



DCM016-12
Ed. 01/2015

CIC C1q ELISA

per analisi di routine

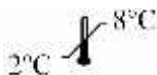
Determinazione immunoenzimatica diretta del CIC C1q nel siero o plasma umano.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



Σ = 96 test

REF DKO016

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del CIC C1q nel siero o plasma umano.

Il kit CIC C1q ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il sistema del complemento è una cascata biochimica del sistema immunitario coinvolto nell'eliminazione degli agenti patogeni da un organismo. È composto da molte piccole proteine plasmatiche che cooperano per lisare la membrana plasmatica delle cellule estranee.

L'attivazione di questo sistema conduce a citolisi, chemotassi, all'opsonizzazione, e all'infiammazione, ed anche alla marcatura degli agenti patogeni per la fagocitosi. Il sistema del complemento consiste di 35 proteine solubili e proteine che legano le cellule, 12 di cui direttamente coinvolte nella via del complemento. Queste proteine rappresentano il 5% della frazione della globulina del siero. Le proteine del complemento sono sintetizzate principalmente dagli epatociti; gli importi significativi sono prodotti dai monociti, dai macrofagi e dalle cellule epiteliali dei tratti gastrointestinale ed urogenitale.

C1q è coinvolto nella via classica del complemento. La via classica è innescata dall'attivazione del complesso C1 (che consiste di una molecola C1q e di due molecole C1r e C1s); C1q lega gli anticorpi IgM e IgG, complessati con gli antigeni, o la superficie dell'agente patogeno.

Il sistema del complemento svolge un ruolo in molte malattie con una componente immune, quali la malattia dell'Alzheimer, la sindrome di Barraquer-Simons, l'asma, il lupus, le varie forme dell'artrite, malattie autoimmuni del cuore e la sclerosi a placche.

La mancanza della via terminale predispone alle malattie autoimmuni e le infezioni (specialmente meningite).

Sono stati sviluppati molti test per la determinazione dei CIC, incluso il test di precipitazione al PEG, immunodiffusione radiale e test cellulari come il test di Ray cell.

Non esiste una procedura capace di determinare tutti i tipi di immunocomplessi; esistono in commercio metodiche capaci di determinare i frammenti del complemento (es. C1q e C3d) che hanno un importante significato diagnostico.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit CIC-C1q ELISA è basato sul principio che gli immunocomplessi affini alla frazione C1q sono bloccati dal C1q immobilizzato sulla micropiastro.

Nella prima fase della procedura i campioni vengono aggiunti alla micropiastro coattata con C1q; segue un periodo di incubazione, durante il quale gli immunocomplessi affini alla frazione C1q si legano al C1q

coattato alla micropiastro. Il lavaggio della micropiastro rimuove le proteine del campione non legate.

Nella seconda fase viene aggiunto il coniugato anti-human IgG legato a perossidasi di rafano (HRP), il quale si lega agli immunocomplessi ora fissati alla micropiastro. Il lavaggio rimuove il coniugato non legato.

Nella terza fase si aggiunge il TMB Substrato, che reagisce con il coniugato legato alla micropiastro generando una reazione colorimetrica. L'intensità di colore misurata a 450 nm è proporzionale ai livelli di CIC IgG. La concentrazione di immunocomplessi presenti nel campione è determinata mediante una curva di calibrazione.

I risultati sono espressi come heat aggregate gamma globuline umane per mL ($\mu\text{gEq/mL}$)

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONI

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (3 flaconi, 1,5 mL ciascuno)

CAL0 **REF DCE002/1606-0**

CAL1 **REF DCE002/1607-0**

CAL2 **REF DCE002/1608-0**

2. Controls (2 flaconi, 1,5 mL ciascuno, pronti all'uso)

Phosphate buffer 74 mM pH 7.4, BSA 1 g/L

Controllo Negativo **REF DCE045/1601-0**

Controllo Positivo **REF DCE045/1602-0**

3. Incubation Buffer (1 flacone, 50 mL)

Phosphate buffer 74 mM pH 7.4 **REF DCE008-0**

4. Conjugate (1 flacone, 0,5 mL)

Anti human IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/1602-0

5. Conjugate Buffer (1 flacone, 20 mL)

Phosphate buffer 74 mM pH 7.4 **REF DCE009-0**

6. Coated Microplate (1 micropiastro breakable)

C1q adsorbito sulla micropiastro **REF DCE002/1603-0**

7. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

8. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

9. 10X Conc. Wash Solution (2 flaconi, 50 mL ciascuno)

0.2M Phosphate buffer, pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit
Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare
Dispensatori automatici.
Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare tutti i reattivi a 20±8°C, al riparo dalla luce.
Aprire la busta del Reattivo 6 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strips da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori ed i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- **ATTENZIONE: il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni;** si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali,

flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso.

A tale scopo Diametra rende disponibile separatamente un reagente decontaminante per il lavaggio degli aghi.

- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori

I Calibratori sono pronti all'uso, sono espressi in µgEq/mL ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂
µgEq/mL	0	16	64

Portare a temperatura ambiente (22-28°C) prima dell'uso, agitando delicatamente. Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2÷8°C.

6.2. Preparazione del Coniugato Diluito

Diluire il Coniugato (Reagente 4) 1:100 con il Coniugato buffer (reagente 5).

La quantità varia proporzionalmente secondo il numero di test da eseguire. Miscelare bene evitando la formazione di schiuma. Stabile per 3 ore a temperatura ambiente (22÷28°C).

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni flacone di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (10X) con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare

volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli, in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli, per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione.

6.4. Preparazione del campione

La determinazione dei CIC si effettua nel siero o plasma umano. I campioni che non sono testati nelle 24 ore devono essere conservati a -20°C.

I campioni non devono essere scongelati per più di una volta.

Preparare il campione pipettando in una provetta:

Campione	10 µL
Incubation Buffer (reagente 3)	500 µL

Miscelare gentilmente. Evitare l'uso del vortex.

I Controlli sono pronti all'uso.

6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₂), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibratore	Campioni /Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₂	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
<p>Incubare 30 minuti a 37°C. Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti tre volte con 300 µL di wash solution diluita.</p> <p>Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.</p> <p>Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.</p>			
Coniugato Diluito	100 µL	100 µL	
<p>Incubare 30 minuti a 37°C. Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti tre volte con 300 µL di wash solution diluita.</p> <p>Lavaggi: seguire le stesse indicazioni del punto precedente</p>			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22±28°C) al riparo dalla luce.</p>			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.</p>			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di CIC C1q per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati sperimentali o nella degradazione dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₂) e di ogni campione.

8.2. Calcolo della curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascuno Calibratore (C₀-C₂) in funzione delle concentrazioni.

Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione.

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, sul grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in µgEq/mL.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

	µgEq/mL di IgG aggregate
Campioni negativi	<16
Campioni dubbi	tra 16 e 18
Campioni positivi	>18

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata stabilita replicando (16x) la misura di due differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è 5,3%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata stabilita replicando la misura di due differenti sieri di controllo con due kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 6,0%.

10.2. Recupero

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 12,5 – 25 – 50 – 100 µgEq/mL di IgG aggregate, ha dato valori compresi tra il 94,3% e il 105,7%.

10.3. Limite di rilevabilità

La concentrazione minima di CIC C1q misurabile è 1,0 µgEq/mL con un limite di confidenza del 99%.

10.4. Specificità e Sensibilità diagnostiche

10.4.1. Specificità e Sensibilità cliniche

Sono stati testati i campioni di siero di 92 persone sane, asintomatiche; la specificità clinica del test è del 96%.

Sono stati testati i campioni di siero di 125 pazienti con SLE, artrite reumatoide, e altre malattie, la sensibilità clinica del test è del 92%.

10.4.2. Sensibilità e Specificità vs metodo di riferimento commerciale

Sono stati raccolti e testati 209 sieri di pazienti con SLE, RA, o altre patologie, utilizzando il kit Diametra CIC C1q e il kit QUIDEL EIA. La tabella sotto riporta i risultati ottenuti:

DIAMETRA kit	-	+	-	+
QUIDEL kit	-	+	+	-
Pazienti RA	20	12	4	4
Pazienti SLE	38	25	12	6
Altri	0	85	2	1

Dai 209 campioni testati si ottengono i seguenti dati di stabilità e sensibilità diagnostiche:

	RA	SLE	Altri	RA+SLE	RA+SLE+Altri
Sensibilità	75,0%	67,6%	97,7%	69,8%	87,1%
Specificità	83,3%	86,4%	--	85,3%	84,1%
Concordanza	-	-	-	78,5%	86,1%

10.4.3. Altri dati di Comparazione

Il kit CIC C1q (Diametra) è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati i campioni di siero di 95 sani e 160 malati.

La concordanza tra i risultati dei due metodi è stata dell'87%.

La concentrazione media di CIC in donatori sani è di 2,1 µgEq/mL (S.D. = 1,6).

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Triolo G., et al J.Clin.Lab.Immunol 13, 35-39 (1984)
2. Rong-jia Xu et al J.Immunol.Met. 135, 225-231(1990)
3. Menzel J.E., et al J.Immunol. Met. 138, 16 (1991)
4. Muso E, et al Nippon Jinzo Gakkai Shi.36(4):345-54 (1994)
5. Yoshinoya S, et al J Clin Lab Immunol. 38(4):161-73 (1992)

Ed. 01/2015

DCM016-12

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM016-12
Ed. 01/2015

CIC C1q ELISA

for routine analysis

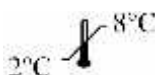
Direct immunoenzymatic determination of CIC C1q in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO016

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of CIC C1q concentration in human serum or plasma.

CIC C1q ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

The complement system is a biochemical cascade of the immune system that helps clear pathogens from an organism. It is derived from many small plasma proteins that work together to form the primary end result of cytolysis by disrupting the target cell's plasma membrane.

Activation of this system leads to cytolysis, chemotaxis, opsonization, immune clearance, and inflammation, as well as the marking of pathogens for phagocytosis. The complement system consists of more than 35 soluble and cell-bound proteins, 12 of which are directly involved in the complement pathways. The proteins account for 5% of the serum globulin fraction. The complement proteins are synthesized mainly by hepatocytes; however, significant amounts are also produced by monocytes, macrophages, and epithelial cells in the gastrointestinal and genitourinary tracts.

C1q is involved in the classical complement pathway. The classical pathway is triggered by activation of the C1-complex (which consists of one molecule C1q and two molecules C1r and C1s), either by C1q's binding to antibodies from classes M and G, complexed with antigens, or by its binding C1q to the surface of the pathogen.

The complement system might play a role in many diseases with an immune component, such as Barraquer-Simons Syndrome Alzheimer's disease, asthma, lupus erythematosus, various forms of arthritis, autoimmune heart disease and multiple sclerosis. Deficiencies of the terminal pathway predispose to both autoimmune disease and infections (particularly meningitis).

There are many tests for the determination of CIC, included the test of precipitation with PEG, radial immunodiffusion, and cellular tests like the test of Ray cell. Does not exist one procedure to determinate all types of immunocomplex; in commerce exist some test to determinate fragments of the complex (Es. C1q and C3d) that have an important diagnostic mean.

2. PRINCIPLE

CIC C1q ELISA kit is based on the binding of C1q-linked immunocomplexes to C1q adsorbed on microplate.

In the first step, the samples are added to the microplate adsorbed with C1q; during the following incubation, C1q-fixing circulating immune complexes (CIC) bind to the C1q immobilized on the microplate. The microplate is washed for remove the unbound serum proteins.

In the second step, the anti-human IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP) is added; it binds to the immunocomplex fixed on the microplate. The washing step removes the unbound conjugate.

In the third step, the TMB Substrate is added, and this reacts with the conjugate fixed on the microplate, developing a colorimetric reaction.

The quantity of CIC IgG complex is proportional to the colour intensity read at 450 nm wavelengths.

The immunocomplex concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

Heat aggregate human gamma globulin per mL ($\mu\text{gEq/mL}$) is the unit of measure of the results.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (3 vials, 1.5 mL each)
 - CAL0 REF DCE002/1606-0
 - CAL1 REF DCE002/1607-0
 - CAL2 REF DCE002/1608-0
2. Controls (2 vials, 1.5 mL each, ready to use)
 - 74 mM Phosphate buffer, pH 7.4, 1 g/L BSA
 - Negative Control REF DCE045/1601-0
 - Positive Control REF DCE045/1602-0
3. Incubation Buffer (1 vial, 50 mL)
 - 74 mM Phosphate buffer, pH 7.4 REF DCE008-0
4. Conjugate (1 vial, 0.5 mL)
 - Anti human IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP) REF DCE002/1602-0
5. Conjugate Buffer (1 vial, 20 mL)
 - 74 mM Phosphate buffer, pH 7.4 REF DCE009-0
6. Coated Microplate (1 breakable microplate)
 - Microplate coated with C1q REF DCE002/1603-0
7. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
 - H_2O_2 -TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact) REF DCE004-0
8. Stop Solution (1 vial, 15 mL)
 - Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact) REF DCE005-0
9. 10X Conc. Wash Solution (2 vials, 50 mL each)
 - 0.2M Phosphate buffer, pH 7.4 REF DCE054-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents at 20±8°C in the dark.

Open the bag of reagent 6 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, the microplate is stable until the expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, Calibrators and Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.**

For this purpose, Diametra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.

- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Calibrators preparation

The Calibrators are ready to use and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂
µgEq/mL	0	16	64

Allow the Calibrators to reach room temperature (22-28°C) before use. Mix gently. Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of Diluted Conjugate

Dilute the Conjugate (reagent 4) 1:100 with Conjugate buffer (reagent 5). The exact quantity is proportional to the number of the assays.

Mix well and avoid foaming. Stable for 3 hours at room temperature (22±28°C).

6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (10X) with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

In concentrated wash solution it is possible to observe the presence of crystals. In this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals is observed. For greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL taking care also to transfer the crystals completely, then mix until the crystals are completely dissolved.

6.4. Preparation of the Sample

The CIC assay can be performed in human serum or plasma. Samples that are not immediately processed should be stored at -20°C. Samples should not be thawed more than once.

Prepare the samples by pipetting in a test tube:

Sample	10 µL
Incubation Buffer (reagent 3)	500 µL

Mix gently. Avoid using vortex.
The Controls are ready to use.

6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₂), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of CIC C1q for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance of each Calibrator (Em) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points.

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in µEq/mL.

9. REFERENCE VALUES

	µEq/mL of aggregates IgG
Negative Sample	<16
Uncertain Sample	between 16 and 18
Positive Sample	>18

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate the measurement (16x) of two different control sera in one assay. The within assay variability is 5.3%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variations was determined by replicate the measurements of two different control sera in 2 different lots. The between assay variability is 6.0%.

10.2. Recovery

The recovery of 12.5 – 25 – 50 – 100 µEq/mL IgG aggregates added to a sample gave values between 94.3% and 105.7% with reference to the original concentrations.

10.3. Detection limit

The lowest detectable concentration of CIC C1q that can be distinguished from the zero Calibrator is 1.0 µEq/mL at the 99% confidence limit.

Reagents	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Calibrator C ₀ -C ₂	100 µL		
Controls		100 µL	
Diluted Sample		100 µL	
Incubate 30 minutes at 37°C. Remove the contents from each well and wash the wells 3 times with 300 µL diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
Diluted Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate 30 minutes at 37°C. Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL diluted wash solution. Washing: follow the same indications of the previous point.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22÷28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

10.4. Diagnostic Specificity and sensitivity

10.4.1. Clinical Specificity and sensitivity

92 serum specimens collected from normal, asymptomatic subjects were tested with CIC C1q ELISA DiaMetra. The clinical specificity of the assay was 96%.

125 serum specimen collected from patients with systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA) or other disorders was tested with CIC C1q. The overall clinical sensitivity was 92%.

10.4.2. Specificity and sensitivity vs commercial reference method

Specimen obtained from 209 patients with SLE, RA, or other disorders were tested using the Diametra CIC C1q kit and QUIDEL EIA kit. The obtained results are shown in the table below:

DIAMETRA kit	-	+	-	+
QUIDEL kit	-	+	+	-
RA Patients	20	12	4	4
SLE Patients	38	25	12	6
Others	0	85	2	1

From the 209 tested samples the following diagnostic sensitivity and specificity are obtained:

	RA	SLE	Others	RA+ SLE	RA+ SLE+ Others
Sensitivity	75,0%	67,6%	97,7%	69,8%	87,1%
Specificity	83,3%	86,4%	--	85,3%	84,1%
Agreement	-	-	-	78,5%	86,1%

10.4.3. Comparative data

Circulating Immunocomplexes (CIC) collected from 160 patient with systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), or other disorders subjects, and 95 form normal, asymptomatic subjects were measured.

The overall agreement between the two test methods was 87%.

The average CIC concentration of healthy donors was 2.1 µgEq/mL (S.D. = 1.6).

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Triolo G., et al J.Clin.Lab.Immunol 13, 35-39 (1984)
2. Rong-jia Xu et al J.Immunol.Met. 135, 225-231(1990)
3. Menzel J.E.,et al J.Immunol. Met. 138, 16 (1991)
4. Muso E, et al Nippon Jinzo Gakkai Shi.36(4):345-54 (1994)
5. Yoshinoya S,et al J Clin Lab Immunol. 38(4):161-73 (1992)

Ed. 01/2015

DCM016-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM016-12
Ed. 01/2015

CIC C1q ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de CIC C1q en suero o plasma humano.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO016

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de CIC C1q en suero o plasma humano.

El kit CIC C1q ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

El sistema del complemento es una cascada bioquímica del sistema inmunitario involucrado en la eliminación de los agentes patógenos de un organismo. Se compone de muchas proteínas plasmáticas pequeñas que trabajan juntas para lisar la membrana plasmática de las células extrañas. La activación de este sistema conduce a la citólisis, quimiotaxis, opsonización y a la inflamación, así como al marcado de los agentes patógenos de la fagocitosis. El sistema del complemento se compone de 35 proteínas solubles y proteínas que se unen a las células, 12 de las cuales están directamente involucradas en la vía del complemento. Estas proteínas representan el 5% de la fracción de la globulina del suero. Las proteínas del complemento se sintetizan principalmente por los hepatocitos; cantidades significativas son producidas por los monocitos, los macrófagos y las células epiteliales del tracto gastrointestinal y urogenital.

C1q está involucrado en la vía clásica del complemento. La vía clásica se desencadena por la activación del complejo C1 (que consiste en una molécula C1q y dos moléculas C1r y C1s); C1q une los anticuerpos IgM e IgG complejos con los antígenos o la superficie del agente patógeno. El sistema del complemento desempeña un papel en muchas enfermedades con un componente inmunológico, como el Alzheimer, el síndrome de Barraquer Simons, el asma, el lupus, las diversas formas de artritis, las enfermedades autoinmunes del corazón y la esclerosis en placas. La ausencia de la vía terminal predispone a las enfermedades autoinmunes y a las infecciones (especialmente meningitis).

Se han desarrollado muchos ensayos para la determinación de los CIC, incluido el ensayo de precipitación con PEG, la inmunodifusión radial y ensayos celulares como el ensayo de células radiales.

No existe ningún procedimiento capaz de determinar todos los tipos de inmunocomplejos; en el mercado existen métodos para determinar los fragmentos del complemento (por ejemplo, C1q y C3d) que tienen un valor diagnóstico importante.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El kit (CIC-C1q) se basa en el principio de que los inmunocomplejos afines a la fracción C1q son bloqueados por el C1q inmovilizado en la microplaca.

En la primera fase del procedimiento, se añaden los sueros y las muestras a la microplaca recubierta con C1q y, a

continuación, se dejan incubar. Durante esta fase, los inmunocomplejos afines a la fracción C1q se unen al C1q que recubre la microplaca. Con el lavado de la microplaca se retiran las proteínas del suero no unidas.

En la segunda fase, se añade el conjugado anti IgG humana-peroxidasa, que se une a los inmunocomplejos ahora fijados a la microplaca.

Con el lavado se retira el conjugado no unido. En la tercera fase, se añade el sustrato TMB, que reacciona con el conjugado unido a la microplaca. La intensidad del color medida a 450 nm es proporcional a los niveles de CIC IgG. La concentración de inmunocomplejos presentes en la muestra se determina mediante una Curva de calibración. Los resultados se expresan como microgramos de gammaglobulina humana agregada por calor equivalentes por mL ($\mu\text{gEq/mL}$)

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

- Calibradores** (3 frascos, 1,5 mL cada uno)
CAL0 **REF DCE002/1606-0**
CAL1 **REF DCE002/1607-0**
CAL2 **REF DCE002/1608-0**
- Controles** (2 frascos, 1,5 mL cada uno, listos para el uso)
Tampón fosfato 74 mM pH 7,4, BSA 1 g/L
Control negativo **REF DCE045/1601-0**
Control positivo **REF DCE045/1602-0**
- Tampón de incubación** (1 frasco, 50 mL)
Tampón fosfato 74 mM pH 7,4 **REF DCE008-0**
- Conjugado** (1 frasco, 0,5 mL)
Conjugado anti IgG humana conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) **REF DCE002/1602-0**
- Tampón de conjugado** (1 frasco, 20 mL)
Tampón fosfato 74 mM pH 7,4 **REF DCE009-0**
- Microplaca recubierta** (1 microplaca rompible)
CIC C1q absorbido en la microplaca **REF DCE002/1603-0**
- Sustrato TMB** (1 frasco, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel) **REF DCE004-0**
- Solución de parada** (1 frasco, 15 mL)
Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel) **REF DCE005-0**
- Solución de lavado conc. 10X** (2 frascos, 50 mL cada uno)
0,2M tampón fosfato, pH 7,4 **REF DCE054-0**

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Nota

Todos los reactivos y la microplaca deben conservarse a 208 °C protegidos de la luz, y usarse antes de la fecha indicada en el envase externo.

Dejar la microplaca a temperatura ambiente durante unos minutos antes de retirar las tiras necesarias para el ensayo; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradores y de los controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los controles positivo y negativo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y las proteínas de bovino se obtuvieron de países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de

caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.

- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- **ATENCIÓN: se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa adecuadamente, podría contaminarse por agentes externos;** se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad necesaria exacta de conjugado y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática**, se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la fluidica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso. Para tal fin, Diametra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores

Los Calibradores y los controles están listos para el uso. Los Calibradores se expresan en µgEq/mL y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂
µgEq/mL	0	16	64

Antes del uso, esperar hasta que se encuentren a temperatura ambiente (22-28 °C) y agitar con cuidado. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.2. Preparación del conjugado diluido

Diluir el conjugado (reactivo 4) 1/100 con el tampón de conjugado (reactivo 5).

La cantidad varía proporcionalmente según el número de ensayos que se vayan a realizar. Mezclar bien evitando la formación de espuma. Estable durante 3 horas a temperatura ambiente (22±28 °C).

6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la solución de lavado conc. 10X con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2±8 °C durante al menos 30 días. En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales con el lavado del frasco y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.4. Preparación de la muestra

La determinación de CIC se realiza en suero o plasma humano. Las muestras que no se analicen en un plazo de 24 horas deberán conservarse a -20 °C.

No volver a congelar las muestras una vez descongeladas. Pipetear en una probeta:

Suero	10 µL
Tampón de incubación (reactivo 3)	500 µL

Mezclar con cuidado. Evitar el uso del vórtex. Los controles son listo para usar.

6.5. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₂), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivos	Calibrador	Muestras/Controles	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₂	100 µL		
Controles		100 µL	
Muestra diluida		100 µL	
<p>Incubar 30 minutos a 37 °C. Retirar la mezcla de reacción y lavar los pocillos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida.</p> <p>Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.</p> <p>Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.</p>			
Conjugado diluido	100 µL	100 µL	
<p>Incubar 30 minutos a 37 °C. Retirar la mezcla de reacción y lavar los pocillos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida.</p> <p>Lavados: siga las mismas instrucciones del punto anterior.</p>			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22±28 °C), protegida de la luz.</p>			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.</p>			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros controles para los rangos bajo, medio y alto de CIC C1q para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C₀-C₂) y de cada muestra.

8.2. Cálculo de la Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (Em) de cada Calibrador (C₀-C₂) en función de las concentraciones.

Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración.

8.3. Cálculo de los resultados

Interpolar en el gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en µgEq/mL.

9. VALORES DE REFERENCIA

	µgEq/mL de agregado de IgG
Muestras negativas	<16
Muestras dudosas	entre 16 y 18
Muestras positivas	>18

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la determinación de dos sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es 5,3%.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando la determinación de dos sueros de control distintos con dos kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 6,0%.

10.2. Recuperación

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 12,5 – 25 – 50 – 100 µgEq/mL de agregado de IgG ha dado valores comprendidos entre el 94,3% y el 105,7%.

10.3. Límite de detección

La concentración mínima de CIC C1q medible es 1,0 µgEq/mL con un límite de confianza del 99%.

10.4. Especificidad y sensibilidad diagnóstica

10.4.1. Especificidad y sensibilidad clínica

Se han analizado muestras de suero de 92 personas sanas, asintomáticas. La especificidad clínica del ensayo es del 96%.

Se han analizado muestras de suero de 125 pacientes con SLE, artritis reumatoide y otras enfermedades. La sensibilidad clínica del ensayo es del 92%.

10.4.2. Sensibilidad y especificidad frente al método de referencia comercial

Se han obtenido y analizado 209 muestras de suero de pacientes con SLE, RA u otras patologías, usando el kit CIC C1q Diametra y el kit QUIDEL EIA. En la tabla siguiente se indican los resultados obtenidos:

Kit	-	+	-	+
Kit DIAMETRA	-	+	-	+
Kit QUIDEL	-	+	+	-
Pacientes RA	20	12	4	4
Pacientes SLE	38	25	12	6
Otros	0	85	2	1

De las 209 muestras analizadas se han obtenido los siguientes datos de estabilidad y sensibilidad diagnóstica:

	RA	SLE	Otros	RA+ SLE	RA+ SLE+ Otros
Sensibilidad	75,0%	67,6%	97,7%	69,8%	87,1%
Especificidad	83,3%	86,4%	--	85,3%	84,1%
Concordancia	-	-	-	78,5%	86,1%

10.4.3. Otros datos de comparación

El kit CIC C1q (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han analizado muestras de suero de 95 personas sanas y 160 personas enfermas. La concordancia entre los resultados de los dos métodos ha sido del 87%.

La concentración media de CIC en donantes sanos es de 2,1 µgEq/mL (S.D. = 1,6).

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Triolo G., et al J.Clin.Lab.Immunol 13, 35-39 (1984)
2. Rong-jia Xu et al J.Immunol.Met. 135, 225-231(1990)
3. Menzel J.E.,et al J.Immunol. Met. 138, 16 (1991)
4. Muso E, et al Nippon Jinzo Gakkai Shi.36(4):345-54 (1994)
5. Yoshinoya S,et al J Clin Lab Immunol. 38(4):161-73 (1992)

Ed 01/2015

DCM016-12

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs