



anti-C1q Autoantibodies

ELISA

EK-AC1QA

96 tests

Revision date: 2010-02-19

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN anti-C1q Autoantibodies ELISA is intended for the quantitative *in vitro* diagnostic determination of anti-C1q autoantibodies in human serum or plasma (1-4).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Calibrators, controls, and patient sera or plasma containing anti-C1q autoantibodies are incubated with human C1q adsorbed onto microtiter wells. After a washing step, a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added, which binds to the human IgG. After a second washing step, the enzyme substrate (TMB) is added to the wells. Blue color develops in proportion to the amount of anti-C1q autoantibodies bound in the initial step. The reaction is terminated by the addition of stop solution and the color turns from blue to yellow. The absorbance is measured in a microtiter plate reader at a wavelength of 450 nm.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Microtiter Plate Precoated with human C1q	12 x 8 wells	B-AC1QA-MP	Ready to use
Plate Sealer	3 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10x) with preservatives	1 vial 100 ml	B-AC1QA-WB	Dilute with 900 ml of deionized water
Incubation Buffer with preservatives	1 vial 100 ml	B-AC1QA-IB	Ready to use
Calibrators A to D Human serum matrix with preservatives	4 vials 1 ml	B-AC1QA-CASET	Ready to use
Controls Low / High Human serum matrix with preservatives	2 vials 1 ml	B-AC1QA-CONSET	Ready to use
Enzyme Label Anti-human IgG-HRP conjugate, with preservatives	1 vial 11 ml	B-AC1QA-ELG	Ready to use
TMB Substrate TMB in Citrate buffer with H ₂ O ₂	1 vial 11 ml	B-TMB	Ready to use
Stop Solution 0.25 M sulfuric acid	1 vial 11 ml	B-STTS	Ready to use Corrosive agent

Table 1

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Store at 2-8°C. Do not use past kit expiration date	
Opened / Reconstituted Reagents	
Microtiter Plate	Reseal 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 for up to 3 months at 2-8°C after dilution.
Calibrators	Store at 2-8°C until expiration date.
Controls	
Incubation Buffer	
Enzyme Label	
TMB Substrate	
Stop Solution	Stable at 18-28°C until expiration date marked on the vial.

Table 2

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The Microtiter strips, 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 antibodies, 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 (GLP) using appropriate precautions.

Substrate and Stop Solution: The TMB substrate (B-TMB) contains tetramethylbenzidine (TMB), hydrogen peroxide (H₂O₂) and dimethylformamide. The Stop Solution (B-STTS) contains sulfuric acid. Each of those reagents is irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothing. After contact with eyes or skin wash with plenty of water.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 10 µl, 100 µl and 1000 µl precision pipettes with disposable tips.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 ml cylinder for the dilution of the Wash Buffer.
- Microtiter plate washer or squeeze bottle for Wash Buffer.
- Microtiter plate rotator.
- Blotting paper.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 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 30 days. If samples are stored for a longer period of time they are stable at -20°C for at least 6 months. NOTE: Do not store diluted samples!

PROCEDURAL NOTES

- The enzyme used as the label is inactivated by oxygen and is highly sensitive to sodium azide, thimerosal, hypochlorous acid and aromatic chlorohydrocarbons often found in laboratory water supplies. Therefore, use only deionized high quality water.
- It is recommended to assay each control and specimen in duplicate each time a test is performed. Since conditions vary from assay to assay, a new standard curve must be generated each time a new assay is performed. Vertical alignment is recommended.
- If the initial concentration of an unknown sample reads greater than the highest Calibrator (Calibrator A), the sample should be further diluted with Incubation Buffer and assayed again according to the assay procedure. The resulting dilution factor must be accounted for the final calculations.

ASSAY PROCEDURE

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

IF THE ASSAY IS PERFORMED AT HIGHER TEMPERATURES THAN 28°C THE RESULTS MAY BE WRONG. **THE BEST ASSAY TEMPERATURE IS BETWEEN 20 AND 25°C**

1. Dilute all patient samples 1:50 with Incubation Buffer (e.g. 10 µl of serum or plasma + 490 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 reseal them in the foil pouch together with the desiccant packs **without delay** and 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 A1+A2.
Pipet 100 µl of Calibrator A in duplicate into B1+B2.
Pipet 100 µl of Calibrator B in duplicate into C1+C2.
Pipet 100 µl of Calibrator C in duplicate into D1+D2.
Pipet 100 µl of Calibrator D in duplicate into E1+E2.
- 4b. Pipet 100 µl of the Control Low in duplicate into F1+F2.
Pipet 100 µl of the Control High in duplicate into G1+G2.
- 4c. Pipet 100 µl of each diluted sample in duplicate into the subsequent wells.
1. 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 into 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 $\pm$ 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.
10. Pipet 100 µl of the TMB Substrate into 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 450 nm in a microtiter plate reader.

LIMITATIONS

- The reagents supplied with this kit are optimized to measure anti-C1q autoantibodies in human serum or plasma.
- Anti-C1q antibody titer values 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.

RESULTS AND CALCULATION

Standard Curve: Record the absorbance at 450 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 autoantibody titer of the Calibrator (horizontal axis) using lin/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 450 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 autoantibody titer (units/ml) from the horizontal axis.

See Table 11 and Figure 1 for typical data (results and standard curve). These results and standard curve are provided 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 anti-C1q autoantibodies commercially available, we recommend using a positive and a negative serum pool for internal quality control.

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the QC data sheet added to the kit.

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) TMB Substrate should be colorless vi) purity of water.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision (Within-Run): 5.0%. The intra-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values from each sample in a single run. The values are presented in Table 12 as units/ml of anti-C1q autoantibodies.

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 10.8 %. The inter-assay precision was calculated from the results of 5 pairs of values in 20 different runs. The values are presented in Table 13 as units/ml of anti-C1q autoantibodies.

Sensitivity: 1.0 unit/ml. Twenty duplicates of incubation buffer (=blank) were assayed in a single run. Mean and standard deviation were calculated for the absorbance values. The minimum detectable dose was calculated for the absorbance values. The minimal detectable dose of anti-C1q autoantibodies was calculated to be 1.0 unit/ml by adding two standard deviations to the mean absorbance and intersecting this value with the standard curve obtained in the same run.

Dilution Linearity/Parallelism: 105.9%. Three human serum samples showing high titers of anti-C1q autoantibodies were diluted with Incubation Buffer and subsequently assayed according to the assay procedure. The values are presented in Table 14 as units/ml of anti-C1q autoantibodies.

EXPECTED VALUES AND CUT-OFF

The frequency of anti-C1q autoantibodies in normal human sera was determined using blood samples from apparently healthy asymptomatic volunteer blood donors (adult men and women at the age of 18-70 years). 220 samples were assayed according to the assay procedure. The values are shown in

Table 15 as units/ml of anti-C1q autoantibodies. *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: 15 units/ml. A total of 20 elevated values > mean+3SD were eliminated in four iterative cycles. This results in a theoretical cut-off value of 18.2 units/ml. For practical reasons, we recommend to use a cut-off value of 15 units/ml. Samples lower than 15 units/ml should be regarded as negative.

Standardization: The Calibrators of the anti-C1q autoantibodies ELISA kit are calibrated against an internal reference sample. The reference sample consists of a high titer plasmapheresis of a clinically well defined Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis Syndrome (HUVS) patient.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN anti-C1q Autoantibodies ELISA Test wird gebraucht für die quantitative *in vitro* diagnostische Bestimmung von anti-C1q Autoantikörper aus humanem Serum oder Plasma (1-4).

PRINZIP DER METHODE

Anti-C1q Antikörper-enthaltende Kalibratoren, Kontrollen und Serum- oder Plasmaproben werden in der mit humanem C1q beschichteten Mikrotiter-Platte inkubiert. Nach dem Waschen ungebundener Substanzen, werden Meerrettich-peroxidase (HRP)-markierte Antikörper (Ak) gegen humanes IgG der Platte zugegeben. Nach einem zweiten Waschschriff (entfernen ungebundener Antikörper), wird das Tetramethylbenzidin-enthaltende TMB-Substrat zu der Platte zugegeben. Die Enzymreaktion bewirkt eine Blaufärbung, welche durch Zugabe der sauren Stopp-Lösung (H₂SO₄) beendet wird und einen Farbumschlag (gelb) bewirkt. Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung, ist direkt proportional zur Konzentration der anti-C1q Autoantikörper in den Proben.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Mikrotiter-Platte Beschichtet mit humanem C1q	8 x 12	B-AC1QA-MP	gebrauchsfertig
Abdeckfolien	3 Stück		
Waschpuffer Konzentrat (10x) Mit Konservierungsstoffen	1 Flasche 100 ml	B-AC1QA-WB	Mit 900 ml deionisiertem H ₂ O verdünnen
Inkubations-Puffer Mit Konservierungsstoffen	1 Flasche 100 ml	B-AC1QA-IB	gebrauchsfertig
Kalibratoren A bis D Humane Serum-Matrix mit Konservierungsstoffen	4 Flaschen 1 ml	B-AC1QA-CASET	gebrauchsfertig
Kontrolle tief / hoch Humane Serum-Matrix mit Konservierungsstoffen	2 Flaschen 1 ml	B-AC1QA-CONSET	gebrauchsfertig
Enzym-Marker anti-human IgG Ak mit HRP markiert und Konservierungsstoffen	1 Flasche 11 ml	B-AC1QA-ELG	gebrauchsfertig
TMB-Substrat Zitrat-gepufferte TMB Lösung mit H ₂ O ₂	1 Flasche 11 ml	B-TMB	gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0.25 M H ₂ SO ₄	1 Flasche 11 ml	B-STs	gebrauchsfertig Korrosiv

Table 3

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C lagern.	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Mikrotiter-Platte	Ungebrauchte Streifen sofort in die mit Dessikator versetzte Packung zurückbringen. Packung verschliessen. Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C lagern.
Wasch-Puffer	Bis zu 3 Monate nach der Verdünnung bei 2-8°C lagern.
Inkubations-Puffer	Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C lagern.
Kalibratoren	
Kontrollen	
Enzym-Marker	
TMB-Substrat	
Stopp-Lösung	Bis zum Verfallsdatum bei 18-28°C lagern.

Table 4

WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Mikrotiter-Platte, Kalibratoren und Kontrollen dieses Testes enthalten Komponenten menschlicher Herkunft. Jedes einzelne Spenderserum wurde durch eine FDA genehmigte Methode auf Antikörper gegen 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 (GLP) verarbeitet werden.

Substrat- und Stopp-Lösung; Das TMB-Substrat (B-TMB) enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Dimethylformamide. Die Stopp-Lösung (B-STs) enthält Schwefelsäure (H₂SO₄). Jedes dieser Reagenzien reizt die Augen, die Haut und die Schleimhautmembranen. Berührung mit den Augen, der Haut und die 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 mit Einwegspitzen für 10 µl, 100 µl und 1000 µl.
- Polystyren oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Vorbereitung der Verdünnungsproben.
- 1000 ml Zylinder zur Verdünnung des Waschpuffers.
- Microtiter-Platten-Waschgerät oder Spritzflasche für Waschpuffer.
- Saugfähiges Papier.
- Microtiter-Platten-Schüttler.
- Microtiter-Platten-Photometer mit optischem Filter (450 nm).

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Dieser Test benötigt 50 µl Blut pro Doppelbestimmung. Die Blutproben in den entsprechenden Röhrchen sammeln, Hämolyse vermeiden, 45 Minuten bei Raumtemperatur (18-28°C), vor Licht geschützt, gerinnen lassen, 15 Minuten lang 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 30 Tage bei 2-8°C gelagert werden. Proben sind bei -20°C mindestens 6 Monaten stabil. HINWEIS: Verdünnte Proben nicht aufbewahren.

TECHNISCHE HINWEISE

- Das als Marker gebrauchte Enzym (HRP) wird durch Sauerstoff inaktiviert und ist sehr empfindlich gegen Natriumazid, Thimerosal, Hypochlorsäure und aromatischen chlorierten Kohlenwasserstoffe, die oft im Laborwasser vorkommen können. Daher sollte nur deionisiertes oder destilliertes Wasser hoher Qualität gebraucht werden.
- Für jeden Testansatz wird empfohlen die Kontrollen und Kalibratoren in Doppelmessungen zu bestimmen. Da sich die Bedingungen bei jedem Testansatz unterscheiden, muss jedesmal eine neue Eichkurve neu bestimmt werden. Die Erhebung der vertikalen Ausrichtung (vertical alignment) wird empfohlen.
- Falls die Anfangskonzentration einer unbekannten Probe höher als die des höheren Kalibrators (Kalibrator A) ist, sollte die Probe mit Inkubationspuffer weiter verdünnt werden und nochmals gemäss dem Standardprotokoll bestimmt werden. Der resultierende Verdünnungsfaktor muss in der Endkonzentrationsberechnung berücksichtigt werden.

ARBEITSANLEITUNG

Kit-Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-28°C) bringen.

DIE TESTDURCHFÜHRUNG BEI TEMPERATUREN HÖHER ALS 28°C KANN ZU FALSCHEN ERGEBNISSEN FÜHREN. DIE

OPTIMALE TESTDURCHFÜHRUNGSTEMPERATUR LIEGT BEI 20 - 25°C

1. Patientenproben mit Inkubationspuffer 1:50 verdünnen (z.B. 10 µl Serum + 490 µl Inkubationspuffer) und gut mischen. Verdünnte Proben vor dem Gebrauch (4c) 15 Minuten lang bei 18-28°C stehen lassen.
2. Eine Mikrotiter-Platte mit ausreichend Streifen für das Testen der gewünschten Kalibratoren, Kontrollen und Proben vorbereiten. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und **unverzüglich** mit dem Dessikator verpacken und gekühlt lagern.
3. Mikroküvetten zweimal mit mindestens 300 µl Waschpuffer waschen. Waschpuffer dekantieren und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
- 4a. Zweimal 100 µl Inkubation-Puffer in A1+A2 pipettieren.
- 4b. Zweimal 100 µl Kalibrator A in B1+B2 pipettieren.
Zweimal 100 µl Kalibrator B in C1+C2 pipettieren.
Zweimal 100 µl Kalibrator C in D1+D2 pipettieren.
Zweimal 100 µl Kalibrator D in E1+E2 pipettieren.
- 4c. Zweimal 100 µl Kontrolle tief in F1+F2 pipettieren.
Zweimal 100 µl Kontrolle hoch in G1+G2 pipettieren.
- 4d. Zweimal 100 µl der 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, die Mikroküvetten entleeren und dreimal mit jeweils mindestens 300 µl Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
7. 100 µl Enzym-Marker 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, die Mikroküvetten entleeren und dreimal mit jeweils mindestens 300 µl Waschpuffer

waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

10. 100 µl TMB-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 Luftblässchen mit Pipettenspitzen entfernen.
13. Optische Dichte bei 450 nm innerhalb der nächsten 30 Minuten messen.

RESULTATE

Eichkurve: Optische Dichte aller mit Kalibrator oder Blank gefüllten Mikroküvetten bei 450 nm messen.

- Zur Ermittlung der Netto-Absorptionsmittelwerte wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Blankes von demjenigen der Kalibratoren subtrahiert.
- Netto-Absorptionsmittelwert (Vertikalachse) gegen die Autoantikörpertiter der Kalibratoren (Horizontalachse) auf einem semi-logarithmischen (lin/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 450 nm messen.

- Zur Ermittlung der Netto-Absorptionsmittelwerte wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Blankes von demjenigen der Proben und Kontrollen subtrahiert.
- Anti-C1q Konzentration der Proben und Kontrollen in Einheiten/ml (units/ml) aus der Eichkurve lesen, indem der Netto-Absorptionsmittelwert auf der Eichkurve aufgetragen wird und den entsprechenden Anti-C1q Antikörper Titer (in units/ml) aus der Horizontalachse gelesen wird.

Siehe Table 11 mit Figure 1 für ein Beispiel von typischen 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 strikte Einhaltung der Arbeitsanleitung. Da es kein kommerziell erhältliches Kontrollenserum für anti-C1q Autoantikörper gibt, wird empfohlen, positive und negative Serumproben (Pool) als interne Qualitätskontrolle anzuwenden.

Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem beigelegten QC 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 TMB Substratlösung sollte farblos sein, vi) Wasserreinheit.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die mit dem Kit gelieferten Reagenzien wurden zur Messung von anti-C1q Antikörper im humanem Serum oder Plasma optimiert.
- Anti-C1q Autoantikörper-Titer sollte dem Arzt als zusätzliche Informationsquelle zur Diagnosefindung dienen.
- Die Serum- oder Plasmatiter sind abhängig von der verwendeten Methode, besonders von der Spezifität und den festgelegten Cut-Off Werten und daher nicht direkt untereinander vergleichbar.

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Präzision (Within-Run): 5.0%. Die intra-assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung jeder Probe im gleichen Ansatz. Die Resultate sind in Table 12 in Anti-C1q Antikörper Einheiten/ml (units/ml) angegeben.

Inter-Assay Präzision (Run-to-Run): 10.8%. Die inter-assay Präzision wurde bestimmt durch die 5-fache Doppelmessung in 20 verschiedenen Ansätzen. Die Resultate sind in Table 13 in Anti-C1q Antikörper Einheiten/ml angegeben.

Empfindlichkeit: 1 Einheit/ml. 20 Doppelmessungen mit Inkubationspuffer (= Blank) wurden in einem einzigen Testansatz gemessen. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Absorptionwerte wurde berechnet. Die minimal detektierbare Menge an anti-C1q Antikörper wurde als **1.0 Einheit/ml** bestimmt, indem zwei Standardabweichungen zum Absorptionsmittelwert addiert wurden und den dazu entsprechenden Titer auf der im gleichen Testansatz erhaltene Eichkurve abgelesen wurde.

Verdünnungslinearität: 105.9%. Drei Serumproben (Nr. 12 bis 14) mit einem erhöhten Spiegel an anti-C1q Autoantikörper wurde mit Inkubationspuffer verdünnt und gemäss der Arbeitsanleitung getestet. Die erhaltenen Werte sind in Table 14 in Anti-C1q Antikörper Einheiten/ml angegeben.

NORMALBEREICH UND GRENZWERTE (CUT-OFF)

Das Vorkommen von anti-C1q Autoantikörper im normalen Humanserum wurde mit Blutproben von gesunden, asymptomatischen Blutspendern (männliche und weibliche Erwachsene im Alter von 18 zu 70 Jahren) ermittelt. 220 Proben wurden entsprechend der Arbeitsanleitung getestet und die in

Table 15 angegebenen Ergebnisse (Anti-C1q Antikörper Einheiten/ml) erhalten. *HINWEIS: Der angegebene Normalbereich sollte nur als Richtlinie dienen. Es wird empfohlen, dass jedes Labor eigene Normalbereiche seiner Patientenpopulation ermittelt.*

Vorgeschlagener Grenzwert (Cut-Off): 15 Units/ml. Nach der Eliminierung von insgesamt 20 Ausreissern ($>\text{Mittelwert} + 3 \text{ SD}$) aus den getesteten Proben durch vier iterative Zyklen, errechnet sich ein theoretischer Grenzwert ($\text{Mittelwert} + 2\text{Standardabweichungen}$) von 18.2 Units/ml. Aus praktischen Gründen empfehlen wir einen Grenzwert von **15 Units/ml** zu wählen. Proben unter 15 Units/ml sollten als negativ betrachtet werden.

Standardisierung: Die Kalibratoren des anti-C1q Autoantikörper ELISA's wurden gegen eine interne Referenz, aus einer hoch Titer Plasmapherese eines Patienten mit klinisch gut definiertem Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis Syndrome (HUVS) kalibriert.

FRANCAIS

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse BÜHLMANN anti-C1q Autoantibodies ELISA a été conçue pour la détermination diagnostique quantitative *in vitro* des auto-anticorps anti-C1q dans le sérum ou le plasma humains (1-4).

PRINCIPE DU DOSAGE

Les calibrateurs, contrôles et échantillons de patients contenant les auto-anticorps anti-C1q sont incubés dans les puits d'une microplaque coatée de C1q humain. Après lavage, le marqueur, composé d'anticorps (Ac) dirigés contre les IgG humaines et conjugué à la peroxydase de raifort (HRP), est ajouté. Le substrat de la HRP (tétraméthylebenzidine ou TMB) est ajouté dans les puits après un deuxième lavage. Une coloration bleue se développe, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'auto-anticorps anti-C1q initialement capturés par le C1q fixé à la microplaque. La réaction est terminée par l'addition d'une solution stop acide qui provoque un changement de couleur du bleu au jaune. Le titre d'autoanticorps anti-C1q est déterminé par la mesure de l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Microplaque coatée de C1q humain	12 x 8 puits	B-AC1QA-MP	Prête à l'emploi
Films adhésifs	3 pièces		
Tampon de lavage concentré (10x) avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-AC1QA-WB	A reconstituer avec 900 ml d'eau déionisée
Tampon d'incubation avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-AC1QA-IB	Prêt à l'emploi
Calibrateurs A à D matrice sérique humaine avec conservateurs	4 flacons 1 ml	B-AC1QA-CASET	Prêts à l'emploi
Contrôles bas et élevé matrice sérique humaine avec conservateurs	2 flacons 1 ml	B-AC1QA-CONSET	Prêts à l'emploi
Marqueur enzymatique Ac anti-IgG humain, conjugué à la HRP avec conservateurs	1 flacon 11 ml	B-AC1QA-ELG	Prêt à l'emploi
Substrat TMB TMB dans un tampon citrate avec H ₂ O ₂	1 flacon 11 ml	B-TMB	Prêt à l'emploi
Solution stop acide sulfurique 0.25 M	1 flacon 11 ml	B-STs	Prête à l'emploi Corrosif

Table 5

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts/ non entamés
Stables à 2-8°C. Ne pas utiliser après la date de péremption.

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	Stable durant 3 mois à 2-8°C après dilution.
Calibrateurs	Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.
Contrôles	
Tampon d'incubation	
Marqueur enzymatique	
Substrat TMB	Stable à 18-28°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.
Solution stop	

Table 6

RECOMMANDATIONS ET PRECAUTION D'EMPLOI

Les barrettes de la microplaque, calibrateurs et 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-VHC 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 (GLP) en respectant les précautions d'usage.

Substrat TMB et Solution stop: Le substrat TMB (B-TMB) contient de la tétraméthylbenzidine (TMB), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du diméthylfomamide. La Solution stop (B-STs) contient de l'acide sulfurique. Ces substances irritent les yeux, la peau ainsi que les muqueuses. Eviter par conséquent tout contact avec les yeux, la peau et les habits. En cas de contact accidentel avec les yeux ou la peau, il faut immédiatement rincer à grande eau.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 10 µl, 100 et 1000 µl.
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène pour la préparation des dilutions d'échantillons.
- Eprouvette 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 450 nm.

PRELEVEMENT, PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

La procédure requiert 50 µl de sang par dosage effectué en duplicata. Prélever le sang dans des tubes vides prévus à cet effet en évitant l'hémolyse. Homogénéiser en inversant le tube plusieurs fois et laisser reposer le sang, à l'abri de la lumière durant 45 minutes à 18-28°C. Centrifuger durant 15 minutes à 1800 x g et à une température de 18-28°C.

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.

Conserver les échantillons à 2-8°C durant 30 jours ou à $\leq -20^\circ\text{C}$ durant 6 mois. REMARQUE : Ne pas conserver d'échantillon dilué.

REMARQUES TECHNIQUES

- L'enzyme (HRP) utilisé comme marqueur est inactivé par l'oxygène et est hautement sensible à l'azoture de sodium, au thimérosal, à l'acide hypochloreux, ainsi qu'aux hydrocarbures chlorés couramment rencontrés dans l'eau utilisée en laboratoire. N'utiliser par conséquent que de l'eau déionisée ou distillée de haute qualité.
- Il est recommandé de mesurer chaque contrôle et échantillon en duplicata à chaque fois qu'un dosage est effectué. Comme les conditions varient d'essai à essai, une courbe d'étalonnage doit être établie pour chaque nouveau dosage. L'alignement vertical est recommandé.

- Si la concentration initiale d'un échantillon présente un signal plus élevé que le calibrateur le plus haut (calibrateur A), l'échantillon doit être dilué à l'aide du tampon d'incubation et dosé à nouveau selon la procédure standard. Le facteur de dilution doit être pris en compte pour le calcul de la concentration effective.

PROCEDURE

Porter les réactifs à une température ambiante (18-28°C) avant utilisation.

LES RESULTATS PEUVENT ETRE ERRONES SI LE DOSAGE EST EFFECTUE A DES TEMPERATURES PLUS HAUTES QUE 28°C.

LA MEILLEURE TEMPERATURE EST SITUEE ENTRE 20 ET 25°C.

1. Diluer au 1:50 tous les échantillons avec le tampon d'incubation (par ex., 10 µl de sérum ou de plasma + 490 µl de tampon d'Incubation). Bien mélanger et incubé à 18-28°C durant 15 minutes.
2. Préparer une microplaque avec suffisamment de puits pour recevoir tous les calibrateurs, contrôles et échantillons nécessaires. Retirer les barrettes en surplus 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 frapper sèchement 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.
- 4b. Distribuer 100 µl de contrôle bas en double dans les puits F1 et F2.
Distribuer 100 µl de contrôle élevé en double dans les puits G1 et G2.
- 4c. Distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué en double dans les puits suivants.
5. Couvrir la microplaque à l'aide d'un film adhésif fourni et incubé à 18-28°C pendant 1 heure (± 5 minutes) sur un agitateur de microplaque réglé à 400-600 rpm.
6. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver chaque puits avec trois fois ≥ 300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en frappant sèchement la microplaque sur du papier absorbant.
7. Ajouter 100 µl de marqueur enzymatique dans tous les puits.
8. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incubé à 18-28°C durant 30 (± 5) minutes à 400-600 rpm sur un agitateur de microplaques.
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 frappant sèchement la microplaque sur du papier absorbant.
10. Ajouter 100 µl de substrat TMB dans chaque puits.
11. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incubé avec agitation à 400-600 rpm pendant 30 (± 5) minutes à 18-28°C. Protéger la microplaque de la lumière directe.
12. Ajouter 100 µl de solution stop dans chaque puits. Eliminer les bulles d'air à l'aide d'une pointe de pipette puis passer à l'étape 13 durant les 30 minutes suivantes.

13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

LIMITATIONS

- Les réactifs fournis dans cette trousse sont optimisés pour le dosage des auto-anticorps anti-C1q du sérum ou du plasma humain.
- Les titres d'anticorps anti-C1q devraient être utilisés comme données supplémentaires à l'établissement d'un diagnostic par le médecin.
- La valeur des titres sériques dépend de la méthode de dosage utilisée, particulièrement de la spécificité et de la valeur seuil établies pour cette même méthode. Les titres obtenus au moyen de méthodes différentes ne peuvent donc être comparés directement.

RESULTATS ET CALCULS

Courbe d'étalonnage : Mesurer l'absorbance à 450 nm de chaque puits contenant un calibrateur ou blanc.

- Calculer la moyenne des deux valeurs d'absorbance obtenues, soustraire la moyenne des blancs et noter les valeurs calculées d'absorption moyenne corrigée.
- Reporter l'absorbance (axe vertical) contre le titre d'auto-anticorps des calibrateurs (axe horizontal) sur un papier millimétré semi-logarithmique (lin/log).

Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme de régression à quatre paramètres.

Echantillons et contrôles : esurer l'absorbance à 450 nm de chaque échantillon et de chaque contrôle.

1. Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues, soustraire la moyenne des blancs et enregistrer les valeurs d'absorption moyenne nette.
2. Reporter la valeur d'absorbance nette de l'échantillon sur l'axe vertical de la courbe d'étalonnage. Reporter l'absorbance nette de l'échantillon sur la courbe d'étalonnage et lire le titre correspondant d'auto-anticorps (units/ml) sur l'axe horizontal.

Voir Table 11 et Figure 1 pour des exemples de résultats et de courbes d'étalonnage typiquement obtenus. *Ces résultats et courbes 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 du 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 auto-anticorps anti-C1q commercialement disponible, nous recommandons l'utilisation d'un pool de sérums positifs et négatifs comme référence interne de contrôle de qualité.

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 et des valeurs des contrôles devrait être comprise 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 mesure de température et de temps, ii) calibration des instruments, iii) date de péremption des réactifs, iv) conditions de stockage et d'incubation, v) le substrat TMB devrait être incolore, vi) pureté de l'eau.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision intra-essai : 5.0%. La précision intra-essai a été calculée à partir des mesures de 20 duplicatas de chaque échantillon lors d'un seul et même essai. Les résultats obtenus sont indiqués en unités d'auto-anticorps anti-C1q par millilitre (units/ml) sous Table 12.

Précision inter-essai : 10.8%. La précision inter-essai a été calculée à partir des résultats de 5 duplicatas de chaque échantillon lors de 20 essais différents. Les résultats obtenus sont indiqués en unités d'auto-anticorps anti-C1q par millilitre (units/ml) sous Table 13.

Sensibilité : 1 unit/ml. Vingt duplicatas du tampon d'incubation (Blanc) ont été mesurés lors d'un seul et même essai. La moyenne ainsi que la déviation standard de l'absorbance ont été calculées. La quantité détectable minimale obtenue est égale à 1 unit/ml en ajoutant deux déviations standard à l'absorbance moyenne puis en lisant le titre à l'aide de la courbe d'étalonnage établie lors du même essai.

Parallélisme/linéarité de dilution: 105.9%. Trois échantillons de sérum humain (No. 12 à 14) présentant des titres d'autoanticorps anti-C1q élevés ont été dilués avec le tampon d'incubation puis mesurés selon la procédure standard. Les résultats obtenus sont indiqués en unités d'auto-anticorps anti-C1q par millilitre (units/ml) sous Table 14.

VALEURS SEUIL (VALEURS ATTENDUES)

Le titre d'auto-anticorps anti-C1q dans le sérum humain normal a été déterminé à partir de sang de donneurs volontaires asymptomatiques (hommes et femmes adultes entre 18 et 70 ans). 220 échantillons ont été mesurés selon la procédure standard. Les résultats obtenus sont indiqués en unités d'auto-anticorps anti-C1q par millilitre (unités/ml) 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 : 15 units/ml. Un total de 20 échantillons relativement élevées ($>$ moyenne + 3 SD) ont été éliminés des 220 mesures par quatre cycles itératifs. Une valeur seuil théorique de 18.2 unités/ml a été calculée. Pour des raisons pratiques, nous recommandons d'utiliser une valeur seuil (cut-off) de 15 unités/ml. Les échantillons avec des taux inférieurs à 15 units/ml d'auto-anticorps anti-C1q devraient être considérés comme étant négatifs.

Standardisation : Les calibrateurs de la trousse anti-C1q autoantibodies ELISA sont calibrés contre un pool de référence interne. Le pool de référence interne est constitué d'un échantillon à titre élevé d'un patient cliniquement bien défini de « Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis Syndrome » (HUVS), obtenu par plasmaphérèse.

USO

Il dosaggio autoanticorpi BÜHLMANN anti-C1q ELISA è un dosaggio per la determinazione quantitativa *in vitro* degli autoanticorpi anti-C1q nel siero o plasma umani (1-4).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

I calibratori, controlli e campioni di siero o plasma contenenti autoanticorpi anti-C1q vengono incubati con C1q umano adeso ai pozzetti della micropiastra. Dopo il lavaggio, viene aggiunto un coniugato marcato con perossidasi di rafano (HRP), che si lega alle IgG umane. Dopo una seconda incubazione, ai pozzetti, viene aggiunto substrato enzimatico (TMB). Si ha lo sviluppo di una colorazione blu proporzionale al quantitativo di autoanticorpi anti-C1q legati nel passaggio iniziale. La reazione ha termine con l'aggiunta della soluzione stoppante ed il colore cambia da blu a giallo. L'assorbanza viene misurata in un lettore di micropiastre alla lunghezza d'onda di 450 nm.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Micropiastra precoattati con C1q umano	12 x 8 pozzetti	B-AC1QA-MP	Pronto all'uso
Foglio sigillante per la Micropiastra	3 fogli		
Tampone di lavaggio concentrato (10X) con conservanti	1 fialone 100 ml	B-AC1QA-WB	Diluire con 900 ml d'acqua deionizzata
Tampone d'incubazione con conservanti	1 fialone 100 ml	B-AC1QA-IB	Pronto all'uso
Calibratore A a D siero umano con conservanti	4 fialoni 1 ml	B-AC1QA-CASET	Pronto all'uso
Controllo basso ed alto siero umano con conservanti	2 fialoni 1 ml	B-AC1QA-CONSET	Pronto all'uso
Marcato enzimatico anti-umano IgG coniugato con HRP, con conservanti	1 fialone 11 ml	B-AC1QA-ELG	Pronto all'uso
Substrato TMB TMB in tampone citrato con H ₂ O ₂	1 fialone 11 ml	B-TMB	Pronto all'uso
Soluzione stoppante 0.25 M di acido solforico	1 fialone 11 ml	B-STTS	Pronto all'uso Agente corrosivo

Table 7

CONSERVAZIONE ED EMI-VITA DEI REAGENTI

Reagenti Sigillati	
Conservare a 2-8°C. Non utilizzare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.	
Reagenti Aperti/ Ricostituiti	
Micropiastra	Riporre le strip non utilizzate immediatamente nella busta che contiene il desiccante e risigillare completamente chiudendo la zip. Conservare fino a 2 mesi a 2-8°C.
Tampone di lavaggio	Conservare fino a 3 mesi a 2-8°C.
Calibratori	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza.
Controlli	
Tampone d'incubazione	
Marcato enzimatico	
Substrato di TMB	
Soluzione stoppante	Conservare a 18-28°C fino alla data di scadenza.

Table 8

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Le strip, i calibratori ed i controlli di questo kit contengono componenti di origine umana. Ciascun campione utilizzato nella preparazione dei componenti del kit è stato testato con un metodo approvato dall'FDA e trovato negativo per

l'Antigene di Superficie dell'Epatite B, per l'HCV e per gli anticorpi anti-HIV1/2. Benché questi metodi siano molto accurati, non esiste nessuna garanzia che questo materiale non possa trasmettere Epatite o AIDS. *Quindi, tutti i campioni dei pazienti ed i componenti del kit devono essere manipolati come se potessero trasmettere agenti infettivi.* Tutti i prodotti contenenti materiale di origine umana devono essere manipolati secondo quanto previsto dallr GLP (Good Laboratory Practises) utilizzando le precauzioni idonee.

Substrato e soluzione stoppante: Il substrato TMB (B-TMB) contiene tetrametilbenzidina (TMB), Perossido di Idrogeno (H₂O₂) e Dimetilformamide. La soluzione stoppante (B-STTS) contiene acido solforico. Ciascuno di questi reagenti è irritante per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con occhi, pelle ed indumenti. Dopo il contatto con gli occhi o con la pelle lavare con molta acqua.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso da 10 µl, 100 µl e 1000 µl.
- Provette di polistirene e polipropilene monouso per la preparazione delle diluizioni dei campioni.
- Cilindro da 1000 ml per la diluizione del tampone di lavaggio.
- Lavatore per micropiastre o equivalente per il tampone di lavaggio.
- Rotatore per micropiastre.
- Carta per blotting.
- Lettore per micropiastra per la determinazione dell'assorbanza a 450 nm.

PRELIEVO DEI CAMPIONI E CONSERVAZIONE

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

Non devono essere utilizzati campioni lipemici, emolizzati 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 30 giorni. Se i campioni vengono conservati per periodi più lunghi sono stabili a -20°C per almeno 6 mesi. **ATTENZIONE:** non conservare i campioni diluiti.

INFORMAZIONI PROCEDURALI

- L'enzima utilizzato come marcatore viene inattivato con ossigeno ed è altamente sensibile alla sodio azide, al thimerosal, all'acido ipocloroso e ai cloridrocaburi aromatici spesso riscontrati nell'acqua del laboratorio. Quindi, utilizzare solo acqua deionizzata di elevata qualità.
- Si consiglia di dosare ciascun controllo e campione in duplicato ogni volta che viene eseguito un test. Poiché le condizioni variano da dosaggio a dosaggio, occorre generare una nuova curva standard ogni volta che si effettua un nuovo dosaggio. Si consiglia l'allineamento verticale.
- Se la concentrazione iniziale dei campioni non noti è superiore al calibratore più elevato (calibratore A) il campione deve essere ulteriormente diluito con il tampone di incubazione e dosato secondo la procedura del dosaggio. Il fattore di diluizione che ne risulta deve essere considerato nel calcolo finale

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

Fare in modo che tutti i reagenti raggiungano temperatura ambiente 18-28°C prima dell'utilizzo.

SE IL DOSAGGIO VIENE EFFETTUATO A TEMPERATURE SUPERIORI A 28°C I RISULTATI POSSONO ESSERE ERRATI. **LA MIGLIOR TEMPERATURA PER L'EFFETTUAZIONE DEL DOSAGGIO È TRA 20 E 25°C.**

1. Diluire i campioni dei pazienti 1:50 con il tampone di incubazione (i.e. 10 µl di siero o plasma + 490 µl di tampone di incubazione) e mescolare bene. Lasciar riposare i campioni diluiti per 15 minuti a 18-28°C prima della dispensazione al punto 4c.
2. Preparare una piastra con strip sufficienti per testare il numero richiesto di calibratori, controlli e Campioni. Rimuovere le strip in eccesso dal supporto e risigillarle **immediatamente** nella loro busta con il desiccante, conservarle refrigerate.
3. Lavare i pozzetti coattati due volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e scuoterli energicamente su carta blottante.
- 4a. Dispensare 100 µl di tampone di incubazione in duplicato nei pozzetti A1+A2.
Dispensare 100 µl di calibratore A in duplicato nei pozzetti B1+B2.
Dispensare 100 µl di calibratore B in duplicato nei pozzetti C1+C2.
Dispensare 100 µl di calibratore C in duplicato nei pozzetti D1+D2.
Dispensare 100 µl di calibratore D in duplicato nei pozzetti E1+E2.
- 4b. Dispensare 100 µl del controllo basso in duplicato nei pozzetti F1+F2.
Dispensare 100 µl del controllo alto in duplicato nei pozzetti G1+G2.
- 4c. Dispensare 100 µl di ciascun campione diluito in duplicato nei pozzetti seguenti.
5. Coprire la piastra con un foglio per micropiastre e collocare la piastra sopra un rotatore per piastre a 400-600 rpm ed incubare per 1 ora $\pm$ 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 energicamente la piastra su carta blottante.
7. Dispensare 100 µl di Marcato Enzimatico nei pozzetti.
8. Coprire la piastra con un foglio sigillante, collocare la piastra su un rotatore settato a 400-600 rpm ed incubare per 30 $\pm$ 5 minuti a 18-28°C.
9. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotate i pozzetti e lavarli tre volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e scuotere la piastra energicamente su carta blottante.
10. Dispensare 100 µl di substrato TMB nei 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 $\pm$ 5 minuti a 18-28°C.
12. Dispensare 100 µl di soluzione stoppante a tutti i pozzetti. Rimuovere le bolle d'aria con un puntale. Procedere al punto 13. Entro 30 minuti.
13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastre.

LIMITI

- I reagenti forniti in questo kit sono ottimizzati per la determinazione degli autoanticorpi anti-C1q nel siero e plasma umano.

- I valori del titolo anticorpale anti-C1q devono essere utilizzati come dati supplementari disponibili per il medico ed utili alla definizione della diagnosi.
- I valori dei titoli di siero o plasma dipendono dal metodo di dosaggio utilizzato e, in particolare, dalla specificità e dai valori di cut-off stabiliti con un metodo di dosaggio. I valori dei titoli ottenuti con dosaggi diversi devono essere comparati direttamente.

CALCOLO DEI RISULTATI

Curva Standard: Annotare l'assorbanza a 450 nm per ciascun calibratore e pozzetto bianco.

- Fare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi ed annotare le medie (= Assorbanze medie corrette).
- Tracciare l'assorbanza (asse verticale) vs. il titolo degli autoanticorpi del calibratore (asse orizzontale) utilizzando una carta per grafici lin/log.
- Tracciare la migliore curva o calcolare la curva standard utilizzando un algoritmo a quattro parametri.

Campioni e controlli: annotare l'assorbanza a 450 nm per ciascun campione e pozzetto dei controlli.

- Fare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi ed annotare le medie (=Assorbanza media corretta).
- Collocare il valore dell'assorbanza del campione corretto sull'asse verticale, tracciare una linea orizzontale che interseca la curva di assorbanza e leggere il titolo degli autoanticorpi (units/ml) sull'asse orizzontale.

Vedi Table 11 e Figure 1 Per i dati (risultati e curva standard). Questi risultati e la curva standard sono forniti a solo scopo dimostrativo. Occorre generare una curva standard per ciascun set di campioni da dosare.

CONTROLLO QUALITA'

Occorre comprendere bene le informazioni contenute nella metodica per utilizzare al meglio il prodotto.

Risultati affidabili saranno ottenuti solo utilizzando precise tecniche di laboratorio (attuali linee guida GLP) e seguendo accuratamente le informazioni contenute in metodica.

Poiché non esiste nessun siero di controllo disponibile in commercio per gli autoanticorpi anti-C1q, consigliamo di utilizzare un pool di sieri positivo e negativo per il controllo qualità interno.

La riproducibilità dei parametri della curva standard ed i valori dei controlli devono essere entro limiti stabiliti di accettabilità per il laboratorio. I limiti di confidenza per i controlli sono lotto specifici e stampati sul foglio dei dati di QC aggiunto al kit.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude gli errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) Dispensazione, dispositivi di controllo della temperatura e del tempo ii) Settaggi del lettore ELISA iii) Date di scadenza dei reagenti iv) Conservazione e condizioni di incubazione v) Il substrato TMB deve essere incolore vi) Purezza dell'acqua.

PRESTAZIONI DEL DOSAGGIO

Precisione Intra-Dosaggio (all'interno della stessa seduta): 5.0%. E' stata calcolata la precisione intra-dosaggio dai risultati di 20 coppie di valori per ciascun campione in un'unica seduta. I valori sono presentati in Table 12 come unità/ml di autoanticorpi anti-C1q.

Precisione Inter-Dosaggio (da una seduta all'altra): 10.8 %. E stata calcolata la precisione inter-dosaggio dai risultati di 5 coppie di valori in 20 sedute diverse. I valori sono presentati in Table 13 come unità/ml di autoanticorpi anti-C1q.

Sensibilità: 1.0 unità/ml. Sono stati dosati venti duplicati del tampone di incubazione (=bianco) in un unico dosaggio. La media e la deviazione standard sono state calcolate per i valori di assorbanza. La dose minima rilevabile è stata calcolata per i valori dell'assorbanza. La dose minima rilevabile di autoanticorpi anti-C1q è stata calcolata in 1.0 unità/ml aggiungendo due deviazioni standard all'assorbanza media e intersecando questo valore con la curva standard ottenuta nella stessa seduta.

Linearità di Diluizione/Parallelismo: 105.9%. Tre campioni di siero umano che presentavano titoli elevati di autoanticorpi anti-C1q sono stati diluiti con il tampone di incubazione e successivamente dosati secondo la procedura del dosaggio. I valori sono presentati in Table 14 come unità/ml di autoanticorpi anti-C1q.

VALORI ATTESI E CUT-OFF

La frequenza degli autoanticorpi anti-C1q nei sieri umani normali è stata determinata utilizzando campioni di sangue da donatori asintomatici apparentemente sani (uomini e donne adulte tra i 18-70 anni). 220 campioni dosati secondo la procedura del dosaggio. I valori sono presentati in

Table 15 come unità/ml di autoanticorpi anti-C1q. **ATTENZIONE:** Questi range devono essere utilizzati solo come linee guida. Si consiglia ad ogni laboratorio di stabilire i propri range di riferimento.

Cut-off Proposto: 15 unità/ml. Sono stati eliminati in quattro cicli iterativi un totale di 20 valori elevati >media+3SD. Ciò ha prodotto un valore teorico di 18.2 unità/ml. Per ragioni pratiche, consigliamo l'utilizzo di un valore di cut-off di 15 unità/ml. Campioni inferiori a 15 unità/ml devono essere considerati negativi.

Standardizzazione: I calibratori del kit ELISA autoanticorpi anti-C1q sono calibrati verso un campione di riferimento interno. Il campione di riferimento è composto da una plasmaferesi a titolo elevato di un paziente affetto da Vascolite Urticaria Ipocomplementemica clinicamente definita.

ESPAÑOL

USO PREVISTO

El enzimoimmunoanálisis (ELISA) de autoanticuerpos anti-C1q BÜHLMANN ha sido diseñado para realizar la determinación diagnóstica *in vitro* cuantitativa de autoanticuerpos anti-C1q en suero o plasma humano.

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

Se incuban calibradores, controles y sueros o plasma del paciente que contienen autoanticuerpos anti-C1q con C1q humana adsorbida en pocillos de microtitulación. Después de un paso de lavado se añade un conjugado marcado con peroxidasa de rábano (HRP), el cual se une a la IgG humana. Después de un segundo paso de lavado se añade el sustrato de enzima (TMB) a los pocillos. Se desarrolla una coloración azul proporcional a la cantidad de autoanticuerpos anti-C1q unidos en el paso inicial. La reacción finaliza con la adición de una solución de interrupción y el color vira de azul a amarillo. La absorbancia se mide en un lector de placas de microtitulación a una longitud de onda de 450 nm.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Microplaca recubiertos con C1q humana	12 tiras de 8 pocillos	B-AC1QA-MP	Listo para usar
Sellador de placas	3 unidades		
Tampón de lavado concentrado (10X) con conservantes	1 botella 100 ml	B-AC1QA-WB	Diluir con 900 ml de agua desionizada
Tampón de incubación con conservantes	1 botella 100 ml	B-AC1QA-IB	Listo para usar
Calibrador A a D¹ Suero humano con conservantes	4 viales 1 ml	B-AC1QA-CASET	Listo para usar
Control bajo y alto² Suero humano con conservantes	2 viales 1 ml	B-AC1QA-CONSET	Listo para usar
marcada enzimáticamente anti-IgG-HRP en un tampón de proteínas con conservantes	1 vial 11 ml	B-AC1QA-EL	Listo para usar
Substrato de TMB TMB en tampón citrato con H ₂ O ₂	1 vial 11 ml	B-TMB	Listo para usar
Solución de parada Ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial 11 ml	B- STS	Listo para usar Agente corrosivo

Table 9

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Almacénese a 2-8°C. No utilice el kit después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Microplaca	Guarde inmediatamente las tiras que no ha utilizado en la bolsa metalizada que contiene los bolsitas desecantes y vuelva a cerrarla completamente por toda la cremallera. Almacénese hasta 2 meses a 2-8°C.
Tampón de lavado	Almacénese hasta 3 meses a 2-8°C.
Calibradores	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Controles	
Tampón de incubación	
Marcada enzimáticamente	
Substrato de TMB	
Solución de parada	Almacénese a 18-28°C hasta la fecha de caducidad.

Table 10

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Las tiras de microtitulación, calibradores y 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 (GLP) tomando las precauciones adecuadas.

Solución sustrato y solución de interrupción: El sustrato de TMB (B-TMB) contiene tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y dimetilformamida.

La solución de interrupción (B-STs) contiene ácido sulfúrico. Los dos reactivos pueden irritar los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Después del contacto con los ojos o la piel lave con agua abundante.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables de 10 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.
- Lavador de placas de microtitulación o botella flexible para el tampón de lavado.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Papel secante.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 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 30 días. Si se han de almacenar las muestras durante un período más largo de tiempo son estables a -20°C como mínimo durante 6 meses. NOTA: ¡No almacene muestras diluidas!

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

- La enzima utilizada como marcador se inactiva por oxígeno y es altamente sensible a azida sódica, timerosal, ácido hipocloroso y clorohidrocarburos aromáticos, que se encuentran con frecuencia en los suministros de agua de laboratorio. Por tanto, utilice únicamente agua desionizada de alta calidad.
- Se recomienda ensayar cada control y cada muestra por duplicado cada vez que se realice una prueba. Puesto que las condiciones varían de ensayo a ensayo, debe generarse una nueva curva estándar cada vez que se realice un nuevo ensayo. Se recomienda la alineación vertical.
- Si la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que el calibrador más alto (calibrador A), la muestra debe diluirse con tampón de incubación y ensayarse de nuevo según el procedimiento del ensayo. El factor de dilución resultante debe tenerse en cuenta para los cálculos finales.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Deje que todos los reactivos alcancen 18-28°C antes de utilizarlos.

SI EL ENSAYO SE REALIZA A TEMPERATURAS SUPERIORES A 28°C LOS RESULTADOS PUEDEN SER ERRÓNEOS. **LA MEJOR TEMPERATURA DE ENSAYO ES ENTRE 20 Y 25°C.**

1. Diluya todas las muestras del paciente a 1:50 con tampón de incubación (p. ej. 10 µl de suero o plasma + 490 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, guárdelas en la bolsa metalizada junto con los bolsitas desecantes **sin demora** y almacene 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.
- 4a. 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.
- 4b. Pipetee 100 µl del control bajo por duplicado en los pocillos F1+F2.
Pipetee 100 µl del control alto por duplicado en los pocillos G1+G2.
- 4c. Pipetee 100 µl de cada muestra diluida 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 de enzima 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 ± 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.
10. Pipetee 100 µl del sustrato de TMB 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 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con este kit están optimizados para medir autoanticuerpos anti-C1q en suero o plasma humano.
- Los valores de titulación de anticuerpos anti-C1q deben utilizarse como datos suplementarios disponibles para 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.

RESULTADOS Y CÁLCULOS

Curva estándar: Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo del calibrador y del blanco.

14. Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los promedios (= absorbancia media corregida).
15. Represente la absorbancia (eje vertical) frente a la titulación de autoanticuerpos del calibrador (eje horizontal) utilizando un papel gráfico semilogarítmico. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros.

Muestras y controles: Registre la absorbancia a 450 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 titulación de autoanticuerpos (units/ml) en el eje horizontal.

Véase para datos típicos (resultados y curva estándar). Estos resultados y la curva 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 autoanticuerpos anti-C1q disponible comercialmente, recomendamos el uso de una reserva de suero positivo y una de suero negativo para el control de calidad interno.

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. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad incluida en el kit.

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) el sustrato de TMB debe ser incoloro vi) pureza del agua.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Precisión intra-ensayo (dentro de la prueba): 5,0%. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores obtenidos de cada muestra en una única prueba. Los valores se presentan como unidades/ml de autoanticuerpos anti-C1q.

Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 10,8 %. La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 5 pares de valores obtenidos en 20 pruebas diferentes. Los valores se presentan como unidades/ml de autoanticuerpos anti-C1q.

Sensibilidad: 1,0 unidad/ml. Se ensayaron veinte duplicados del tampón de incubación (= blanco) en una única prueba. Se calcularon la media y la desviación

estándar de los valores de absorbancia. Se calculó la dosis mínima detectable de los valores de absorbancia. La dosis mínima detectable de autoanticuerpos anti-C1q se calculó en 1,0 unidad/ml añadiendo dos desviaciones estándar a la absorbancia media y calculando la intersección de este valor con la curva estándar obtenida en la misma prueba.

Linealidad/paralelismo de dilución: 105,9%. Se diluyeron tres muestras de suero humano que mostraban titulaciones altas de autoanticuerpos anti-C1q con tampón de incubación y después se ensayaron según el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan como unidades/ml de autoanticuerpos anti-C1q.

VALORES ESPERADOS Y PUNTO DE CORTE

Se determinó la frecuencia de autoanticuerpos anti-C1q en sueros normales humanos utilizando muestras de sangre de donantes de sangre voluntarios asintomáticos aparentemente sanos (hombres y mujeres adultos entre 18 y 70 años de edad). Se ensayaron 220 muestras según el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan como unidades/ml de autoanticuerpos anti-C1q. *NOTA: Estos rangos de titulación deben utilizarse únicamente como orientativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos esperados.*

Titulación de corte propuesta: 15 unidades/ml. Se eliminó un total de 20 valores elevados >media+3DE en cuatro ciclos iterativos. Esto produce un valor de corte teórico de 18,2 unidades/ml. Por razones prácticas recomendamos el uso de un valor de corte de 15 unidades/ml. Las muestras inferiores a 15 unidades/ml deben considerarse negativas.

Estandarización: Los calibradores del kit de ELISA de autoanticuerpos anti-C1q están calibrados frente a una muestra de referencia interna. La muestra de referencia consiste en una plasmáfesis de alta titulación de un paciente con síndrome de urticaria vasculitis hipocomplementémica (SUVH) clínicamente bien definido.

TABLES/ TABELLEN/ TABLES/ TABELLE/ TABLAS

Figure 1: Standard Curve

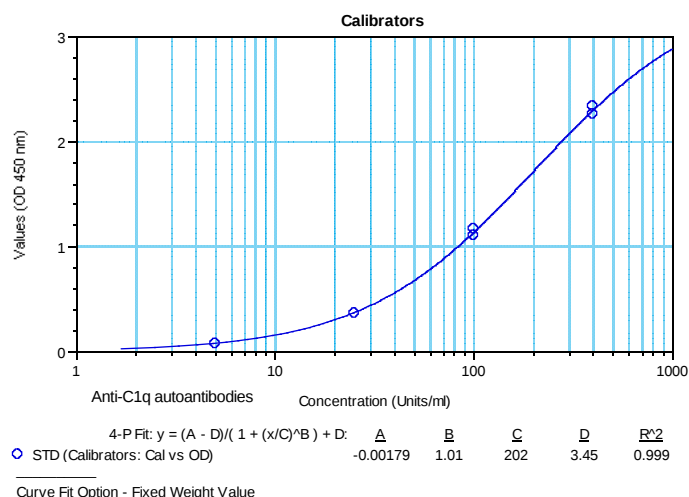


Table 11: Typical Data

	Conc. (units/ml)	Abs. (OD)	Calc. Conc. (units/ml)	CV Conc. (%)
Blank		0.068		
Blank Avg.		0.068		
Cal A	400	2.332	418	
Cal A	400	2.264	383	
Cal A Avg.	400	2.298	400	2.1
Cal B	100	1.165	104	
Cal B	100	1.102	96	
Cal B Avg.	100	1.133	100	3.9
Cal C	25	0.369	25	
Cal C	25	0.369	25	
Cal C Avg.	25	0.369	25	0
Cal D	5	0.077	5.0	
Cal D	5	0.079	5.0	
Cal D Avg.	5	0.078	5.0	1.8
Control LOW		0.078	5.0	
Control LOW		0.077	5.0	
Control L. Avg.		0.077	5.0	0.9
Control HIGH		1.486	154	
Control HIGH		1.511	158	
Control H. Avg.		1.498	156	1.2

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

Sample	Mean [units/ml]	SD [units/ml]	CV [%]
Sample 1	7.8	0.6	7.1
Sample 2	16.7	1.0	6.0
Sample 3	34.7	2.0	5.7
Sample 4	67.0	2.0	3.1
Sample 5	177.0	6.0	3.4
Sample 6	291.0	12.7	4.4
Mean			5.0

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

Sample	Mean [units/ml]	SD [units/ml]	CV [%]
Sample 7	12.7	1.3	10.3
Sample 8	32.0	4.6	14.3
Sample 9	60.2	6.9	11.5
Sample 10	120.0	8.5	7.1
Sample 11	232.0	25.1	10.8
Mean			10.8

Table 15: Cut-Off Values

	Before elimination	after elimination
Total (n)	220	200
Range	2.0–319	2.0–22.1
Mean	12.1	5.6
Median	4.1	3.8
SD	30.2	4.2
Mean+3SD	102.8	18.2

Table 14: Dilution Linearity/Parallelism

Sample	Dilution Factor	Observed [units/ml]	Expected [units/ml]	Recovery O/E [%]
Sample 12	1:50	269	--	--
	1:100	145	135	108
	1:200	70.9	67.3	102
	1:400	37.0	33.6	110
	1:800	19.2	16.8	114
	1:1600	10.0	8.4	119
Sample 13	1:3200	5.1	4.2	121
	1:50	276	--	--
	1:100	123	138	91
	1:200	68.6	69.0	99
	1:400	39.9	34.5	116
	1:800	19.6	17.3	114
Sample 14	1:1600	10.6	8.6	123
	1:3200	5.0	4.3	116
	1:50	261	--	--
	1:100	126	130	97
	1:200	65.2	65.3	100
	1:400	32.2	33.6	99
Sample 14	1:800	15.9	16.3	91
	1:1600	7.0	8.1	86
	1:3200	4.1	4.1	100
Mean				105.9

Table description: cf. "Results and Calculation" (page 3), "Performance characteristics" (page 3) and "Expected Values and Cut-off" (page 3).

Tabellenbeschreibung: siehe "Resultate" (page 5), "Leistungsmerkmale" (page 6) and "Normalbereich und Grenzwerte" (page 6).

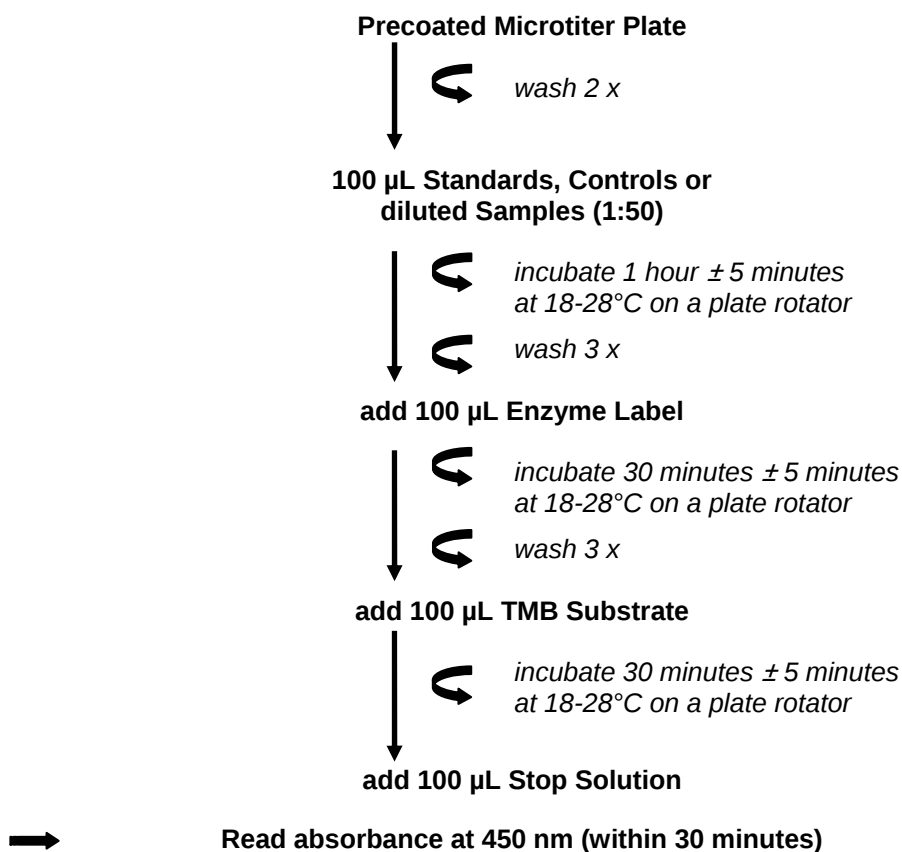
Explications relatives aux tableaux: voir "Resultats et calculs" (page 8), "Caracteristiques de Performance" (page 8) and "Valeur seuil" (page 8).

Descrizione tavola: cf. "Calcolo dei Risultati" (pagina 10), "Prestazione del dosaggio" (pagina 10) e "Valori attesi e Cut-Off" (pagina 11).

Explicaciones relativas a las Tablas: ver "Resultados y cálculos" (página 13), "Características de Eficiencia" (página 13) y "Valores esperados y punto de corte" (página 13).

1. Siegert CEH *et al.* IgG autoantibodies against C1q are correlated with nephritis, hypocomplementemia, and dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1991, 18: 230-234.
2. Siegert CEH *et al.* Review: Autoantibodies against C1q: view on clinical relevance and pathogenic roles. *Clin Exp Immunol* 1999, 116: 4-8.
3. Trendelenburg M *et al.* Lack of occurrence of severe lupus nephritis among anti-C1q autoantibody-negative patients. *Arthritis Rheum* 1999, 41: 187-188.
4. Moroni, G, *et al.* Anti-C1q antibodies may help in diagnosing a renal flare in lupus nephritis *Am J Kidney Dis* **37**, 490-8. (2001).

ANTI-C1Q AUTOANTIBODIES ELISA



TIME TO RESULT: 2.0 HOURS

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
MP	Microtiterplate Mikrotiter-Platte Microplaque Micropiastra Microplaca
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

Symbol	Explanation
CAL A	Calibrator A Kalibrator A Calibrateur A Calibratore A Calibrador A
CAL B	Calibrator B Kalibrator B Calibrateur B Calibratore B Calibrador B
CAL C	Calibrator C Kalibrator C Calibrateur C Calibratore C Calibrador C
CAL D	Calibrator D Kalibrator D Calibrateur D Calibratore D Calibrador D
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 TMB	TMB Substrate TMB-Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato de TMB
SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada



Printing Date
2010-04-20