



## Instructions for Use

# CIC C1q ELISA

**IVD**



**REF** EIA-3169

 **96**

Distributed by:

**Meridian Healthcare srl**

Tel. +39 095 725 68 69 Fax: +39 095 725 44 54

info@meridianhealthcare.it

www.meridianhealthcare.it

Meridian Healthcare®

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
 Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
 Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.  
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.

### Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTENDED USE.....	2
2	PRINCIPLE .....	2
3	REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION .....	3
4	WARNINGS .....	3
5	PRECAUTIONS .....	4
6	PROCEDURE .....	4
7	QUALITY CONTROL .....	6
8	RESULTS.....	6
9	REFERENCE VALUES.....	6
10	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	7
11	WASTE MANAGEMENT.....	7
12	TROUBLESHOOTING .....	8
1	DESTINAZIONE D'USO.....	11
2	PRINCIPIO DEL METODO .....	11
3	REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE.....	12
4	AVVERTENZE .....	12
5	PRECAUZIONI.....	13
6	PROCEDIMENTO .....	13
7	CONTROLLO QUALITA' .....	15
8	RISULTATI.....	15
9	VALORI DI RIFERIMENTO .....	15
10	PARAMETRI CARATTERISTICI.....	16
11	DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO .....	16
12	SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI .....	17
13	BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFIA.....	18
	SYMBOLS USED.....	19

## 1 INTENDED USE

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

CIC C1q ELISA is intended for laboratory use only.

### 1.1 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 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 with kit

1. **Calibrators**, CAL0 – CAL2, (3 vials, 1.5 mL each), ready to use
2. **Controls** (2 vials, 1.5 mL each), ready to use  
74 mM Phosphate buffer, pH 7.4, 1 g/L BSA  
Control negative,  
Control positive
3. **Incubation Buffer** (1 vial, 50 mL)  
74 mM Phosphate buffer, pH 7.4
4. **Enzyme Conjugate** (1 vial, 0.5 mL)  
Anti human IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP)
5. **Conjugate Buffer** (1 vial, 20 mL)  
74 mM Phosphate buffer, pH 7.4
6. **Coated Microplate** (1 microplate breakable),  
Microplate coated with C1q
7. **Substrate Solution** (1 vial, 15 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)
8. **Stop Solution** (1 vial, 15 mL)  
Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)
9. **Wash Solution**, 10X concentrated (2 vials, 50 mL each)  
0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4

#### 3.2 Reagents necessary not supplied

Distilled water.

#### 3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

#### Note:

Store all reagents at 2 °C - 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 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 °C - 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 °C - 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, DRG 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 lipaemic 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 Standard Preparation

Standards are ready to use and have the following concentrations:

	CAL0	CAL1	CAL2
µgEq/mL	0	16	64

Allow the Calibrators to reach room temperature (22 °C - 28 °C) before use. Mix gently.

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2 °C - 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 22 °C - 28 °C.

### 6.3 Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial "Conc. Wash Solution 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 °C - 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 Sample Preparation

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:

<b>Sample</b>	<b>10 µL</b>
<b>Incubation Buffer (reagent 3)</b>	<b>500 µL</b>

Mix gently. Avoid using vortex.

The Controls are ready to use.

#### 6.5 Assay Procedure

**Allow all reagents to reach room temperature (22 °C - 28 °C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2 °C - 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 °C - 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 (CAL0 - CAL2), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagents	Standard	Sample/Control	Blank
Standard CAL0-CAL2	<b>100 µL</b>		
Controls		<b>100 µL</b>	
<u>Diluted</u> Sample		<b>100 µL</b>	
Incubate 30 minutes at 37 °C. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL diluted wash solution. <b>Important note:</b> 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. <b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
Diluted Conjugate	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>	
Incubate 30 minutes at 37 °C. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL diluted wash solution. <b>Washing:</b> follow the same indications of the previous point.			
TMB Substrate	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22 °C - 28 °C).			
Stop Solution	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>
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.			

## 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 standard (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 standard curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in  $\mu\text{g Eq/mL}$ .

## 9 REFERENCE VALUES

	<u><math>\mu\text{g Eq/mL}</math> of aggregates IgG</u>
Negative Sample	< 16
Uncertain Sample	between 16 – 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 CHARACTERISTICS

### 10.1 Precision

#### 10.1.1 Intra-Assay Variation

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

#### 10.1.2 Inter-Assay Variation

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

### 10.2 Recovery

The recovery of 12.5 – 25 – 50 – 100  $\mu\text{g Eq/mL}$  IgG aggregates added to a sample 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 standard is 1.0 mg Eq/mL at the 99 % confidence limit.

### 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 (EIA-3169). 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 CIC C1q ELISA (EIA-3169) and QUIDEL EIA kit. The obtained results are shown in the table below:

EIA-3169	-	+	-	+
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%

### 10.5 Comparative data

Circulating Immune complexes (CIC) collected from 160 patients 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  $\mu\text{g Eq/mL}$  (S.D. = 1.6)

## 11 WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.



## 12 TROUBLESHOOTING

### POSSIBLE ERROR 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 (CV%)

- reagents and/or strips not pre-warmed to room temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)

#### too high between-run (CV%)

- incubation conditions not constant (time, temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

## 1 DESTINAZIONE D'USO

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

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

### 1.1 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 è basato sul principio che gli immunocomplessi affini alla frazione C1q sono bloccati dal C1q immobilizzato sulla micropiastra.

Nella prima fase della procedura i campioni vengono aggiunti alla micropiastra coattata con C1q; segue un periodo di incubazione, durante il quale gli immunocomplessi affini alla frazione C1q si legano al C1q coattato alla micropiastra. Il lavaggio della micropiastra 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 micropiastra. Il lavaggio rimuove il coniugato non legato.

Nella terza fase si aggiunge il TMB Substrato, che reagisce con il coniugato legato alla micropiastra 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 ( $\mu\text{Eq/mL}$ )

### 3 REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1 Reattivi e materiali forniti nel kit

1. C1q **Standard** CAL0 - CAL2; (3 flaconi, 1,5 mL ciascuno)
2. **Control** (2 flaconi, 1,5 mL ciascuno, pronti all'uso),  
Phosphate buffer 74 mM pH 7.4, BSA 1 g/L,  
Controllo Negativo,  
Controllo Positivo
3. **Incubation Buffer** (1 flacone, 50 mL)  
Phosphate buffer 74 mM pH 7.4
4. **Enzyme Conjugate** (1 flacone, 0,5 mL)  
Anti human IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP)
5. **Conjugate Buffer** (1 flacone, 20 mL)  
Phosphate buffer 74 mM pH 7.4
6. **Microtiterwells** (1 micropiastra breakable)  
C1q adsorbito sulla micropiastra
7. **Substrate Solution** (1 flacone, 15 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*)
8. **Stop solution** (1 flacone) 15 mL  
Acido Solforico 0.15 mol/L (*evitare il contatto con la pelle*)
9. **Wash Solution**, 10X conc., (2 flaconi, 50 mL ciascuno)  
0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4

#### 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 2 °C - 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® 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 °C - 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 °C - 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 DRG rende disponibile separatamente un reattivo 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 degli Standard

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

	CAL0	CAL1	CAL2
µgEq/mL	0	16	64

Portare a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) prima dell'uso, agitando delicatamente.

Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2 °C - 8 °C.

### 6.2 Preparazione del Coniugato Diluito

Diluire il Conjugate (Reagente 4) 1:100 con il Conjugate 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 °C - 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 °C - 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:

<b>Campione</b>	<b>10 µL</b>
<b>Incubation Buffer (reagente 3)</b>	<b>500 µL</b>

Miscelare gentilmente. Evitare l'uso del vortex.

I Controlli sono pronti all'uso.

#### 6.5 Procedimento

**Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) per almeno 30 minuti.**

Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2 °C - 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 (CAL0-CAL2), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibratore	Campioni /Controlli	Bianco
Standard CAL0-CAL2	<b>100 µL</b>		
Controlli		<b>100 µL</b>	
Campione diluito		<b>100 µL</b>	
Incubare 30 minuti a 37 °C. Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti tre volte con 300 µL di wash solution diluita. <b>Nota importante:</b> 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. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
Coniugato diluito	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>	
Incubare 30 minuti a 37 °C. Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti tre volte con 300 µL di wash solution diluita. <b>Lavaggi:</b> seguire le stesse indicazioni del punto precedente			
TMB Substrate	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) al riparo dalla luce			
Stop Solution	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>
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.			

## 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 (CAL0-CAL2) 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 (CAL0-CAL2) 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  $\mu\text{Eq/mL}$ .

## 9 VALORI DI RIFERIMENTO

	<u><math>\mu\text{g Eq/mL di IgG aggregate}</math></u>
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 CIC C1q (EIA-3169) e il kit QUIDEL EIA. La tabella sotto riporta i risultati ottenuti:

<b>EIA 3169</b>	-	+	-	+
<b>QUIDEL kit</b>	-	+	+	-
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:

	<b>RA</b>	<b>SLE</b>	<b>Altri</b>	<b>RA+ SLE</b>	<b>RA+ SLE+ Altri</b>
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%

### 10.5 Altri dati di Comparazione

Il kit CIC C1q (EIA-3169) 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.

## 12 SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

### 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% intra-assy elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperature 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



**13 BIBLIOGRAPHY / 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)

## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité