



CIC-C1Q

Circulating Immune Complexes

ELISA

EK-CIC 96 wells

Revision date: 2008-11-26

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN CIC-C1Q EIA is intended for the quantitative *in vitro* diagnostic determination of circulating immune complexes (CIC) in serum and plasma of patients with various autoimmune and other CIC-related diseases (1-3).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Circulating immune complexes from patient sera, plasma or Calibrators and controls are incubated with human C1q adsorbed onto microtiter wells. After a washing step, an alkaline phosphatase (aPase) labeled conjugate (Protein A) is added, which binds to the Fc region of human IgG. After another washing step, the enzyme substrate (*para*-nitrophenyl-phosphate or pNPP) is pipetted followed by a stopping step (4-6). The absorption is measured at 405 nm.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Microtiter Plate Precoated with human C1q	12 x 8-well	B-CIC-MP	Ready to use
Plate Sealer	3 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10x) with preservatives	1 bottle 100 ml	B-CIC-WB	Dilute with 900 ml of deionized water
Incubation Buffer with preservatives	1 bottle 100 ml	B-CIC-IB	Ready to use
Calibrators A to E^{*)} Aggregated-IgG in a buffer matrix with preservatives	5 vials 1 ml	B-CIC-CASET	Ready to use
Control Low / High^{**)} Aggregated-IgG in a buffer matrix with preservatives	2 vials 1 ml	B-CIC-CONSET	Ready to use
Enzyme Label Protein A conjugated aPase in a protein-based buffer matrix with preservatives	1 vial 11 ml	B-CIC-EL	Ready to use
pNPP Substrate	1 vial 11 ml	B-PNPP	Ready to use
Stop Solution 1 N sodium hydroxide	1 vial 11 ml	B-NAOH	Ready to use Corrosive agent

Table 1

^{*)} The Calibrators A, B, C, D and E contain 50, 20, 10, 4 and 1 µg Equivalents of aggregated-IgG per ml (µg Eq/ml), respectively.

^{**)} The controls contain lot-specific amounts of Equivalents of aggregated-IgG per ml (µg Eq/ml). Refer to the QC data sheet added to the kit for exact concentrations.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Store at 2-8°C except Calibrators and Controls which must be stored at -20°C or below. Do not use past kit expiration date.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Microtiter Plate	Return unused strips immediately to the foil pouch containing the desiccant packs and reseal along the entire edge of zip-seal. Store until expiration date at 2-8°C.
Wash Buffer	Store at 2-8°C until expiration date.
Calibrators	Stable at -20°C until expiration date. For storage shorter than 3 months Calibrators and Controls can be stored at 2-8°C.
Controls	
Incubation Buffer	
Enzyme Label	
Substrate Solution	
Stop Solution	Store at 2-8°C until expiration date.

Table 2

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The Microtiter Plate, Calibrators and Controls of this kit contain components of human origin. Each serum donor unit used in the preparation of the kit components was tested by an FDA approved method and found negative for HBV surface antigen, so as for HCV and HIV1/2 antibodies. Although these methods are highly accurate, there is no guarantee that this material cannot transmit Hepatitis or AIDS. *Therefore, all patient specimens and kit components should be handled as if capable of transmitting infections.* All products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practice using appropriate precautions.

Substrate and Stop Solution: The Substrate Solution contains *para*-nitrophenyl-phosphate (pNPP). The Stop Solution contains 1N sodium hydroxide. Each of those reagents is irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothing. Wear suitable protective clothing, gloves and eye protection. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes with disposable tips for 20 µl, 100 µl and 1000 µl.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 ml cylinder for the dilution of the Wash Buffer concentrate.
- Microtiter plate washer or squeeze bottle for Wash Buffer.
- Blotting paper.
- Microtiter plate rotator.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 405 nm.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The procedure calls for 50 µl of blood per duplicate determination. Collect blood into plain tubes, avoid hemolysis, mix by inverting sample tube several times and leave to clot for 45 minutes at room temperature (18-28°C) protected from light. Centrifuge at 1800 x g for 15 minutes at room temperature (18-28°C) and collect the serum.

Lipemic, hemolytic and icteric samples should not be used in this assay. Lipemic samples can be avoided by asking patients to fast for at least 12 hours prior to the sample being taken.

Samples may be stored at 2-8 °C for up to 7 days. If samples are to be stored for a longer period of time, they should be kept at ≤-20°C.

ASSAY PROCEDURE

Important: Allow all reagents to 18-28°C prior to use.

1. Dilute all patient samples 1:50 with Incubation Buffer (e.g. 20 µl of serum or plasma + 980 µl of Incubation Buffer) and mix well. Allow diluted samples to stand for 15 minutes at 18-28°C prior to pipetting in step 4c.
2. Prepare a plate with sufficient strips to test the required number of calibrators, controls and samples. Remove excess strips from the holder and re-seal them in the foil pouch together with the desiccant packs **without delay**. Store refrigerated.
3. Wash the coated wells twice using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
- 4a. Pipet 100 µl of Incubation Buffer in duplicate into wells A1+A2
Pipet 100 µl of Calibrator A in duplicate into wells B1+B2
Pipet 100 µl of Calibrator B in duplicate into wells C1+C2.
Pipet 100 µl of Calibrator C in duplicate into wells D1+D2.

- Pipet 100 µl of Calibrator D in duplicate into wells E1+E2.
 Pipet 100 µl of Calibrator E in duplicate into wells F1+F2.
- 4b. Pipet 100 µl of the Low Control in duplicate into wells G1+G2.
 Pipet 100 µl of the High Control in duplicate into wells H1+H2.
- 4c. Pipet 100 µl of each diluted sample (1:50) in duplicate into the subsequent wells.
5. Cover the plate with a plate sealer, place the plate on a plate rotator set at 400-600 rpm and incubate for 1 hour $\pm$ 5 minutes at 18-28°C.
6. Remove and discard the plate sealer. Empty the wells and wash three times using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
7. Pipet 100 µl of Enzyme Label to all wells.
8. Cover the plate with a plate sealer, place the plate on a plate rotator set at 400-600 rpm and incubate for 30 minutes $\pm$ 5 minutes at 18-28°C.
9. Remove and discard the plate sealer. Empty the wells and wash three times using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
- Important: Allow the pNPP substrate solution to reach 18-28°C.**
10. Pipet 100 µl of the pNPP Substrate Solution to all wells.
11. Cover the plate with a plate sealer, place the plate on a plate rotator set at 400-600 rpm, protect the plate from direct light and incubate for 30 $\pm$ 5 minutes at 18-28 °C.
12. Pipet 100 µl of Stop Solution to all wells. Remove air bubbles with a pipette tip. Proceed to step 13 within 30 minutes.
13. Read the absorbance at 405 nm in a microtiter plate reader.

RESULTS AND CALCULATION

Standard Curve

- Record the absorbance at 405 nm for each calibrator and blank well.
- Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells and record averages (= corrected average absorbance).
- Plot the absorbance (vertical axis) versus the CIC concentration in µg Eq/ml of the Calibrators (horizontal axis) using log/log graph paper.
- Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a four parameter algorithm.

Samples and Controls

- Record the absorbance at 405 nm for each sample and control well.
- Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells and record the averages (=corrected average absorbance).
- Locate the corrected absorbance value of the sample on the vertical axis, draw a horizontal line intersecting the standard curve and read the CIC concentration (µg Eq/ml) from the horizontal axis.

See Table 11 and Figure 1 for an example of results and standard curve. *These results and standard curves are for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this package insert is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this package insert.

Since there is no control serum for CIC commercially available, we recommend using a positive serum pool for internal quality controls.

All controls must fall within established confidence limits. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the additional data sheet.

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) ELISA reader settings iii) expiration dates of reagents iv) storage and incubation conditions v) pNPP Substrate Solution should be colorless vi) purity of water.

LIMITATIONS

- The reagents supplied with this kit are optimized to measure circulating immune complexes in human serum or plasma.
- The amount of circulating immune complexes should be used as supplementary data available to the physician in establishing a diagnosis.
- Serum or plasma titer values depend on the assay method and, in particular, on the specificity and the cut-off values established with an assay method. Titer values obtained with different assay methods cannot be compared directly.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision (Within-Run): 3.6%. The intra-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values obtained in a single run. The values are presented in µg Eq/ml (see Table 12)

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 11.3%. The inter-assay precision was calculated from the results of 3 pairs of values obtained in 20 different runs. The values are presented in µg Eq/ml (see Table 13).

Dilution Linearity/Parallelism: 104.8%. Human serum samples containing low and high titers of CIC were diluted with Incubation Buffer and subsequently assayed according to the assay procedure. The values are presented in µg Eq/ml (see Table 14).

Plasma/Serum comparison: Human plasma and serum samples from 47 donors were diluted (1:50) with Incubation Buffer and subsequently assayed according to the assay procedure. All negative (n=27) and all borderline (n=10) serum samples were negative or borderline, respectively when measured in EDTA plasma. The same was true for heparin plasma (n=20). Ten positive serum samples showed a very high correlation (r=0.978) to the plasma samples of the same donor. Therefore CIC can be tested either in serum or plasma samples.

Standardization: The Calibrators of the BÜHLMANN CIC-C1Q EIA Kit were calibrated against a reference preparation of aggregated human IgG, which was prepared under the auspices of WHO (Geneva Section).

Analytical Sensitivity: 0.58 µg Eq/ml. Twenty duplicates of Incubation Buffer (Reagent Blank) were assayed in a single run. Mean and standard deviation were calculated for the absorbance values. The minimum detectable dose of CIC complexes was calculated to be 0.58 µg Eq/ml by adding two standard deviations to the mean absorbance of the Reagent Blank (Incubation Buffer) and intersecting this value with the standard curve obtained in the same run.

Functional Sensitivity: <1 µg Eq/ml. Twenty duplicates of low CIC concentrations were assayed in a single run. The

functional least detectable dose (FLDD) was calculated to be <1 µg Eq/ml (cut-off intra-assay CV = 10%).

Hook effect: No hook effect was observed up to 50'000 µg Eq/ml.

Method of Comparison: A sample comparison (n=64) of this assay and another FDA cleared commercial method showed the following correlation:

Relative Sensitivity 24/25 = 96%
Relative Specificity 38/39 = 97.4%
Relative Accuracy 62/64 = 96.9%

CUT-OFF VALUES (EXPECTED VALUES)

The frequency of CIC in normal human sera or plasma was determined using blood samples from asymptomatic volunteer blood donors (adult men and women at the age of 18 to 70 years). 192 samples were assayed according to the assay procedure and the results shown in Table 15, expressed in µg Equivalent per ml (µg Eq/ml), were obtained.

NOTE: These titer ranges should be used as guidelines only. It is recommended that each laboratory establishes its own expected ranges.

Proposed Cut-off Titer

A total of 10 strongly elevated values (> mean+3SD) from the results of the 192 apparently healthy normal blood donors were eliminated in three iterative cycles. This resulted in a theoretical **cut-off value** (mean + 2 SD) of **3.2 µg Eq/ml**.

Borderline and positive

For practical reasons we recommend that values between **3.2 and 5.0 µg Eq/ml** should be regarded as **borderline results** (grey zone).

Values above **5.0 µg Eq/ml** should be regarded as **positive**.

General limitations of CIC normal ranges: elevated ranges of CIC are known in up to 10% of normal blood donors without any clinical manifestations (true negatives outside the normal range) (7,8). This stands in good agreement with our results: 6 (3.1 %) of 192 normal donor samples were positive in the CIC ELISA and 14 (7.3 %) were within the grey zone.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN CIC-C1Q EIA Test wird gebraucht für die direkte und quantitative *in vitro* diagnostische Bestimmung von zirkulierenden Immunkomplexen (CIC) in Serum oder Plasma von Patienten mit verschiedenen Autoimmun- und anderen CIC-abhängigen Krankheiten (1-3).

PRINZIP DER METHODE

Zirkulierende Immunkomplexe (CIC) von Patientenproben (Serum oder Plasma), Kalibratoren und Kontrollen werden in der mit humanem C1q-beschichteten Mikrotiter-Platte inkubiert. Nach einem Waschschriff, wird Protein A, welches mit alkalischer Phosphatase (aPase) konjugiert ist und die Fc Region von humanem IgG bindet, zu der Platte zugegeben. Nach einem weiteren Waschschriff wird das Enzymsubstrat (*para*-Nitrophenylphosphat; pNPP) zu der Platte zugegeben. Die Färbereaktion wird mit einer Stop-Lösung beendet. Der CIC-Titer wird durch die Messung der Absorption bei 405 nm ermittelt.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Mikrotiter-Platte Beschichtet mit humanem C1q	8 x 12 Küvetten	B-CIC-MP	Gebrauchsfertig
Abdeckfolien	3 Stück		
Waschpuffer Konzentrat (10x) Mit Konservierungsstoffen	1 Flasche 100 ml	B-CIC-WB	Mit 900 ml deionisiertem H ₂ O verdünnen
Inkubationspuffer Mit Konservierungsstoffen	1 Flasche 100 ml	B-CIC-IB	Gebrauchsfertig
Kalibratoren A-E^{*)} Aggregiertes IgG in einer Puffermatrix mit Konservierungsstoffen	5 Flaschen 1 ml	B-CIC-CASET	Gebrauchsfertig
Kontrolle tief und hoch^{**)} aggregiertes IgG in einer Puffermatrix mit Konservierungsstoffen	2 Flaschen 1 ml	B-CIC-CONSET	Gebrauchsfertig
Enzymmarker Mit aPase gekoppeltes Protein A in Puffermatrix mit Konservierungsstoffen	1 Flasche 11 ml	B-CIC-EL	Gebrauchsfertig
pNPP-Substrat	1 Flasche 11 ml	B-PNPP	Gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 1 N Natriumhydroxid	1 Flasche 11 ml	B-NAOH	Gebrauchsfertig Korrosiv

Table 3

^{*)} Die Kalibratoren A, B, C, D und E enthalten 50, 20, 10, 4 und 1 µg Equivalente aggregiertes IgG pro ml (µg Eq/ml).

^{**)} Die Kontrollen enthalten Lot-spezifische Mengen von Equivalente an aggregierten IgG pro ml (µg Eq/ml). Siehe zusätzliches Kontrollenblatt für die genauen Konzentrationen.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Lagerung bei 2-8°C außer Kalibratoren und Kontrollen bei -20°C oder darunter. Zu verwenden bis zum Verfallsdatum	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Mikrotiter-Platte	Ungebrauchte Streifen sofort in die mit Dessikator versetzte Packung zurückbringen. Packung gut verschliessen. Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C halt bar.
Waschpuffer	Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C lagern.
Kalibratoren	bei -20°C bis zum Verfallsdatum haltbar. Bei einer Lagerung kürzer als 3 Monate, können diese bei 2-8°C gelagert werden.
Kontrollen	
Inkubationspuffer	Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C lagern.
Enzymmarker	
pNPP-Substrat	
Stopp-Lösung	

Table 4

WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Mikrotiter-Platte, sowie die Kalibratoren und Kontrollen dieses Testes enthalten Komponenten menschlicher Herkunft. Jedes einzelne Spenderserum wurde durch eine FDA genehmigte Methode auf HBV Oberflächen Antigen, sowie auf HCV und HIV1/2 Antikörper getestet, und als negativ freigegeben. Trotz hoher Genauigkeit dieser Methoden kann keine Garantie gewährleistet werden, dass die Materialien nicht Hepatitis oder AIDS übertragen können. *Aus diesem Grunde müssen diese Kit Komponenten, sowie die Patientenproben als potentiell infektiös betrachtet werden.* Alle Produkte welche menschliches Material enthalten müssen mit größter Vorsicht und nach den Vorgaben der Guten Labor Praxis verarbeitet werden.

Substrat- und Stop-Lösung; Die Substratlösung enthält para-Nitrophenylphosphat (pNPP). Die Stop-Lösung enthält 1N Natriumhydroxid. Beide Reagenzien reizen die Augen, die Haut und die Schleimhautmembranen. Berührung mit den Augen, der Haut und der Bekleidung vermeiden. Geeignete Schutzkleider, Handschuhe und Brillen tragen. Bei allfälligem Kontakt einer dieser Reagenzien mit den Augen oder der Haut, sofort mit viel Wasser spülen.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten für 20 µl, 100 µl und 1000 µl.
- Polystyren oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Vorbereitung der Probenverdünnung.
- 1000 ml Zylinder zur Verdünnung des Waschpuffers.
- Mikrotiter-Platten-Waschgerät oder Spritzflasche für Waschpuffer.
- Saugfähiges Papier.
- Mikrotiter-Platten-Schüttler.
- Mikrotiter-Platten-Photometer mit optischem Filter (405 nm).

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Der Test benötigt 50 µl Blut pro Doppelmessung. Die Blutproben in den entsprechenden Röhrchen sammeln, Hämolyse vermeiden, Durch mehrmaliges Invertieren die Blutprobe mischen und danach lichtgeschützt während 45 Minuten bei Raumtemperatur (18-28°C) gerinnen lassen. 15 Minuten bei 18-28°C und 1800 x g zentrifugieren, danach Serum sammeln.

Lipämische, hämolytische oder ikterische Blutproben sollten nicht verwendet werden. Lipämische Proben können verhindert werden, indem der Patient mindestens 12 Stunden vor der Blutentnahme keine Nahrung zu sich nimmt.

Serumproben können bei 2-8°C bis 7 Tagen gelagert werden. Falls eine längere Haltbarkeit erwünscht ist, sollten sie bei ≤-20°C gelagert werden.

ARBEITSANLEITUNG

Wichtig: Die Kit-Reagenzien vor Gebrauch auf 18-28°C bringen.

1. Patientenproben mit Inkubationspuffer 1:50 verdünnen (z.B. 20 µl Serum + 980 µl Inkubationspuffer) und gut mischen. Verdünnte Proben vor dem Pipettieren vom Schritt 4c 15 Minuten lang bei 18-28°C stehen lassen.
2. Eine Mikrotiter-Platte mit ausreichenden Streifen für das Testen der gewünschten Kalibratoren, Kontrollen und Proben vorbereiten. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und sofort mit dem Dessikator einpacken und gekühlt lagern.
3. Mikroküvetten zweimal mit jeweils ≥300 µl Waschpuffer waschen. Waschpuffer dekantieren und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

- 4a. Zweimal 100 µl Inkubationspuffer in die Mikroküvetten A1 und A2 pipettieren (als Blank).
Zweimal 100 µl Kalibrator A in die Mikroküvetten B1 und B2 pipettieren.
Zweimal 100 µl Kalibrator B in die Mikroküvetten C1 und C2 pipettieren.
Zweimal 100 µl Kalibrator C in die Mikroküvetten D1 und D2 pipettieren.
Zweimal 100 µl Kalibrator D in die Mikroküvetten E1 und E2 pipettieren.
Zweimal 100 µl Kalibrator E in die Mikroküvetten F1 und F2 pipettieren.
- 4b. Zweimal 100 µl Kontrolle Tief in die Mikroküvetten G1 und G2 pipettieren.
Zweimal 100 µl Kontrolle Hoch in die Mikroküvetten H1 und H2 pipettieren.
- 4c. Zweimal 100 µl von den verdünnten Serumproben in die nächsten Mikroküvetten pipettieren.
5. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 1 Stunde (± 5 Minuten) bei 18-28°C auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler bei 400-600 rpm inkubieren.
6. Abdeckfolie entsorgen und die Mikroküvetten entleeren und viermal mit jeweils ≥300 µl Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
7. 100 µl Enzymmarker zu jeder Mikroküvette zugeben.
8. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 30 ± 5 Minuten bei 18-28°C auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler bei 400-600 rpm inkubieren.
9. Abdeckfolie entsorgen und die Mikroküvetten entleeren und dreimal mit jeweils ≥300 µl Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
Wichtig: pNPP-Substratlösung auf 18-28°C erwärmen.
10. 100 µl pNPP-Substrat zu jeder Mikroküvette zugeben.
11. Mikrotiter-Platte mit Abdeckfolie abdecken und 30 ± 5 Minuten bei 18-28°C auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler bei 400-600 rpm inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.
12. 100 µl Stop-Lösung zu jeder Mikroküvette zugeben und allfällige Luftbläschen mit Pipettenspitzen entfernen.
13. Optische Dichte bei 405 nm innerhalb der nächsten 30 Minuten messen.

RESULTATE

Eichkurve

- Optische Dichte aller mit Kalibrator oder Blank gefüllten Mikroküvetten bei 405 nm messen.
- Zur Ermittlung der „korrigierten Absorptionsmittelwerte“ wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Blankes von demjenigen der Kalibratoren subtrahiert.
- Korrigierte Absorptionsmittelwert (Vertikalachse) gegen die CIC-Konzentration der Kalibratoren in µg Eq/ml (Horizontalachse) auf einem logarithmischen (log/log) Papier auftragen
- Optimale „best fitting curve“ Eichkurve zeichnen oder mit einem „vier Parameter“ Algorithmus berechnen.

Proben und Kontrollen

- Optische Dichte der Proben und Kontrollen bei 405 nm messen.
- Zur Ermittlung der „korrigierten Absorptionsmittelwerte“ wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Blankes von demjenigen der Proben und Kontrollen subtrahiert.
- CIC-Konzentration der Proben und Kontrollen in µg Eq/ml aus der Eichkurve lesen, indem der korrigierte

Absorptionsmittelwert auf der Eichkurve aufgetragen wird und die entsprechende CIC-Konzentration aus der Horizontalachse bestimmt wird.

Siehe Table 11 und Figure 1 (Seite 14) für ein Beispiel von Resultaten und Eichkurve. *Diese Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testenansatzes danach zu berechnen. Eine Eichkurve muss für jeden Probenansatz jeweils neu ermittelt werden.*

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Testpackungsbeilage ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur erreicht, durch die Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung.

Da es kein kommerziell erhältliches Kontrollenserum für CIC gibt, wird empfohlen, positive Serumproben (Pool) als interne Qualitätskontrolle anzuwenden.

Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem zusätzlichen Kontrollblatt angegeben.

Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des etablierten Erwartungsbereiches liegen. Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte Messungen ein technisches Problem ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettierung, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii) Photometer Eichung, iii) Verfallsdaten der Reagenzien, iv) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, v) die pNPP Substratlösung sollte farblos sein, vi) Wasserreinheit.

LIMITATIONEN

- Die Reagenzien welche zu diesem Kit gehören sind für die Messung von zirkulierenden Immunkomplexen in human Serum oder Plasma optimiert worden.
- Die gemessene Menge zirkulierender Immunkomplexe sollte als zusätzliche Information für den behandelnden Arzt dienen, um eine Diagnose stellen zu können.
- Serum- oder Plasmatiter sind abhängig von der verwendeten Testmethode und, im speziellen, von der Spezifität und den Grenzwerten, welche mit der entsprechenden Testmethode ermittelt wurden. Titerwerte, welche mit unterschiedlichen Testmethoden erhalten wurden, können nicht direkt miteinander verglichen werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Präzision (Within-Run): 3.6%. Die intra-Assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung im gleichen Ansatz. Die Resultate sind in Table 12 in $\mu\text{g Eq/ml}$ angegeben.

Inter-Assay Präzision (Run-to-Run): 11.3%. Die inter-Assay Präzision wurde bestimmt durch die Doppelmessung von 3 Proben in 20 aufeinanderfolgenden Ansätzen. Die Resultate sind in Table 13 in $\mu\text{g Eq/ml}$ angegeben.

Verdünnungslinearität: 104.8%. Humane Serumproben mit tiefen und erhöhten CIC-Spiegel wurden mit Inkubationspuffer verdünnt und danach gemäss Arbeitsanleitung getestet. Die Resultate sind in Table 14 in $\mu\text{g Eq/ml}$ angegeben.

Plasma/Serum Vergleich: Humane Plasma- und Serumproben von 47 Normalspendern wurden mit Inkubations-Puffer verdünnt (1:50) und entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Alle negativen ($n=27$) und alle grenzwertigen ($n=10$) Serumproben waren im EDTA-

Plasma ebenfalls negativ oder grenzwertig. Das gleiche konnte mit Heparin Plasma beobachtet werden ($n=20$). Zehn positive Serumproben zeigten eine sehr hohe Korrelation ($r=0.978$) zu den entsprechenden Plasmaproben. Daraus resultiert, dass CIC sowohl im Serum als auch im Plasma gemessen werden kann.

Standardisierung: Die Kalibratoren des BÜHLMANN CIC-C1Q EIA Testes wurden gegen eine Referenzpräparation von aggregiertem IgG kalibriert, welche unter der Federführung der WHO (Genfer Sektion) hergestellt wurde.

Sensitivität:

Analytische Sensitivität: 0.58 $\mu\text{g Eq/ml}$. Zwanzig Doppelmessungen mit Inkubations-Puffer (Blank) wurden im gleichen Testansatz durchgeführt. Mittelwert und Standardabweichung der Absorptionswerte wurden berechnet. Die minimale, nachweisbare CIC-Menge wurde als 0.58 $\mu\text{g Eq/ml}$ definiert, indem zwei Standardabweichungen zum Absorptionsmittelwert des Blanks addiert wurden und der CIC-Titer aus diesem erhaltenen Absorptionswert mit Hilfe der im gleichen Testansatz erhaltenen Eichkurve ermittelt wurde.

Funktionelle Sensitivität: <1 $\mu\text{g Eq/ml}$. Zwanzig Doppelmessungen von tiefen CIC Konzentrationen wurden im gleichen Testansatz durchgeführt. Die tiefste funktionell nachweisbare Menge (FLDD) wurde als <1 $\mu\text{g Eq/ml}$ definiert (Grenzwert für den Intra-Assay CV=10%).

Hook Effekt: Kein Hook Effekt konnte bis 50'000 $\mu\text{g Eq/ml}$ beobachtet werden.

Methodenvergleich: Ein Probenvergleich ($n = 64$) zwischen diesem Test und einer anderen, FDA-genehmigten, Methode ergab folgende Korrelation:

Relative Sensitivität	24/25 = 96%
Relative Spezifität	38/39 = 97.4%
Relative Genauigkeit	62/64 = 96.9%

NORMALBEREICH UND GRENZWERTE (CUT-OFF)

Die Häufigkeit von CIC im normalen Humanserum oder Plasma wurde mit Blutproben von asymptomatischen Blutspendern des Schweizerischen Roten Kreuzes (männliche und weibliche Erwachsene im Alter von 18 zu 70 Jahren) ermittelt. 192 Proben wurden entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Table 15 zeigt die erhaltenen Ergebnisse (Angabe in $\mu\text{g Eq/ml}$).

HINWEIS: Die angegebenen Werte (Verhältnisse) dienen nur als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor Normalbereiche ermittelt, die der eigenen Patientenpopulation entsprechen.

Vorgeschlagener Grenzwert (Cut-Off)

Nach der Eliminierung von 10 Ausreissern ($>$ Mittelwert + 3SD) aus 192 getesteten Proben durch drei iterative Zyklen, errechnet sich ein theoretischer Grenzwert (Mittelwert + 2 SD) von **3.2 $\mu\text{g Eq/ml}$.**

Grenzwert und Positive

Aus praktischen Gründen wird es empfohlen, Werte zwischen **3.2 und 5.0 $\mu\text{g Eq/ml}$** als grenzwertig (Graubereich) zu betrachten.

Werte höher als **5.0 $\mu\text{g Eq/ml}$** können als positiv betrachtet werden.

Allgemeine Limitationen zu CIC Normalbereich: Es ist allgemein bekannt, dass bis zu 10% der Normalspender ohne klinische Manifestationen, erhöhte CIC Werte aufweisen können (= richtig negative ausserhalb des Normalbereichs) (7,8). Diese Beobachtung stimmt mit unseren Erfahrungen überein: 6 (3.1%) von 192 Normalspendern waren positiv im CIC ELISA und 14 (7.3%) befanden sich innerhalb des Graubereichs.

FRANCAIS

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse BÜHLMANN CIC-C1Q EIA a été conçue pour la détermination diagnostique quantitative *in vitro* des immuno-complexes circulants (CIC) présents dans le sérum ou le plasma de patients atteints de diverses maladies auto-immunes et d'autres maladies ayant un lien avec les CIC.

PRINCIPE DU DOSAGE

Les immuno-complexes circulants du sérum, du calibrateur, ou du plasma de patient sont incubés avec de la C1q humaine qui recouvre la microplaque. Après un lavage, la protéine A conjuguée à la phosphatase alcaline (aPase) est ajoutée, liant la partie constante Fc des IgG humaines. Après un second lavage, le substrat *para*-nitrophénylphosphate (pNPP) de la aPase est ajouté. La réaction est arrêtée et l'absorption est mesurée à 405 nm (4-6).

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Microplaque pré-coatée avec C1q humain	12 x 8 puits	B-CIC-MP	Prête à l'emploi
Films adhésifs	3 pièces		
Tampon de Lavage concentré (10x) avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-CIC-WB	A reconstituer avec 900 ml d'eau déionisée
Tampon d'incubation avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-CIC-IB	Prêt à l'emploi
Calibrateurs A à E*) agrégats d'IgG en tampon avec conservateurs	5 flacons 1 ml	B-CIC-CASET	Prêts à l'emploi
Contrôles bas et élevé**) Agrégats d'IgG en tampon avec conservateurs	2 flacons 1 ml	B-CIC-CONSET	Prêts à l'emploi
Marqueur enzymatique protéine A aPase-conjuguée dans un tampon protéique avec conservateurs	1 flacon 11 ml	B-CIC-EL	Prêt à l'emploi
Substrat pNPP	1 flacon 11 ml	B-PNPP	Prêt à l'emploi
Solution stop hydroxyde de sodium 1 N	1 flacon 11 ml	B-NAOH	Prête à l'emploi Corrosif

Table 5

*) Les calibrateurs A, B, C, D et E contiennent respectivement 50, 20, 10, 4 et 1 µg d'Equivalent d'agrégats IgG par ml (µg Eq/ml).

**) Les contrôles contiennent des quantités spécifiques à chaque lot d'équivalents d'IgG agrégés par ml (µg Eq/ml). Pour les concentration exactes, il convient de se référer aux limites de confiance communiquées avec chaque lot de production.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts	
Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette, sauf pour le calibrateur et les contrôles qui doivent être stockés à -20°C au minimum.	
Réactifs ouverts / Reconstitués	
Microplaque	Remplacer immédiatement les barrettes de 8 puits non utilisées dans la pochette contenant le dessiccateur puis la refermer soigneusement. Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.
Tampon de lavage dilué	Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.
Calibrateurs	Stables à -20°C jusqu'à la date de péremption. Pour un stockage pendant 3 mois Calibrateur et Contrôles peuvent être stockés à 2-8°C
Contrôles	
Tampon d'incubation	Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.
Marqueur enzymatique	
Substrat pNPP	
Solution stop	

Table 6

RECOMMANDATIONS ET PRECAUTION D'EMPLOI

Les contrôles de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Chaque unité de sérum de donneur utilisée dans la préparation des réactifs de la trousse a été testée par une méthode approuvée par la FDA et a été séronégative pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) et pour les anticorps anti-VIH1/2. Cependant, bien que ces méthodes soient très fiables, il ne peut être garanti que ce matériel ne puisse transmettre une hépatite B ou le SIDA.

En conséquence, tous les échantillons ainsi que les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux. Tous les produits contenant du matériel d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en respectant les précautions d'usage.

Substrat et Solution stop : Le substrat contient du *para*-nitrophénylphosphate (pNPP). La solution stop contient de l'hydroxyde de sodium. Ces substances irritent les yeux, la peau et les muqueuses. Eviter par conséquent tout contact avec les yeux, la peau et les vêtements. Porter des vêtements de protection, des gants et des lunettes de protection adaptés. En cas de contact avec les yeux ou la peau, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 20 µl, 100 et 1000 µl.
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène pour la préparation des dilutions d'échantillons.
- Epruvette graduée de 1000 ml pour la préparation du tampon de lavage.
- Laveur automatique de microplaques ou une pissette pour le tampon de lavage.
- Papier absorbant.
- Agitateur de microplaques.
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 405 nm.

PRELEVEMENT, PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Prélever le sang par ponction veineuse dans des tubes prévus à cet effet en évitant l'hémolyse. Centrifuger pendant 15 minutes à 2000 x g et 2-8°C puis récupérer le sérum ou le plasma. Les échantillons lipémiques, hémolytiques et ictériques ne devraient pas être utilisés pour ce dosage. Les échantillons lipémiques peuvent être évités en demandant aux patients de jeûner durant au moins 12 heures avant le prélèvement. La procédure requiert environ 0.1 ml de sang par détermination en duplicata. Ne pas désactiver les échantillons par la chaleur. Les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C durant 7 jours. Pour de plus longues durées de conservation, les échantillons devraient être placés à -20°C.

PROCEDURE

Important: Porter les réactifs à 18-28°C avant utilisation.

1. Diluer au 1:50 tous les échantillons avec le tampon d'incubation (par ex., 20 µl de sérum ou de plasma + 980 µl de tampon d'Incubation) et bien homogénéiser. Laisser reposer les échantillons dilués durant 15 minutes à 18-28°C avant le pipetage de l'étape 4c.
2. Préparer une microplaque avec suffisamment de puits pour recevoir tous les calibrateurs, contrôles et échantillons voulus. Retirer les barrettes en trop du support et les placer immédiatement au froid dans la pochette prévue à cet effet contenant le dessiccateur.

3. Laver deux fois chaque puits avec au moins 300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et taper fermement la microplaque sur du papier absorbant afin de sécher les puits.
- 4a. Distribuer 100 µl de tampon d'incubation en double dans les puits A1 et A2.
Distribuer 100 µl de calibrateur A en double dans les puits B1 et B2.
Distribuer 100 µl de calibrateur B en double dans les puits C1 et C2.
Distribuer 100 µl de calibrateur C en double dans les puits D1 et D2.
Distribuer 100 µl de calibrateur D en double dans les puits E1 et E2.
Distribuer 100 µl de calibrateur E en double dans les puits F1 et F2.
- 4b. Distribuer 100 µl de contrôle bas en double dans les puits G1 et G2.
Distribuer 100 µl de contrôle élevé en double dans les puits H1 et H2.
- 4c. Distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué (1:50) en double dans les puits suivants.
5. Couvrir la microplaque à l'aide d'un film adhésif fourni et incubé avec agitation à 400-600 rpm et 18-28°C pendant 1 heure (± 5 minutes).
6. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver chacun des puits avec trois fois ≥300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en tapant fermement la microplaque sur du papier absorbant.
7. Ajouter 100 µl de marqueur enzymatique dans chacun des puits.
8. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incubé avec agitation à 400-600 rpm et 18-28°C pendant 30 (± 5) minutes.
9. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver les puits trois fois avec chacun ≥300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en tapant fermement la microplaque sur du papier absorbant.

Important: Laisser le substrat pNPP atteindre une température de 18-28°C.

10. Ajouter 100 µl de substrat pNPP dans chaque puits.
11. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incubé avec agitation à 400-600 rpm et 18-28°C pendant 30 (± 5) minutes. Protéger la microplaque de la lumière.
12. Ajouter 100 µl de solution stop dans chaque puit. Éliminer les bulles d'air à l'aide d'une pointe de pipette. Passer à l'étape 13 dans les 30 minutes suivantes.
13. Lire l'absorbance à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

RESULTATS

Courbe d'étalonnage

- Mesurer l'absorbance à 405 nm pour chaque calibrateur et chaque blanc.
- Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues, soustraire la moyenne des blancs et relever les valeurs d'absorption moyenne corrigée.
- Reporter l'absorbance (axe vertical) contre la concentration en CIC (µg Eq/ml) des calibrateurs (axe horizontal) sur un quadrillage logarithmique (log/log).
- Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme de régression («spline smoothed fitting algorithm»).

Echantillons et contrôles

- Mesurer l'absorbance à 405 nm de chaque puits contenant échantillon ou contrôle.

- Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues, soustraire la moyenne des blancs et enregistrer les valeurs d'absorption moyenne corrigée.
- Lire la concentration en CIC des échantillons et contrôles au moyen de la courbe d'étalonnage en reportant la valeur d'absorbance corrigée obtenue sur la courbe d'étalonnage et en traçant une ligne verticale par ce point. L'intersection de cette droite verticale sur l'axe horizontal indique la concentration en CIC (µg Eq/ml).

Voir Table 11 et Figure 1 (page 14) pour un exemple de résultats et de courbe d'étalonnage. *Ces résultats et courbe d'étalonnage sont donnés à titre d'exemple uniquement. Une courbe d'étalonnage doit être déterminée pour chaque série d'échantillons à doser.*

CONTROLE QUALITE

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte de ce produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure. Comme il n'existe pas de sérum de référence pour les CIC commercialement disponibles, nous recommandons l'utilisation d'un pool de sérums positifs comme référence de contrôle qualité interne.

Tous les contrôles doivent avoir une valeur comprise entre les limites de confiance établies. Les limites de confiance des contrôles sont spécifiques à chaque lot et sont indiquées sur la feuille de contrôle contenue dans chaque trousse.

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage ainsi que des valeurs des contrôles devraient être comprises dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire. Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de contrôle de température et de temps, ii) calibrage des instruments, iii) date de péremption des réactifs, iv) conditions de stockage et d'incubation, v) le Substrat pNPP devrait être incolore, vi) pureté de l'eau.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision intra-essai: 3.6%. La précision intra-essai a été calculée à partir des mesures de 20 doubles de chaque échantillon au cours d'un seul et même essai (voir Table 12; les valeurs sont données en µg Eq/ml).

Précision inter-essai: 11.3%. La précision inter-essai a été calculée à partir des résultats de 3 doubles de chaque échantillon au cours de 20 essais différents (voir Table 13; les valeurs sont données en µg Eq/ml).

Linéarité/Parallélisme de dilution: 104.8%. Des échantillons sériques humains contenant des titres bas et élevés de CIC ont été dilués dans du tampon d'incubation puis mesurés selon la procédure standard (voir Table 14; les valeurs sont données en µg Eq/ml).

Comparaison plasma/sérum: Des échantillons de sérum et de plasma provenant de mêmes donneurs (n=47) ont été dilués au 1:50 dans le tampon d'incubation et analysés selon le protocole expérimental. Tous les échantillons de sérum négatifs (n=27) ou se trouvant dans la zone grise (n=10) sont respectivement négatifs et dans la zone grise pour le plasma. Des résultats identiques sont obtenus pour l'héparine plasma. La corrélation entre des mesures d'échantillons positifs de sérum et de plasma de mêmes donneurs (n=10) est très élevée (r=0.978). La mesure de CIC peut ainsi être effectuée dans le sérum ou le plasma.

Standardisation: Les calibrateurs de la trousse BÜHLMANN CIC-C1Q EIA ont été calibrés à l'aide de l'étalon de référence contenant des IgG humaines agrégées, qui a été établi sous les auspices de l'OMS (Section Genève).

Sensibilité:

Sensibilité analytique : 0.58 µg Eq/ml. Vingt doubles du tampon d'incubation (blancs) ont été mesurés au cours d'un seul et même essai. La moyenne et la déviation standard (SD) de l'absorbance ont été calculées. La quantité minimale détectable de CIC obtenue est égale à 0.58 µg Eq/ml en ajoutant deux déviations standards à l'absorbance moyenne du blanc (tampon d'incubation) et en lisant la concentration de CIC correspondante à l'aide de la courbe d'étalonnage établie lors du même essai.

Sensibilité fonctionnelle : <1 µg Eq/ml. Des échantillons de sérum de faibles titre en CIC ont été mesurés 20 fois en double dans le même essai. La concentration minimale détectable obtenue est < 1µg Eq/ml (cut-off intra essai CV=10%)

Effet Crochet: Aucun effet crochet (« Hook effect ») n'a été observé jusqu'à 50'000 µg Eq/ml.

Méthode de comparaison: Une comparaison (n = 64) de cette trousse avec une autre méthode commerciale approuvée par la FDA a permis d'établir les corrélations suivantes :

Sensibilité relative 24/25 = 96%
Spécificité relative 38/39 = 97.4%
Exactitude relative 62/64 = 96.9%

VALEURS SEUIL (VALEURS ATTENDUES)

La concentration de CIC dans le sérum ou le plasma humain normal a été déterminée en utilisant des échantillons de donneurs asymptomatiques (hommes et femmes adultes de 18 à 70 ans). 192 échantillons ont été testés selon la procédure standard. Les résultats obtenus, exprimés en µg Eq/ml, sont reportés sous Table 15.

REMARQUE : Ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif. Il est recommandé à chaque laboratoire de définir les valeurs normales pour sa propre population de patients.

Valeur seuil proposée

Un total de 10 valeurs fortement élevées (> moyenne + 3 SD) ont été éliminées des mesures des 192 donneurs normaux apparemment en bonne santé en trois cycles itératifs. Une **valeur seuil** théorique (moyenne + 2 SD) de **3.2 µg Eq/ml** a été définie.

Cas limites et positifs

Pour des raisons pratiques, nous recommandons de considérer les valeurs entre **3.2 et 5.0 µg Eq/ml** comme des **cas limites** (zone d'incertitude).

Les valeurs supérieures à **5.0 µg Eq/ml** devraient être considérées comme étant **positives**.

Limitations générales des titres normaux de CIC : des valeurs élevées de CIC chez des donneurs normaux peuvent apparaître dans environ 10 % des cas sans aucune manifestation clinique (vrais négatifs au-delà de la limite normale) (7, 8). Cette observation est en accord avec nos résultats : 6 (3.1%) parmi 192 échantillons de donneurs normaux ont été testés positifs avec le test CIC ELISA et 14 (7.3%) se trouvaient dans la zone d'incertitude.

ITALIANO

USO

Il kit BÜHLMANN CIC-C1Q EIA è un dosaggio per la determinazione quantitativa diagnostica *in vitro* degli immunocomplessi circolanti (CIC) nel siero e nel plasma di pazienti affetti da varie patologie autoimmuni e da altre patologie CIC-relazionate. (1-3).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Gli immunocomplessi circolanti provenienti da sieri o da plasma di pazienti o calibratori e controlli sono incubati con il C1q umano adeso ai pozzetti della micropiastra. Dopo lavaggio, viene aggiunto il coniugato marcato (Proteina A) con fosfatasi alcalina (aPase), che si lega alla regione Fc delle IgG umane. Dopo un ulteriore lavaggio, viene dispensato il substrato enzimatico (*para*-nitrofenil-fosfato o pNPP) quindi viene aggiunta la soluzione stoppante. (4-6). L'assorbanza viene letta a 405 nm.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Micropiastra Precoattata con C1q umana	12 x 8 Pozzetti	B-CIC-MP	Pronta all'uso
Foglio sigillante	3 pezzi		
Tampone di lavaggio concentrato (10x) Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-CIC-WB	Diluire con 900 ml di acqua deionizzata
Tampone di incubazione Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-CIC-IB	Pronto all'uso
Calibratori A - E^{*)} IgG-Aggregate in un tampone/matrice con conservanti	5 flaconi 1 ml	B-CIC-CASET	Pronti all'uso
Controllo basso / alto^{**)} IgG-Aggregate in un tampone/matrice con conservanti	2 flaconi 1 ml	B-CIC-CONSET	Pronti all'uso
Marcato enzimatico Proteina A coniugato alla aPase in una matrice/tampone proteica con conservanti	1 flacone 11 ml	B-CIC-EL	Pronto all'uso
Substrato di pNPP	1 flacone 11 ml	B-PNPP	Pronto all'uso
Soluzione stoppante 1 N idrossido di sodio	1 flacone 11 ml	B-NAOH	Pronto all'uso Agente corrosivo

Tabella 7

^{*)} I calibratori A ,B, C, D ed E contengono 50, 20, 10, 4 e 1 µg

rispettivamente di equivalenti delle IgG aggregate per ml (µg Eq/ml).

^{**)} I controlli contengono quantitativi lotto specifici di equivalenti di IgG aggregate per ml (µg Eq/ml). Fare riferimento al foglio di QC aggiunto al kit per le concentrazioni esatte.

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti non aperti	
Conservare a 2-8°C ad esclusione dei calibratori e dei controlli che devono essere conservati a -20°C o a temperature inferiori. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.	
Reagenti aperti/ ricostituiti	
Micropiastra	Riporre le strip non utilizzate immediatamente nella confezione contenente essiccante e risigillare la busta. Conservare fino alla data di scadenza a 2-8°C.
Tampone di lavaggio	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza
Calibratori	Stabili a -20°C fino alla data di scadenza. Per una conservazione inferiore a 3 mesi i calibratori ed i controlli possono essere conservati a 2-8°C.
Controlli	
Tampone di incubazione	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza.
Marcato enzimatico	
Substrato di pNPP	
Soluzione stoppante	

Tabella 8

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

La micropiastra, i calibratori ed i controlli di questo kit contengono componenti di origine umana. Ciascuna unità di siero utilizzata nella preparazione dei componenti del kit è stata testata da un metodo approvato dall'FDA e trovato negativo per l'antigene di superficie dell'HBV, per gli anticorpi anti-HCV ed anti-HIV 1 e 2. Benché questi metodi siano altamente accurati, non esistono garanzie che questo materiale non possa trasmettere l'epatite o l'AIDS. *Quindi, tutti i campioni ed i componenti del kit devono essere manipolati come se potessero trasmettere infezioni.* Tutti i prodotti contenenti materiali di origine umana, devono essere manipolati secondo quanto previsto dalle buone pratiche di laboratorio utilizzando idonee precauzioni.

Substrato e Soluzione stoppante: Il substrato di pNPP contiene para-nitrofenil-fosfato (pNPP). La soluzione stoppante contiene 1N di idrossido di sodio. Ciascuno dei reagenti è irritante per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con gli occhi, la pelle ed il vestiario. Indossare idonei indumenti protettivi, guanti e protezioni per gli occhi. Dopo contatto con gli occhi o la pelle, lavare immediatamente con molta acqua.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso per 20 µl, 100 µl e 1000 µl.
- Provette monouso di polistirene o polipropilene per la preparazione delle diluizioni.
- Cilindro da 1000 ml per la diluizione del tampone di lavaggio concentrato.
- Lavatore per micropiastre o bottiglia a spruzzo per il tampone di lavaggio.
- Carta blottante.
- Rotatore per micropiastre.
- Lettore per micropiastre per la misurazione dell'assorbanza a 405 nm.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

La procedura richiede 50 µl di sangue per determinazioni in duplicato. Prelevare il sangue in provette semplici, evitando l'emolisi, mescolare capovolgendo la provetta diverse volte e lasciar coagulare 45 minuti a temperatura ambiente (18-28°C) proteggere dalla luce. Centrifugare a 1800 x g per 15 minuti a temperatura ambiente (18-28°C) e prelevare il siero.

Non utilizzare campioni lipemici, emolitici ed itterici. I campioni lipemici possono essere evitati chiedendo ai pazienti di digiunare almeno 12 ore prima del prelievo. I campioni possono essere conservati a 2-8 °C fino a 7 giorni. Se i campioni devono essere conservati per periodi più lunghi, mantenerli a ≤-20°C.

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

Importante: Fare in modo che i reagenti raggiungano 18-28°C prima dell'uso.

1. Diluire tutti i campioni 1:50 con tampone di incubazione (e.g. 20 µl di siero o plasma + 980 µl di tampone di incubazione) e mescolare bene. Fare in modo che i campioni diluiti riposino per 15 minuti a 18-28°C prima di dispensare al punto 4c.
2. Preparare una micropiastra con strip sufficienti per testare il numero richiesto di calibratori, controlli e campioni. Rimuovere le strip in eccesso dal supporto e risigillarle **immediatamente** in una busta con essiccante. Conservare refrigerata.
3. Lavare i pozzetti coattati due volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Vuotare i

pozzetti e scuotere la piastra energicamente su carta blottante.

- 4a. Dispensare 100 µl di tampone di incubazione in duplicato nei pozzetti A1+A2
Dispensare 100 µl del calibratore A in duplicato nei pozzetti B1+B2
Dispensare 100 µl del calibratore B in duplicato nei pozzetti C1+C2.
Dispensare 100 µl del calibratore C in duplicato nei pozzetti D1+D2.
Dispensare 100 µl del calibratore D in duplicato nei pozzetti E1+E2.
Dispensare 100 µl del calibratore E in duplicato nei pozzetti F1+F2.
- 4b. Dispensare 100 µl del controllo basso in duplicato nei pozzetti G1+G2.
Dispensare 100 µl del controllo alto in duplicato nei pozzetti H1+H2.
- 4c. Dispensare 100 µl di ciascuno dei campioni diluiti (1:50) in duplicato nei pozzetti successivi.
5. Coprire la piastra con un foglio sigillante, collocare la piastra su un rotatore settato a 800–1000 rpm ed incubare per 1 ora ± 5 minuti a 18-28°C.
6. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare tre volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e scuotere la piastra energicamente su carta blottante.
7. Dispensare 100 µl di marcato enzimatico in tutti i pozzetti.
8. Coprire la piastra con un foglio sigillante, collocare la piastra su un rotatore settato a 800–1000 rpm ed incubare per 30 minuti ± 5 minuti a 18-28°C.
9. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare tre volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e scuotere la piastra energicamente su carta blottante.
Importante: Fare in modo che il substrato di pNPP raggiunga 18-28°C.
10. Dispensare 100 µl del substrato di pNPP a tutti i pozzetti.
11. Coprire la piastra con un foglio sigillante, collocare la piastra su un rotatore settato a 400-600 rpm, proteggere la piastra dalla luce diretta ed incubare per 30 ± 5 minuti a 18-28 °C.
12. Dispensare 100 µl della soluzione stoppante a tutti i pozzetti. Rimuovere le bolle d'aria con una pipetta. Procedere con il punto 13 entro 30 minuti.
13. Leggere l'assorbanza a 405 nm in un lettore per micropiastre.

CALCOLO DEI RISULTATI

Curva Standard

- Annotare l'assorbanza a 405 nm per ciascun calibratore e pozzetto bianco.
- Effettuare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi ed annotare le medie (= assorbanza media corretta).
- Plottare l'assorbanza (asse verticale) verso la concentrazione CIC in µg Eq/ml dei calibratori (asse orizzontale) utilizzando carta per grafici log/log.
- Disegnare la migliore curva o calcolare la curva standard utilizzando un algoritmo a quattro parametri.

Campioni e controlli

- Annotare l'assorbanza a 405 nm per ciascun campione e pozzetto dei controlli.
- Calcolare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi ed annotare le medie (=assorbanza media corretta).

- Localizzare il valore di assorbanza corretto del campione sull'asse verticale, disegnare una linea orizzontale che interseca la curva standard e leggere la concentrazione CIC ($\mu\text{g Eq/ml}$) dall'asse orizzontale.

Vedi Table 11 and Figure 1 Come esempio dei risultati e di curva standard. *Questi risultati e le curve standard sono a solo scopo dimostrativo. Occorre generare una curva standard per ciascun set di campioni da dosare.*

CONTROLLO QUALITÀ

E' necessaria una comprensione completa di questa metodica per un utilizzo ottimale del prodotto. Solo utilizzando tecniche di laboratorio precise sarà possibile ottenere risultati affidabili (attuali linee guida GLP) e seguendo con cura quanto indicato in questa metodica.

Poiché non esiste nessun siero di controllo per il CIC disponibile in commercio, consigliamo l'utilizzo di un pool di sieri positivi per i controlli di qualità interni.

Tutti i controlli devono rientrare entro limiti di confidenza stabiliti. I limiti di confidenza per i controlli sono lotto specifici e stampati sul foglio dati aggiuntivo.

La riproducibilità dei parametri della curva standard e dei valori dei controlli deve essere entro limiti stabiliti di accettabilità. Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, controllo della temperatura e del tempo; ii) settaggi del lettore ELISA; iii) data di scadenza dei reagenti; iv) conservazione ed incubazione; v) il substrato di pNPP deve essere incolore; vi) purezza dell'acqua.

LIMITI

- I reagenti forniti in questo kit sono ottimizzati per misurare gli immunocomplessi circolanti nel siero o nel plasma umani.
- Il quantitativo degli immunocomplessi in circolo deve essere utilizzato come dato aggiuntivo per il medico nel determinare la diagnosi.
- I valori di siero o plasma dipendono dal metodo ed, in particolare, dalla specificità e dai valori di cut-off stabiliti con un metodo. I valori del titolo ottenuti con dosaggi diversi non possono essere comparati direttamente.

CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Precisione intradosaggio: 3.6%. E' stata calcolata la precisione intradosaggio dai risultati di 20 coppie di valori ottenuti in un unico dosaggio. I valori sono presentati in $\mu\text{g Eq/ml}$ (vedi Table 12).

Precisione interdosaggio: 11.3%. La precisione interdosaggio è stata calcolata dai risultati di 3 coppie di valori ottenute in 20 sedute diverse. I valori sono presentati in $\mu\text{g Eq/ml}$ (vedi Table 13).

Linearità di diluizione/parallelismo: 104.8%. I campioni di siero umano contenenti livelli bassi ed elevati di CIC sono stati diluiti con il tampone di incubazione e successivamente dosati secondo procedura. I valori sono presentati in $\mu\text{g Eq/ml}$ (vedi Table 14).

Comparazione plasma/siero: I campioni di plasma e di siero umano di 47 donatori sono stati diluiti (1:50) con il tampone di incubazione e successivamente dosati secondo procedura. Tutti i campioni di siero negativi ($n=27$) e borderline ($n=10$) erano realmente negativi o borderline se dosati con il plasma EDTA. Lo stesso si è verificato per il plasma eparinizzato ($n=20$). Dieci campioni di siero positivi hanno presentato una correlazione molto elevata ($r=0.978$) con i campioni di plasma dello stesso donatore. Quindi il CIC può essere dosato sia su campioni di siero che di plasma.

Standardizzazione: I calibratori del Kit BÜHLMANN CIC-C1Q EIA sono stati calibrati verso la preparazione di riferimento delle IgG umane aggregate, che è stato preparato sotto la auspicio della OMS (Sezione Ginevra).

Sensibilità analitica: 0.58 $\mu\text{g Eq/ml}$. 20 duplicati del tampone di incubazione (reagente bianco) sono stati dosati in un'unica seduta. Sono state calcolate la media e la deviazione standard per i valori di assorbanza. La dose minima rilevabile dei complessi CIC è stata calcolata in 0.58 $\mu\text{g Eq/ml}$ aggiungendo due deviazioni standard all'assorbanza media del bianco reagente (tampone di incubazione) e intersecando questo valore con la curva standard ottenuta nella stessa seduta.

Sensibilità funzionale: <1 $\mu\text{g Eq/ml}$. Sono stati dosati 20 duplicati delle concentrazioni basse di CIC in un'unica seduta. La dose funzionale minima rilevabile (FLDD) è stata calcolata <1 $\mu\text{g Eq/ml}$ (cut-off intradosaggio CV = 10%).

Effetto gancio (Hook effect): Non è stato osservato nessun effetto gancio fino a 50'000 $\mu\text{g Eq/ml}$.

Comparazione di metodi: Una comparazione di campioni ($n=64$) di questo dosaggio ed un altro metodo approvato dall'FDA hanno presentato la seguente correlazione:

Sensibilità relativa	24/25 = 96%
Specificità relativa	38/39 = 97.4%
Accuratezza relativa	62/64 = 96.9%

VALORI DI CUT-OFF ATTESI

La frequenza del CIC nei sieri umani normali o nel plasma è stata determinata utilizzando campioni di sangue di donatori volontari (adulti uomini e donne di età compresa tra 18 e 70 anni). 192 campioni sono stati dosati secondo procedura ed in risultati sono presentati in Table 15, espressi in μg equivalente per ml ($\mu\text{g Eq/ml}$).

NOTA: I range di questi titoli devono essere utilizzati solo come linee guida. Si consiglia ad ogni laboratorio di stabilire i propri range attesi.

Cut-off proposto

Un totale di 10 valori molto elevati ($>$ media+3SD) dai risultati di 192 donatori sani apparentemente normali sono stati eliminati in tre cicli iterativi. Ciò ha provocato un valore di **cut-off teorico** (media + 2 SD) di **3.2 $\mu\text{g Eq/ml}$** .

Borderline e positivi

Per ragioni pratiche consigliamo di considerare i valori tra **3.2 e 5.0 $\mu\text{g Eq/ml}$** come **borderline** (zona grigia).

Valori superiori a **5.0 $\mu\text{g Eq/ml}$** devono essere considerati **positivi**.

Limitazioni generali dei range normali CIC: sono noti range elevati di CIC nel 10% dei donatori di sangue normali senza manifestazioni cliniche. (veri negativi al di fuori del range normale) (7,8). Ciò è in linea con i nostri risultati: 6 (3.1 %) dove 192 campioni di donatori normali erano positivi con il CIC ELISA e 14 (7.3 %) erano entro la zona grigia.

USO PREVISTO

El EIA BÜHLMANN CIC-C1Q ha sido diseñado para realizar la determinación diagnóstica *in vitro* cuantitativa de inmunocomplejos circulantes (ICC) en suero y plasma de pacientes con diversas enfermedades autoinmunes o relacionadas con ICC.

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

Los inmunocomplejos circulantes del suero o plasma del paciente y de los Calibradores y controles se incuban con C1q humana adsorbida en pocillos de microtitulación. Después de un paso de lavado se añade un conjugado (Proteína A) marcado con fosfatasa alcalina (FA), que se une a la región Fc de la IgG humana. Después de otro paso de lavado se pipetea el sustrato de enzima (*para*-nitrofenil-fosfato o pNFF), seguido de un paso de interrupción. La absorción se mide a 405 nm.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Microplaca Recubierta con C1q humana	12 x 8 pocillos	B-CIC-MP	Listo para usar
Sellador de placas	3 unidades		
Tampón de lavado concentrado (10x) con conservantes	1 botella 100 ml	B-CIC-WB	Diluir con 900 ml de agua desionizada
Tampón de incubación con conservantes	1 botella 100 ml	B-CIC-IB	Listo para usar
Calibradores A a E^{*)} IgG agregada en una matriz de tampón con conservantes	5 viales 1 ml	B-CIC-CASET	Listo para usar
Control bajo / alto^{**)} IgG agregada en una matriz de tampón con conservantes	2 viales 1 ml	B-CIC-CONSET	Listo para usar
Marcador enzimático FA conjugada con Proteína A en una matriz de tampón de proteínas con conservantes	1 vial 11 ml	B-CIC-EL	Listo para usar
Sustrato de pNFF	1 vial 11 ml	B-PNPP	Listo para usar
Solución de interrupción Hidróxido sódico 1 N	1 vial 11 ml	B-NAOH	Listo para usar Agente corrosivo

Tabla 9

^{*)} Los Calibradores A, B, C, D y E contienen 50, 20, 10, 4 y 1 µg de Equivalentes de IgG agregada por ml (µg Eq/ml), respectivamente.

^{**)} Los controles contienen cantidades específicas del lote de Equivalentes de IgG agregada por ml (µg Eq/ml). Consulte la ficha técnica de control de calidad adicional del kit para conocer las concentraciones efectivas.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Almacénese a 2-8°C excepto Calibradores y Controles , que deben almacenarse a -20°C o menos. No utilice el kit pasada la fecha de caducidad.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Microplaca	Guarde inmediatamente las tiras que no ha utilizado en la bolsa metalizada que contiene los sacos desecantes y vuelva a cerrarla completamente por toda la cremallera. Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Tampón de lavado	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Calibradores	Estable a -20°C hasta la fecha de caducidad. Para almacenamientos inferiores a 3 meses los calibradores y controles pueden almacenarse a 2-8°C.
Controles	
Tampón de incubación	
Marcador enzimático	
Solución sustrato	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Solución de interrupción	

Tabla 10

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

La microplaca, los calibradores y los controles de este kit contienen componentes de origen humano. Todas las unidades donadas de suero usadas en la preparación de los componentes del kit han sido analizadas por un método aprobado por la FDA, dando resultados negativos para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y para los anticuerpos del virus de la hepatitis C y VIH1/2 (virus de inmunodeficiencia humana 1/2). Aunque estos métodos son extremadamente exactos, no se garantiza que este material no pueda transmitir hepatitis o SIDA. *Por consiguiente, todas las muestras de pacientes y todos los componentes del kit deben ser manipulados como si fueran susceptibles de transmitir infecciones.* Todos los productos que contengan material de origen humano deben ser manipulados de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio tomando las precauciones adecuadas.

Solución sustrato y solución de interrupción: La solución sustrato contiene para-nitrofenil-fosfato (pNFF). La Solución de interrupción contiene hidróxido sódico 1N. Los dos reactivos pueden irritar los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Utilice ropa protectora adecuada, guantes y protección ocular. Después del contacto con los ojos o la piel lave inmediatamente con agua abundante.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables de 20 µl, 100 µl y 1000 µl.
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de muestra.
- Cilindro de 1000 ml para la dilución del tampón de lavado concentrado.
- Lavador de placas de microtitulación o botella flexible para el tampón de lavado.
- Papel secante.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 405 nm.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

El procedimiento requiere 50 µl de sangre para la determinación por duplicado. Recoja la sangre en tubos limpios, evite la hemólisis, mezcle girando al revés el tubo de la muestra varias veces y deje coagular durante 45 minutos a temperatura ambiente (18-28°C) protegido de la luz. Centrifugue a 1800 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-28°C) y recoja el suero.

No deben utilizarse muestras lipémicas, hemolíticas o ictericas en este ensayo. Se pueden evitar las muestras lipémicas pidiendo a los pacientes que no coman como mínimo durante las 12 horas anteriores a la toma de la muestra.

Las muestras pueden almacenarse a 2-8 °C hasta 7 días. Si las muestras han de almacenarse durante un período de tiempo más largo deben mantenerse a ≤-20°C.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Importante: deje que todos los reactivos alcancen **18-28°C antes de su uso.**

1. Diluya todas las muestras del paciente a 1:50 con tampón de incubación (p.ej. 20 µl de suero o plasma + 980 µl de tampón de incubación) y mézclelo bien. Deje las muestras diluidas durante 15 minutos a 18-28°C antes de pipetear en el paso 4c.
2. Prepare una placa con tiras suficientes para probar el número requerido de calibradores, controles y muestras. Retire las tiras sobrantes del soporte y guárdelas en la

bolsa metalizada junto con los sacos desecantes **sin demora**. Almacénalo refrigerado.

3. Lave dos veces los pocillos recubiertos utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
- 4^a. Pipetee 100 µl de tampón de incubación por duplicado en los pocillos A1+A2.
Pipetee 100 µl de calibrador A por duplicado en los pocillos B1+B2.
Pipetee 100 µl de calibrador B por duplicado en los pocillos C1+C2.
Pipetee 100 µl de calibrador C por duplicado en los pocillos D1+D2.
Pipetee 100 µl de calibrador D por duplicado en los pocillos E1+E2.
Pipetee 100 µl de calibrador E por duplicado en los pocillos F1+F2.
- 4b. Pipetee 100 µl del control bajo por duplicado en los pocillos G1+G2.
Pipetee 100 µl del control alto por duplicado en los pocillos H1+H2.
- 4c. Pipetee 100 µl de cada muestra diluida (01:50:00) en los pocillos subsiguientes.
5. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm e incube durante 1 hora ± 5 minutos a 18-28°C.
6. Retire y deseche el sellador de placas. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
7. Pipetee 100 µl de marcador enzimático en todos los pocillos.
8. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm e incube durante 30 minutos ± 5 minutos a 18-28°C.
9. Retire y deseche el sellador de placas. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
Importante: deje que la solución sustrato de pNFF alcance 18-28°C.
10. Pipetee 100 µl de la solución sustrato de pNFF en todos los pocillos.
11. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm, proteja la placa de la luz directa e incube durante 30 ± 5 minutos a 18-28 °C.
12. Pipetee 100 µl de solución de interrupción en todos los pocillos. Elimine las burbujas de aire con la punta de una pipeta. Continúe con el paso 13 al cabo de 30 minutos como máximo.
13. Lea la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de microtitulación.

RESULTADOS Y CÁLCULOS

Curva estándar

- Registre la absorbancia a 405 nm para cada pocillo del calibrador y del blanco.
- Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los promedios (= absorbancia media corregida).
- Represente la absorbancia (eje vertical) frente a la concentración de ICC en µg Eq/ml de los Calibradores (eje horizontal) utilizando un papel gráfico logarítmico.
- Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros.

Muestras y controles

- Registre la absorbancia a 405 nm para cada pocillo de las muestras y de los controles.
- Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los promedios (= absorbancia media corregida).
- Localice el valor de la absorbancia corregida de la muestra en el eje vertical, dibuje una línea horizontal que corte la curva estándar y lea la concentración de ICC (µg Eq/ml) en el eje horizontal.

Véase un ejemplo de resultados y curva estándar. *Estos resultados y curvas estándar se ofrecen únicamente con propósitos de demostración. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras que se ensaye.*

CONTROL DE CALIDAD

Es necesaria una completa comprensión de este prospecto para que el uso del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente este prospecto.

Dado que no hay suero de control para ICC disponible comercialmente, recomendamos el uso de una reserva de suero positivo para los controles de calidad internos.

Todos los controles deben encontrarse dentro de los límites de confianza establecidos. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos adicional.

La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) ajustes del lector de ELISA iii) fechas de caducidad de los reactivos iv) condiciones de almacenamiento e incubación v) la solución sustrato con pNFF debe ser incolora vi) pureza del agua.

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con este kit están optimizados para medir inmunocomplejos circulantes en suero o plasma humanos.
- La cantidad de inmunocomplejos circulantes debe utilizarse como un dato suplementario del que dispone el médico para establecer un diagnóstico.
- Los valores de titulación del suero o plasma dependen del método de ensayo y, en particular, de la especificidad y de los valores de corte establecidos con un método de ensayo. Los valores de titulación obtenidos con métodos de ensayo diferentes no pueden compararse directamente.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Precisión intra-ensayo (dentro de la prueba): 3.6%. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores obtenidos en una única prueba. Los valores se presentan en µg Eq/ml (véase Table 12)

Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 11.3%. La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 3 pares de valores obtenidos en 20 pruebas diferentes. Los valores se presentan en µg Eq/ml (véase Table 13).

Linealidad/paralelismo de dilución: 104.8%. Se diluyeron muestras de suero humano que contenían titulaciones bajas y altas de ICC con tampón de incubación y se ensayaron después según el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan en µg Eq/ml (véase Table 14).

Comparación plasma/suero: se diluyeron (1:50) muestras de suero y plasma humanos de 47 donantes con tampón de incubación y se ensayaron después según el procedimiento del ensayo. Todas las muestras de suero negativas (n=27) y dudosas (*borderline*) (n=10) fueron negativas o dudosas, respectivamente, cuando se midieron en plasma con EDTA. Lo mismo sucedió con plasma con heparina (n=20). Diez muestras de suero positivas mostraron una correlación muy alta (r=0,978) con las muestras de plasma del mismo donante. Por lo tanto, los ICC pueden probarse en muestras tanto de suero como de plasma.

Estandarización: los Calibradores del kit del EIA BÜHLMANN CIC-C1Q se calibraron frente a la preparación de referencia de IgG humana agregada que fue preparado bajo los auspicios de la OMS (Sección de Ginebra).

Sensibilidad analítica: 0,58 µg Eq/ml. Se ensayaron veinte duplicados de tampón de incubación (reactivo blanco) en una única prueba. Se calcularon la media y la desviación estándar de los valores de absorbancia. La dosis mínima detectable de ICC se calculó en 0,58 µg Eq/ml al añadir dos desviaciones estándar a la absorbancia media del reactivo blanco (tampón de incubación) y calculando la intersección de este valor con la curva estándar obtenida en la misma prueba.

Sensibilidad funcional: <1 µg Eq/ml. Se ensayaron veinte duplicados de concentraciones bajas de ICC en una única prueba. La dosis mínima detectable funcional (DMDF) se calculó en <1 µg Eq/ml (valor de corte de intra-ensayo CV = 10%).

Efecto hook: no se observó efecto hook hasta 50.000 µg Eq/ml.

Método de comparación: una comparación de muestras de este ensayo (n=64) y otro método comercial acreditado por la FDA mostró la siguiente correlación:

Sensibilidad relativa 24/25 = 96%

Especificidad relativa 38/39 = 97,4%

Precisión relativa 62/64 = 96,9%

VALORES DE CORTE (VALORES ESPERADOS)

Se determinó la frecuencia de ICC en suero o plasma humano normal utilizando muestras de sangre de donantes de sangre voluntarios asintomáticos (hombre y mujeres adultos de 18 a 70 años de edad). Se ensayaron 192 muestras según el procedimiento del ensayo y se obtuvieron los resultados que se muestran en Table 15, expresados en µg Equivalente por ml (µg Eq/ml).

NOTA: Estos rangos de titulación deben utilizarse únicamente como orientativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos esperados.

Titulación de corte propuesta

Se eliminó en tres ciclos iterativos un total de 10 valores muy elevados (> media+3DE) de los resultados de los 192 donantes de sangre con salud aparentemente normal. Esto produjo un **valor de corte** teórico (media + 2DE) de **3,2 µg Eq/ml**.

Dudosos y positivos

Por razones prácticas recomendamos que los valores entre **3,2 y 5,0 µg Eq/ml** se consideren **resultados dudosos** (zona gris).

Los valores superiores a **5,0 µg Eq/ml** deben considerarse **positivos**.

Limitaciones generales de los rangos normales de ICC: hasta un 10% de los donantes de sangre normales sin manifestaciones clínicas presentan rangos elevados de ICC (verdaderos negativos fuera del rango normal). Esto está de acuerdo con nuestros resultados: 6 (3,1 %) de las 192 muestras de donantes normales fueron positivas en el ELISA de ICC y 14 (7,3 %) estaban en la zona gris.

APPENDIX I

TABLES/ TABELLEN/ TABLES/ TABELLE/ TABLAS

Table 11: **Example of Results**

	Conc. (µg Eq/ml)	Abs. (OD)	Calc.Conc. (µg Eq/ml)	CV Conc (%)
Blank		0.123		
Blank		0.124		
Blank Avg.		0.124		
Cal A	50	1.464	50.26	
Cal A	50	1.454	49.73	
Cal A Avg.	50	1.459	50.00	0.74
Cal B	20	0.767	19.81	
Cal B	20	0.778	20.19	
Cal B Avg.	20	0.773	20.00	1.33
Cal C	10	0.455	9.94	
Cal C	10	0.459	10.06	
Cal C Avg.	10	0.457	10.00	0.87
Cal D	4	0.263	4.00	
Cal D	4	0.263	4.00	
Cal D Avg.	4	0.263	4.00	0.00
Cal E	1	0.157	1.01	
Cal E	1	0.156	0.99	
Cal E Avg.	1	0.157	1.00	1.42
Control low		0.142	0.82	
Control low		0.143	0.83	
Control low Avg.		0.143	0.83	1.20
Control high		1.162	30.78	
Control high		1.159	31.41	
Control high Avg.		1.161	31.09	1.40

Figure 1: **Example of Standard Curve**

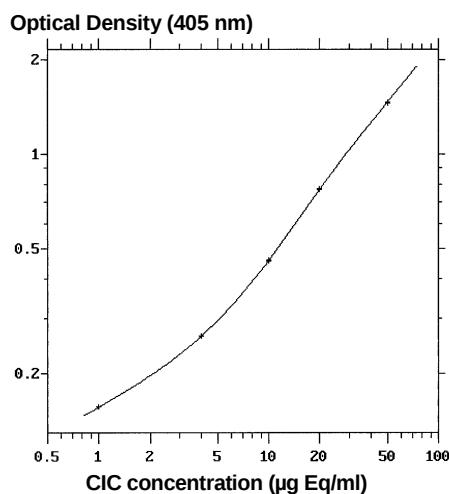


Table 12: Intra-Assay Precision (Within-Run)

Sample #	Mean	SD	CV (%)
1	11.6	0.71	6.13
2	19.0	0.70	3.66
3	19.2	0.38	1.98
4	22.5	0.59	2.65
Mean:			3.61

Table 14: Dilution Linearity/Parallelism

Sample #	Dilution	Observed	Expected	O/E (%)
13	1/ 50 100%	5.27		
	1/100 50%	3.19	2.64	121
	1/200 25%	1.49	1.32	113
	1/400 12.5%	0.84	0.66	127
14	1/ 50 100%	9.86		
	1/100 50%	4.83	4.93	98
	1/200 25%	2.41	2.47	98
	1/400 12.5%	1.13	1.23	91
15	1/ 50 100%	21.84		
	1/100 50%	11.96	10.92	110
	1/200 25%	5.15	5.46	94
	1/400 12.5%	2.49	2.73	91
Mean:				104.8

Table description: cf. "Results and Calculation" (page 3), "Performance Characteristics" (page 3) and "Cut-Off Values" (page 4).

Tabellenbeschreibung: siehe "Resultate" (Seite 5), "Leistungsmerkmale" (Seite 6) und "Normalbereich und Grenzwert" (Seite 6).

Explications relatives aux tableaux: voir "Résultats" (page 8), "Caractéristiques de Performance" (page 8) et "Valeurs seuil" (page 8).

Table 13: Inter-Assay Precision (Run-to-Run)

Sample	Mean	SD	CV (%)
5	9.2	1.1	12.0
6	14.6	1.8	12.6
7	29.4	2.7	9.2
Mean:			11.3 %

Table 15: Cut-Off Values

	Before Elimination	After Elimination
Total (n)	192	182
Median Value (µg Eq/ml)	1.25	1.19
Mean Value (µg Eq/ml)	1.68	1.50
SD (µg Eq/ml)	1.34	0.83
Lowest Value (µg Eq/ml)	0.52	0.52
Highest Value (µg Eq/ml)	8.9	4.14

Descrizione tavola: cf. "Risultati" (pagina 10), "Caratteristiche di Prestazione" (pagina 11) e "Valori Cut-off" (pagina 11).

Explicaciones relativas a las Tablas: ver "Resultados y Cálculos" (página 13), "Características de Eficiencia" (página 13) y "Valores de Corte" (página 14).

APPENDIX II REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ REFERENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

1. Van Hoeyveld E. & Bossuyt X.: *Evaluation of seven commercial ELISA kits compared with the C1q solid-phase binding RIA for detection of circulating immune complexes*. Clin Chem. **46**, 283-285 (2000).
2. Stanilova S.A. & Slavov E.S.: *Comparative Study of circulating immune complexes quantity detection by three assays – CIF-ELISA, C1q-ELISA and anti-C3 ELISA*. J Immunol Meth **253**, 13-21 (2001).
3. Nydegger, U.E.: *A place for soluble immune complexes in clinical immunology*. Immunol Today **6** (3) 80-82 (1985).
4. Hay, F.C. et al.: *Routine assay for the detection of immune complexes of known immunoglobulin class using solid phase C1q*. Clin. Exp. Immunol. **24**, 396-400 (1976).
5. Wehler, C. et al.: *The use of solid-phase C1q and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-IgG for the detection of immune complexes in human serum*. Molec. Immunol. **18**, 157-162 (1981).
6. Endo, Y. et al.: *An enzyme-linked immunoassay for the measurement of circulating immune complexes*. Ann. Clin. Biochem. **20**, 163-168 (1983).
7. Di Mario U. et al.: *The detection of circulating immune complexes in normal subjects using four different methods*. J Clin Lab Immunol **5** (2), 95-99 (1981).
8. Jans, H. et al.: *Circulating immune complexes in healthy persons*. Scand J Rheumatol **11**(4), 194-198 (1982).

APPENDIX III SHORT PROTOCOL

CIC-C1Q EIA

Precoated Microtiter Plate

↓ ↻ Wash 2 x

100 µl Incubation Buffer,
Standards, Controls, Plasma
or Serum Samples (1:50)

↓ ↻ Incubate 1 hour (± 5 min) at 18-28°C
on a plate rotator
Wash 3x

Add 100 µl Enzyme Label

↓ ↻ Incubate 30 min (± 5 min) at 18-28°C
on a plate rotator
Wash 3x

Add 100 µl pNPP Substrate

↓ ↻ Incubate 30 min (± 5 min) at 18-28°C
On a plate rotator

Add 100 µl Stop Solution

➡ Read absorbance at 405 nm (within 30 minutes)

TIME TO RESULT: 2 HOURS

Figure 2

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
	Upper limit of temperature Temperaturobergrenze Limite supérieure de température Limite superiore di temperatura Límite superior de temperatura
MP	Microtiterplate Mikrotiter-Platte Microplaque Micropiastra Microplaca

Symbol	Explanation
BUF WASH 10X	Wash Bufer Concentrate (10x) Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Concentré de tampon de lavage Tampone di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (x10)
BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone d'incubazione Tampón de incubación
CAL A - CAL E	Calibrator A - E Kalibrator A - E Calibrateur A - E Calibratore A - E Calibrador A - E
CONTROL L	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
CONTROL H	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
EL	Enzyme Label Enzym-Marker Marqueur enzymatique Marcato enzimatico Marcador enzimático
SUBS PNPP	pNPP Substrate pNPP-Substrat Substrat pNPP Substrato di pNPP Substrato de pNPP
SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada



Printing Date
2008-11-26