que medem o antigénio total não conseguem distinguir entre a proteína C1-INH funcional e não funcional, e o método de imunodifusão anti-C1r,⁹ que foi desenvolvido para medir a actividade de C1-INH funcional, não é quantitativo. O ensaio da MicroVue é capaz de medir em termos quantitativos o nível de proteína C1-INH funcionalmente activa presente no plasma ou soro de um paciente, utilizando um procedimento de IEE prático, padronizado e reproduzível.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O imunoensaio enzimático de inibidor de C1 da MicroVue para a quantificação da proteína inibidora de C1 funcional (um inibidor da protease) em plasma ou soro humanos consiste num procedimento de quatro etapas. Na primeira etapa, são incubados padrões, controlos e amostras de teste com reagente de inibidor de C1 (C1s biotinilados activados). Durante esta incubação, o C1-INH funcionalmente activo presente nos padrões, controlos e amostras de teste ligar-se-á ao reagente de inibidor de C1 para formar complexos.

Na segunda etapa, é adicionada uma alíquota das misturas de incubação, contendo reagente de inibidor de C1, aos poços de microtitulação pré-revestidos com avidina. Reagente de inibidor de C1: os complexos de

C1-INH presentes nos padrões, controlos ou amostras ligar-se-ão aos poços do microensaio revestidos com avidina. Após a incubação, um ciclo de lavagem remove o material não ligado.

Na terceira etapa, é adicionado anti-C1-INH humano de caprino conjugado com peroxidase de rábano (PR) a cada poço do teste. Durante esta etapa, o anti-C1-INH conjugado com PR liga-se ao reagente de inibidor de C1: complexos de C1-INH que foram capturados na superfície dos poços do microensaio revestidos com avidina. Após a incubação, um ciclo de lavagem remove o excesso de conjugado.

Na quarta etapa, é adicionado um substrato cromogénico de enzimas a cada poço do microensaio. O conjugado de PR ligado reage com o substrato, formando uma cor azul. Após a incubação, a reacção enzimática é interrompida quimicamente, 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 proteína C1-INH funcional presente nas amostras de teste, padrões e controlos.

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

O Imunoensaio Enzimático de Inibidor de C1 contém o seguinte:

A	Padrões de C1-INH	Ref. A4469-A4473	2 cada x 1 ml
	(liofilizados) Quando reconstituídos, cada um contém uma quantidade conhecida de inibidor de C1 em plasma humano, STF e estabilizadores.		
L	Controlo Anormal de C1-INH (Humano)	Ref. A9524	2 x 1 ml
	(liofilizados) Quando reconstituídos, cada um contém plasma humano com um nível baixo de inibidor de C1 em STF e estabilizadores.		
H	Controlo Normal de C1-INH (Humano)	Ref. A9523	2 x 1 ml
	(liofilizados) Quando reconstituídos, cada um contém plasma humano com um nível normal de inibidor de C1 em STF e estabilizadores.		
1	Placa de Microensaio	Ref. 4634	1ea
	Tiras de oito poços revestidas com avidina numa bolsa de papel de alumínio com fecho reutilizável.		
2	Solução de Paragem	Ref. A9947	12 ml
	Contém ácido hidroclorídrico 1N(4%).		
3	Concentrado de Solução de Lavagem 20X	Ref. A9957	2 x 50 ml
	Quando diluídos, cada um contém solução salina tamponada de fosfato (STF), 0,05% de Tween-20® e 0,035% de Proclin® 300.		
4	Concentrado de Diluente de Amostras 5X	Ref. A9519	25 ml
	Quando diluído, contém STF, estabilizadores e 0,035% de Proclin 300.		
5	Substrato TMB	Ref. 5059	12 ml
	Pronto a usar. Contém tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogénio.		
6	Reagente de Inibidor de C1	Ref. A9527	5 x 0,5 ml
	Quando reconstituídos, cada um contém C1 ₅ biotinilados (conjugados com biotina) activados em STF com estabilizadores.		
7	Conjugado de Inibidor de C1	Ref. A9525	7 ml
	Contém anti-inibidor de C1 humano (caprino) conjugado com peroxidase em STF e estabilizadores.		
8	Reagente de Hidratação	Ref. A3675	25 ml
	Contém 0,035% de ProClin 300.		

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

ProClin® é uma marca registada da Rohm and Haas Company.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Temporizador (60 minutos)
- Calculadora ou outro método de cálculo para validar o ensaio
- Placas de microensaio e/ou tubos de ensaio e suportes limpas, não utilizados
- Recipiente para diluição do tampão de lavagem
- Frasco de lavagem ou outro sistema de lavagem para o imunoensaio
- Pipeta multicanal (8 ou 12 canais) ajustável ou micropipetas de repetição (opcional)
- Pipetas limpas de 1 ml, 5 ml e 10 ml
- Micropipetas e pontas de pipetas
- Leitor de placas com capacidade de efectuar leituras da densidade óptica A_{450} entre 0,0 e 3,0
- Água desionizada ou destilada

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Para utilização em diagnósticos *in vitro*.
- Siga as Precauções Universais ao manusear o conteúdo deste kit e quaisquer amostras dos pacientes.
- Elimine os recipientes e o conteúdo não utilizado de acordo com os regulamentos locais e nacionais.
- Utilize os reagentes fornecidos como uma unidade única, antes da data de validade inscrita na etiqueta da embalagem.
- Use vestuário de protecção, luvas e equipamento de protecção ocular/facial adequados ao manusear o conteúdo deste kit.
- Conserve os reagentes do ensaio conforme indicado.
- Ao adicionar ou aspirar líquidos dos poços do microensaio, não raspe nem toque no fundo dos poços.
- A utilização de tempos e temperaturas de incubação diferentes dos especificados na secção Procedimento pode originar resultados erróneos.
- Não permita que os poços do microensaio sequem depois de se iniciar o ensaio.
- Não utilize um poço de microensaio mais do que uma vez.
- Para assegurar a distribuição atempada dos reagentes, recomenda-se a utilização de pipetas multicanal ou de repetição.
- Para uma medição precisa das amostras, adicione as amostras e os padrões com precisão. Pipete 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.
- Evite a contaminação microbiana ou cruzada de amostras, reagentes ou materiais. Poderão obter-se resultados incorrectos em caso de contaminação.
- A solução de paragem é considerada corrosiva e pode provocar irritação. Não ingira. Evite o contacto com os olhos, a pele e o vestuário. Em caso de contacto, lave imediatamente a área afectada com água. Em caso de ingestão, consulte um médico.
- 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. Siga as boas práticas laboratoriais para reduzir a exposição. Procure assistência médica caso se verifiquem estes sintomas.
- O substrato TMB deve ser protegido da luz durante o armazenamento e a incubação. Evite o contacto com os olhos, a pele e o vestuário. Em caso de contacto, lave imediatamente a área afectada com água.
- Para evitar a formação de aerossóis durante a lavagem, utilize um aparelho para aspirar o fluido da lavagem para dentro de um frasco com lixívia doméstica.
- As amostras hiperlipémicas, inactivadas pelo calor ou contaminadas podem produzir resultados erróneos.
- 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

Conserve o kit não aberto a uma temperatura entre 2°C e 8°C. Depois de aberto, o concentrado de solução de lavagem 20X e o reagente de hidratação podem ser conservados entre 2°C e 30°C.

Depois de seleccionar os reagentes ou os materiais a utilizar no ensaio, volte a colocar imediatamente os reagentes não utilizados às temperaturas de armazenamento adequadas. Antes da utilização, deixe os reagentes e os materiais à temperatura ambiente (15°C a 30°C).

INDICAÇÕES DE INSTABILIDADE OU DE DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES

A turvação ou descoloração da solução de lavagem diluída indicam a sua deterioração. Se isto acontecer, elimine a solução.

COLHEITA E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS

Manuseie e elimine todas as amostras, seguindo as Precauções Universais.

O ensaio requer, pelo menos, 10 µl de soro ou plasma EDTA. Todas as amostras devem ser colhidas assepticamente e preparadas utilizando técnicas padrão para realização de testes em laboratórios clínicos. Recomenda-se a utilização de uma amostra não hemolisada acabada de colher. É possível conservar uma amostra de plasma EDTA à temperatura ambiente (15°C a 30°C) durante até 24 horas. Uma amostra de soro não deve ser conservada à temperatura ambiente durante mais de seis horas. Caso seja previsível um armazenamento por um período mais longo, a amostra de plasma ou soro deve ser conservada congelada (-20°C ou inferior). Evite a congelação e descongelação repetidas da amostra. Antes dos testes, qualquer material particulado deve ser eliminado da amostra, através de centrifugação a baixa velocidade.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Antes da utilização, deixe os reagentes à temperatura ambiente (15°C a 30°C). Após a utilização, volte a colocar o kit no frigorífico (2°C a 8°C). Depois de retirar os reagentes e materiais necessários, voltar a armazenar os materiais não usados às temperaturas de conservação adequadas (consulte *ARMAZENAMENTO*). Consulte no quadro as quantidades de reagentes e materiais necessários.

1. Solução de Lavagem

Misture o 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, aqueça o frasco em banho-maria entre 37°C e 50°C até à dissolução completa de todos os cristais. Misture bem. Prepare a solução de lavagem para lavar os poços do microensaio, diluindo todo o conteúdo de um dos frascos do concentrado de solução de lavagem 20X num litro de água destilada ou desionizada. Misture bem. A solução de lavagem mantém-se estável durante 30 dias, quando armazenada num recipiente limpo entre 2°C e 8°C. Caso ocorra descoloração ou turvação, elimine o reagente.

2. Selecção das Tiras do Microensaio

Determine o número de amostras a testar e adicione quinze (15) poços para os cinco padrões, os controlos normal e anormal a testar (em duplicado) e um poço em branco. Recomenda-se que os controlos e padrões duplicados sejam testados em tiras de microensaio separadas, sempre que possível. Com base no número de poços necessário, retire o número de tiras pretendido. Guarde as tiras seleccionadas a utilizar na estrutura da placa. Coloque todas as tiras não necessárias na bolsa de conservação, sele-a e conserve entre 2°C e 8°C.

3. Reconstituição dos Padrões, Controlos e Reagente do Inibidor de C1

Adicione 1 ml de reagente de hidratação a cada frasco de padrão (A-E) e a cada controlo. Adicione 0,5 ml de reagente de hidratação a cada frasco necessário de reagente de inibidor de C1. (Um frasco processará aproximadamente 25 amostras de teste.) Deixe que os frascos reconstituídos rehidratem durante, pelo menos, 15 minutos entre 15°C e 30°C e, depois, misture bem. Evite a formação de espuma ou bolhas durante a mistura. Os padrões e controlos reconstituídos mantêm-se estáveis durante 30 dias quando conservados entre 2°C e 8°C. **NOTA: não é necessária uma maior diluição dos padrões e controlos reconstituídos antes da realização do ensaio.** Devido ao facto de serem fornecidos quatro (4) frascos de reagente de inibidor C1, o utilizador pode realizar até quatro (4) execuções de ensaio diferentes com os materiais fornecidos no kit. **O reagente de inibidor de C1 reconstituído mantém-se durante até vinte e quatro (24) horas a 2°C a 8°C e até (2) horas a 15°C a 30°C.**

4. Preparação do Diluente de Amostras 1X

Para determinar a quantidade necessária de diluente de amostras 1X, consulte o Quadro 1. Prepare a quantidade necessária de diluente de amostras 1X, misturando os volumes indicados de água destilada ou desionizada e concentrado de diluente de amostras 5X.

Quadro 1
Diluente de Amostras 1X (Requisitos e Preparação)

# Tiras	Diluente de amostras 1X necessário (ml)	Volume de reagentes necessário	
		Água (ml)	Diluente de amostras 5X (ml)
2	6	4,8	1,2
3	15	12,0	3,0
4	22	17,6	4,4
5	30	24,0	6,0
6	38	30,4	7,6
7	46	36,8	9,2
8	54	43,2	10,8
9	62	49,6	12,4
10	70	56,0	14,0
11	78	62,4	15,6
12	86	68,8	17,2

5. Diluição de Amostras

Determine o número (N) de amostras a testar. Rotule os tubos de ensaio desde o #1 ao #N e registre qual a amostra que irá corresponder a cada tubo. Prepare 1 ml de uma diluição numa proporção de 1:101 (10 µl de amostra em 1 ml de diluente de amostras 1X) de cada amostra utilizando diluente de amostras 1X. Misture bem, mas evite a formação de espuma e bolhas. Não armazene nem reutilize amostras diluídas.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

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

Antes de prosseguir consulte PREPARAÇÃO DOS REAGENTES.

1. Registe as posições dos poços do microensaio correspondentes a todas as amostras de teste, padrões e controlos, bem como os números de lote indicados nos rótulos dos frascos, numa ficha de dados. Coloque uma etiqueta num canto da placa de microensaio para orientação.
2. Tratamento de padrões, controlos e amostras de teste com reagente de inibidor de C1:

- a. Adicione 100 µL de cada padrão (A, B, C, D, E) de inibidor de C1 reconstituído a microtubos previamente rotulados.
- b. Adicione 100 µL de controlo anormal de inibidor de C1 e 100 µL de controlo normal de inibidor de C1 a microtubos previamente rotulados.
- c. Adicione 100 µL da diluição 1:101 de cada amostra do paciente (consulte *Diluição de Amostras*, item 5 em *PREPARAÇÃO DOS REAGENTES*) a um microtubo previamente rotulado.
- d. Adicione 20 µL de reagente de inibidor de C1 acabado de reconstituir aos microtubos contendo padrões, controlos e amostras de teste diluídas. Agite vigorosamente cada microtubo.
- e. Incube os microtubos a 15°C a 30°C durante 30±1 minutos.
3. Dependendo dos requisitos do leitor de placas IEE, seleccione um ou mais poços para servir de poços em branco e adicione 50 µL de diluente de amostras 1X a estes poços do microensaio.
4. Adicione 50 µL de cada controlo e padrão tratado com reagente de inibidor de C1 (etapa 2) aos poços do microensaio duplicados atribuídos. Adicione 50 µL de cada amostra tratada com reagente de inibidor de C1 (etapa 2) ao respectivo poço do microensaio atribuído.
5. Incube a 15°C a 30°C durante 10 ± 1 minutos.
6. Lave os poços do microensaio do modo a seguir indicado:

NOTA: a lavagem dos poços do microensaio é um passo importante. Siga atentamente as instruções do procedimento de lavagem.

 - a. Após a incubação no passo 5 (ou no passo 8 acima) remova o conteúdo de cada poço.
 - b. Encha todos os poços com solução de lavagem (aproximadamente 300 µL), utilizando um frasco de lavagem ou outro dispositivo de enchimento.
 - c. Incube os poços durante 1 minuto a 15°C a 30°C.
 - d. Remova o conteúdo de cada poço.
 - e. Encha todos os poços com solução de lavagem (aproximadamente 300 µL).
 - f. Remova o conteúdo de cada poço.
 - g. Repita os passos e-f mais três vezes.**
 - h. Após o quinto ciclo de lavagem, inverta a placa e bata firmemente, duas vezes, sobre papel absorvente para remover o líquido remanescente. **Não deixe os poços secarem.**
7. Utilizando uma pipeta multicanal ou de repetição, coloque 50 µl de conjugado de inibidor de C1 em cada poço de teste lavado, assim como no(s) poço(s) em branco.
8. Incube as tiras do microensaio a 15°C a 30°C durante 60 ± 1 minutos.
9. Lave os poços do microensaio após o período de incubação de 60 minutos (passo 8), tal como é descrito em *PROCEDIMENTO DE ENSAIO*.
10. Imediatamente após o procedimento de lavagem, coloque 100 µl da solução de substrato TMB em cada poço, incluindo o(s) poço(s) em branco.
11. Incube as tiras do microensaio a 15°C a 30°C durante 15 minutos.
12. Adicione 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 a mesma velocidade utilizadas para a solução de substrato. Bata levemente com a placa na parte superior da bancada para dispersar uniformemente o desenvolvimento da cor do substrato.
13. Determine a absorvância a 450 nm (valor A_{450}) de cada poço de teste, até uma hora após a adição da solução de paragem (passo 12), fazendo as necessárias correcções aos poços em branco, em conformidade com o sistema espectrofotométrico utilizado.
14. Elimine as restantes amostras diluídas, controlos, substrato, conjugado, reagente de inibidor de C1, bem como as tiras do microensaio utilizadas (consulte *ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES*). Guarde o suporte e retentor de tiras para futura utilização.

CONTROLO DE QUALIDADE

As boas práticas laboratoriais recomendam a utilização de controlos para assegurar o desempenho adequado do ensaio. Cada kit de inibidor de C1 Plus contém controlos normal e anormal que podem ser utilizados para este fim. Estes controlos devem ser testados, pelo menos, uma vez, para cada lote de amostras, ou seja, para cada execução separada. Os controlos, quando utilizados segundo as instruções, devem apresentar uma percentagem de valores médios normais dentro dos limites especificados nos

respectivos rótulos dos frascos. Uma vez que estes controlos se destinam a ser tratados com reagente e testados exactamente como uma amostra típica, funcionam como controlos para cada ensaio de inibidor de C1 Plus. Os controlos externos, preparados pelo seu laboratório, podem também ser utilizados para assegurar o desempenho adequado do ensaio.

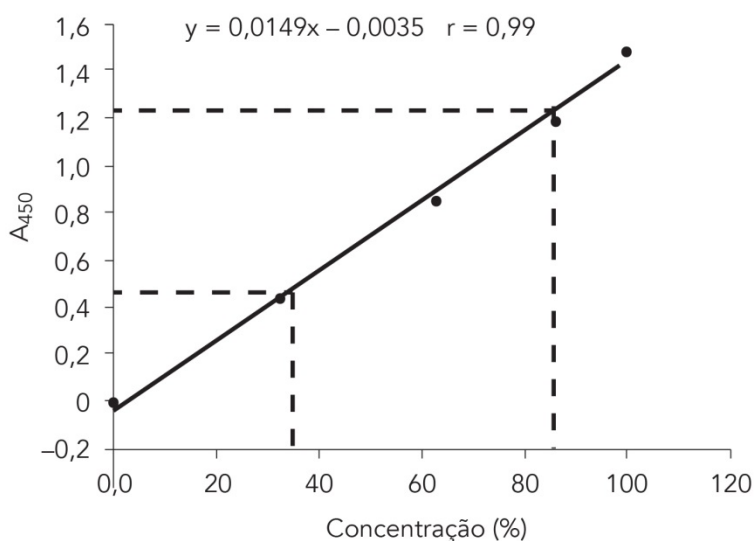
Além disso, o folheto do produto requer que a curva padrão gerada com os padrões A–E do kit cumpra os rigorosos requisitos de validação (consulte *INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS*). Os padrões devem ser testados em duplicado para cada execução do ensaio. Se o ensaio não cumprir estes requisitos, repita o ensaio ou contacte a Assistência Técnica da Quidel.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Cálculo dos Resultados

A curva padrão 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 (ao longo do eixo x). A curva padrão deve cumprir os requisitos de validação. A maior parte dos computadores e calculadoras são capazes de realizar este cálculo. É apresentado um exemplo de uma curva padrão típica na Figura 1.

Figura 1
Exemplo de curva padrão



A percentagem de concentração para cada amostra é calculada a partir da curva padrão, utilizando a análise de regressão linear.

Validação

Determine a inclinação, a intercepção e o coeficiente de correlação da linha de melhor ajustamento obtida. Os valores devem encontrar-se dentro dos limites indicados a seguir para qualificar o ensaio:

coeficiente de correlação (r):	superior a 0,95
inclinação (m):	0,0107 a 0,0262
intercepção y (b):	(-)0,1685 a 0,0910

Interpretação

A concentração de C1-INH funcional numa determinada amostra é referida como a percentagem do nível médio em amostras normais. Com base numa amostra de 100 sujeitos normais, analisadas por três técnicos, determinou-se um nível médio normal de C1-INH funcional com este ensaio (consulte *CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO, Exactidão*). A percentagem de valores médios normais para qualquer

amostra de teste diluída numa proporção de 1:101 é determinada tal como especificado na secção *Cálculo dos Resultados*.

Resultados Anormais: as concentrações de C1-INH inferiores ou iguais a 40% da média são consideradas significativamente inferiores às normais, pelo que deverão ser consideradas anormais. As amostras que após serem submetidas a teste de repetição (veja abaixo) apresentarem resultados ambíguos devem também ser consideradas anormais.

Resultados Ambíguos: as concentrações de C1-INH dentro dos limites de 41%–67% da média, embora inferiores ao esperado para normal, não são significativamente inferiores ao normal e são consideradas resultados ambíguos. Estas amostras poderão ser novamente testadas ou uma nova amostra colhida e testada. Se uma amostra ambígua voltar a apresentar resultados ambíguos, a amostra é então considerada significativamente inferior à normal e pode ser classificada de anormal.

Resultados Normais: as concentrações superiores ou iguais a 68% da média normal são consideradas normais.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O Imunoensaio Enzimático de Inibidor de C1 Plus da MicroVue tem sido utilizado para analisar amostras colhidas, como soro ou plasma em EDTA. Não foram testados outros anticoagulantes para além do EDTA.

VALORES DAS AMOSTRAS

Foram testadas cem (100) amostras de soro normal de quarenta e nove (49) crianças e cinquenta e um (51) adultos no Imunoensaio Enzimático de Inibidor de C1 da MicroVue. Não se verificou qualquer diferença significativa entre as amostras das crianças e as amostras dos adultos. A concentração média da proteína C1-INH nestas amostras foi estabelecida como sendo 100% dos valores médios normais (desvio padrão = 15,8%).

Foram colhidas amostras de plasma EDTA e soro emparelhadas em quinze (15) sujeitos adultos normais e testadas no ensaio. Não se verificou qualquer diferença significativa entre estes tipos de amostras.

No ensaio foram testadas amostras de vinte e oito (28) pacientes com diferentes deficiências de inibidor de C1 documentadas. Estas amostras foram colhidas em vários locais localizados em áreas geográficas diferentes dos Estados Unidos. Todos os vinte e oito pacientes testados tinham níveis de C1-INH funcional significativamente mais baixos do que o nível médio normal. Estes dados são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2
Pacientes com Angioedema

Pacient e n.º	Local	Percentagem de valores médios normais (%)	Interpretação
1P*	A	19	anormal
1S*	A	37	anormal
2**	A	0	anormal
2**	A	6	anormal
3	A	0	anormal
4	A	17	anormal
5	A	6	anormal
6	A	0	anormal
7	A	0	anormal
8†	A	56	anormal
9†	A	61	anormal
10	B	8	anormal
11	C	0	anormal
12	D	28	anormal
13	D	14	anormal
14	D	32	anormal
15	D	21	anormal
16†	D	45	anormal
17	D	3	anormal
18	D	24	anormal
19	E	0	anormal
20	E	0	anormal
21	E	2	anormal
22	E	13	anormal
23	E	17	anormal
24	E	19	anormal
25	E	4	anormal
26	E	3	anormal
27†	E	44	anormal
28	E	0	anormal

* 1S é soro e 1P é plasma EDTA colhidos de um paciente na mesma altura.

**As duas amostras do paciente 2 foram obtidas com uma diferença de três anos.

† Ao repetir o teste, os pacientes apresentaram resultados ambíguos, pelo que foram considerados anormais.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Exactidão

Utilizando um modelo de regressão linear, as concentrações de inibidor de C1 medidas no ensaio IEE para quinze soros normais foram atribuídas com base nas respectivas concentrações, tal como determinadas por uma técnica de imunodifusão radial. A concentração de C1-INH no padrão primário foi determinada utilizando os padrões do kit de valores atribuídos com base no modelo de regressão linear. Para testar a exactidão do modelo, foram também realizadas seis determinações de concentração de C1-INH utilizando a técnica de imunodifusão radial para o padrão primário. Estes dois métodos que medem as concentrações de C1-INH não se revelaram significativamente diferentes. O valor médio obtido para as 100 amostras de soro normal no Imunoensaio Enzimático de Inibidor de C1 da MicroVue foi de 182 µg/ml. Este valor concorda favoravelmente com a concentração normal publicada de 180 µg/ml.

Precisão

Três lotes de kits foram avaliados. Cada lote foi testado três vezes por um técnico diferente. As amostras foram testadas em réplicas de três em cada uma das nove execuções do ensaio. O Quadro 3 apresenta a variação intra-ensaios e interensaios resultante.

Quadro 3
Reprodutibilidade do Ensaio

Tipo	Inibidor de C-1 (%)	Intra-ensaio CV ¹ (%)	Interensaio CV ² (%)
Amostra 1	105,2	3,3	5,7
Amostra 2	78,54	4,0	5,7
Amostra 3	21,48	5,4	6,4
Amostra 4	16,42	5,1	10,0

¹n=20 réplicas ²n=10 ensaios

Especificidade

O anti-C1-INH humano de caprino, utilizado para fazer o conjugado, foi comparado com um outro anticorpo C1-INH disponível no mercado e aprovado pela FDA. Apresentou uma única linha de identidade num teste de imunodifusão. Além disso, o anti-soro da Quidel foi considerado monoespecífico quanto a C1-INH, quando testado em várias concentrações em contraste com soro humano normal, acabado de colher, contendo 100 mM de EDTA por dupla imunodifusão, imunoelectroforese unidimensional e bidimensional e imunoelectroforese em foguete.

ASSISTÊNCIA

Para fazer uma encomenda ou assistência técnica, contacte um Representante da Quidel através do 800.874.1517 (nos EUA) ou 858.552.1100 (for a dos EUA), segunda a sexta-feira, entre as 8h e as 5h, Hora do Leste. As encomendas também podem ser efectuadas por fax através do 740.592.9820.

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

BIBLIOGRAFIA

1. Ratnoff, O.D., J. Pensky, D. Ogston y G.B. Naff. The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma permeability factor, and C'1r subcomponent of the first component of complement by serum C'1 esterase inhibitor. *J. Exp. Med.* 129:315, 1969.
2. Travis, J. y G.S. Salvesen. Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 52:655,1983.
3. Donaldson, V.H. y R.R. Evans. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema. Absence of serum inhibitor of C'1-esterase. *Am. J. Med.* 35:37, 1963.
4. Rosen, F.S., C.A. Alper, J. Pensky, M.R. Klemperer y V.H. Donaldson. Genetically determined heterogeneity of the C1 esterase inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. *J. Clin. Invest.* 50:2143, 1971.
5. Gelfand, J.A., G.R. Boss, C.L. Conley, R. Reinhart y M.M. Frank. Acquired C1 esterase inhibitor deficiency and angioedema: a review. *Medicine.* 58:321,1979.
6. Kerr, M.A. y A.A.C. Yeung-Laiwah. C1-Inhibitor deficiency and angioedema. En: *Complement in Health and Disease*, ed. K. Whaley, MTP Press Limited, p. 53,1987.
7. Donaldson, V.H. Serum inhibitor of C'1-esterase in health and disease. *J. Lab. Clin. Med.* 68:369,1966.
8. Levy, L.R. y I.H. Lepow. Assay and properties of serum inhibitor of C1-esterase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101:608, 1959.
9. Ziccardi, R.J. y N.R. Cooper. Development of an immunochemical test to assess C1 inactivator function in human serum and its use for the diagnosis of hereditary angioedema. *Clin. Immunol. Immunopath.* 15:465,1980.

10. Gigli, I., S. Ruddy y K.F. Austen. The stoichiometric measurement of the serum inhibition of the first component of complement by the inhibition of immune hemolysis. *J. Immunol.* 100(6): 1154, 1968.
11. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (sup. no. 2S):001.

REF A037 – MicroVue C1-Inhibitor 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

PIA037003PT00 (02/20)

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

Rx ONLY

Utilização apenas mediante receita



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
