



DCM017-10
Ed. 09/2018

CIC C3d ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta dell'Immunocomplesso Circolante C3d (CIC C3d) nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



Σ = 96 test

REF DKO017

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di CIC C3d (Immunocomplesso Circolante C3d) nel siero o plasma umano. Il kit CIC C3d ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'importanza degli immunocomplessi (CIC) e la loro relazione con varie malattie è stata oggetto di investigazioni per molti anni.

La formazione di immunocomplessi è un normale processo protettivo del sistema immunitario. Gli immunocomplessi circolanti sono rimossi dalla circolazione mediante diversi processi cellulari, biochimici ed enzimatici.

La chiave dell'eliminazione di molti CIC è l'attivazione della via classica del complemento.

Tuttavia in alcune malattie, di difficile comprensione, gli immunocomplessi possono iniziare il danneggiamento di organi e tessuti. In questo caso l'attivazione del complemento può dar inizio a eventi distruttivi come la produzione di anafilotossine, stimolazione di leucociti e attivazione di macrofagi e di altre cellule.

In alcuni casi di glomerulonefriti, in cui gli immunocomplessi si fissano alle membrane cellulari, si ha la distruzione dei tessuti.

Gli immuno-complessi circolanti (CIC) sono presenti in molti individui affetti da systemic lupus erythematosus (SLE) e artrite reumatoide (RA), specialmente in quelli affetti da complicazioni vasculitidi. Sono stati sviluppati molti test per la determinazione dei CIC, incluso il test di precipitazione al PEG, immunodiffusione radiale e test cellulari come il test di Ray cell.

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

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit CIC-C3d ELISA è basato sul principio che gli immunocomplessi affini alla frazione C3d sono bloccati dall'anticorpo anti C3d immobilizzato sulla micropiastra.

Nella prima fase della procedura si aggiungono i sieri e i campioni alla micropiastra coattata con anticorpo anti C3d. Durante l'incubazione gli immunocomplessi affini alla frazione C3d si legano all'anticorpo anti C3d coattato sulla micropiastra. Il successivo lavaggio della micropiastra rimuove le proteine del siero non legate.

Nella seconda fase viene aggiunto l'anticorpo anti-IgG umane coniugato a perossidasi di rafano, il quale si lega agli immunocomplessi ora fissati alla micropiastra. Il successivo lavaggio rimuove il coniugato non legato.

Nella terza fase si aggiunge il TMB Substrato il quale reagisce con il coniugato legato alla micropiastra.

L'intensità del colore misurata a 450 nm è proporzionale ai livelli di CIC IgG.

La concentrazione di immunocomplessi presenti nel campione è determinata mediante una curva di calibrazione.

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

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

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

CAL0

REF DCE002/1706-0

CAL1

REF DCE002/1707-0

CAL2

REF DCE002/1708-0

2. Controls (2 flaconi, 1,5 mL ciascuno)

Controllo Negativo

REF DCE045/1701-0

Controllo Positivo

REF DCE045/1702-0

3. Incubation Buffer (1 flacone, 50 mL)

Tampone fosfato 74 mM pH 7,4; BSA 1 g/L

REF DCE008-0

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

Anticorpo anti IgG umane coniugato a perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/1702-0

5. Conjugate Buffer (1 flacone, 20 mL)

Tampone fosfato 74 mM pH 7,4; BSA 1 g/L

REF DCE009-0

6. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti C3d adsorbito sulla micropiastra

REF DCE002/1703-0

7. **TMB Substrate** (1 flacone, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE004-0
8. **Stop Solution** (1 flacone, 15 mL)
Acido Solforico 0,15 mol/L (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE005-0
9. **10X Conc. Wash solution** (2 flaconi, 50 mL ciascuno)
Tampone fosfato 0.2M pH 7,4 **REF DCE054-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

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

4. AVVERTENZE

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

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.

- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- **ATTENZIONE: il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni;** si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica,** si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; **questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso.** A tale scopo Dia.Metra rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.

- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀-C₂)

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂
µgEq/mL	0	16	64

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

6.2. Preparazione del Coniugato Diluito

Diluite il Conjugate concentrato (reagente 4) 1:100 con il Conjugate buffer (reagente 5). La quantità varia proporzionalmente secondo il numero di test da eseguire. Miscelare bene evitando la formazione di schiuma. Stabile per 3 ore a temperatura ambiente (22÷28°C).

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto del flacone della "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

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

6.4. Preparazione del campione

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

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

Dispensare in una provetta:

Siero	10 µL
Incubation Buffer (reagente 3)	500 µL

Miscelare gentilmente. Evitare l'uso del vortex.

6.5. Procedimento

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

due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₂), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibratore	Campioni/ Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₂	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare 30 minuti a 37°C. Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastre capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
Coniugato Diluito	100 µL	100 µL	
Incubare 30 minuti a 37°C. Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. Lavaggi: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C) al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastre. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di CIC C3d per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il

cambiamento inosservato negli stati sperimentali o nella degradazione dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

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

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare su un grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascuno Calibratore (C₀-C₂) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

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

9. VALORI DI RIFERIMENTO

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

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

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la determinazione di due differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è del 6,1%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la determinazione di due differenti sieri di controllo con due kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è del 13,9%.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 12,5 – 25 – 50 µgEq/mL di CIC C3d, ha dato un valore medio (±SD) di 99,84% ± 5,07%.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di CIC C3d misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,60 µgEq/mL con un limite di confidenza del 95%.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

BIBLIOGRAFIA

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

Ed. 09/2018

DCM017-10

Dia.Metra S.r.l.

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



DCM017-10
Ed. 09/2018

CIC C3d ELISA

for routine analysis

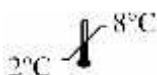
Direct immunoenzymatic determination of Circulating Immune Complex C3d (CIC C3d) in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO017

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Circulating Immune Complex C3d (CIC C3d) concentration in human serum or plasma.

CIC C3d ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

The importance of the immunocomplex (CIC) and their relation with several diseases have been object of investigations for many years.

The establishment of immunocomplex is a normal protecting process of the immune system. The circulating immunocomplex are removed from the circulation by means of various cellular, biochemical and enzymatic processes.

Key of elimination of many CIC is the activation of the classic way of the complement.

In some diseases, of difficult understanding, the immunocomplex can begin the damaging of tissue and organs. In this case the activation of the complement can lead to the anafilotoxine production, stimulation of leukocyte and activation of macrophage and other cells.

In some cases of glomerulonephritis, in which the immunocomplex fix to the cellular membranes, it has the destruction of the tissue.

Circulating immuno-complexes (CIC) are present in many individuals affections from systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA), especially in those affections from vasculitis complications. There are many tests for the determination of CIC, included the test of precipitation with PEG, radial immunodiffusion, and cellular tests like the test of Ray cell.

Does not exist one procedure to determinate all types of immunocomplex; in commerce some test to determinate fragments of the complex are available (Es. C1q and C3d), that have an important diagnostic meaning.

2. PRINCIPLE

C3d-fixing circulating immune complexes (CIC) are first blocked by the anti-C3d immobilized on the microplate. During this phase, the immunocomplex binds to the antibodies anti C3d coated on the microplate. The microplate is washed to remove the unbound serum protein.

In the second phase, the anti human IgG antibodies conjugated with peroxidase are added; they bind to the immunocomplex fixed on the microplate. The washing solution removes the unbound conjugate. In the third phase, the TMB Substrate is added, and reacts with the conjugate fixed on the microplate.

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

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

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

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

- Calibrators (3 vials, 1.5 mL each)
CAL0 REF DCE002/1706-0
CAL1 REF DCE002/1707-0
CAL2 REF DCE002/1708-0
- Controls (2 vials, 1.5 mL each)
Negative Control REF DCE045/1701-0
Positive Control REF DCE045/1702-0
- Incubation Buffer (1 vial, 50 mL)
Phosphate buffer 74 mM pH 7.4; BSA 1 g/L
REF DCE008-0
- Conjugate (1 vial, 0.5 mL)
Anti human IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP)
REF DCE002/1702-0
- Conjugate Buffer (1 vial, 20 mL)
Phosphate buffer 74 mM pH 7.4; BSA 1 g/L
REF DCE009-0
- Coated Microplate (1 breakable microplate)
Anti C3d antibodies coated on microplate
REF DCE002/1703-0
- TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)
REF DCE004-0
- Stop Solution (1 vial, 15 mL)
Sulphuric Acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)
REF DCE005-0
- 10X Conc. Wash solution (2 vials, 50 mL ciascuno)
Phosphate buffer 0.2M, pH 7.4 REF DCE054-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

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

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

4. WARNINGS

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

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.

- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly:** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.** For this purpose, Dia.Metra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems it is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of Calibrators

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

	C ₀	C ₁	C ₂
µgEq/mL	0	16	64

Once opened the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of Diluted Conjugate

Dilute the concentrated Conjugate (reagent 4) 1:100 with Conjugate buffer (reagent 5). The quantity of diluted Conjugate is proportional to the number of the assays. Mix well and avoid foaming. Stable for 3 hours at room temperature (22±28°C).

6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of the vial "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

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

6.4. Preparation of the Sample

The CIC assay can be performed in human serum or plasma. Samples, which are not immediately processed (within 24 h), should be stored at -20°C. Samples should not be thawed more than once. Pipette in a test tube:

Serum	10 µL
Incubation Buffer (reagent 3)	500 µL

Mix gently. Avoid vortex use.

6.5. Procedure

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

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

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Cortisol for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

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

8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the Calibrators (C₀-C₂) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

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

9. REFERENCE VALUES

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

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

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate determination (16x) of two different control sera in one assay. The within assay variability is 6.1%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variations was determined by replicate measurements of three different control sera in 2 different lots. The between assay variability is 13.9%.

10.2. Accuracy

The recovery of 12.5 – 25 – 50 µgEq/mL of CIC C3d added to "serum-free" sample gave an average value (±SD) of 99.84% ± 5.07% with reference to the original concentrations.

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of CIC C3d that can be distinguished from the zero Calibrator is 0.60 µgEq/mL at the 95 % confidence limit.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

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

Ed. 09/2018

DCM017-10

Dia.Metra S.r.l.

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



DCM017-10
Ed. 09/2018

CIC C3d ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de CIC C3d en suero o plasma humano.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO017

USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de CIC C3d en suero o plasma humano.

El kit CIC C3d ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La importancia de los inmunocomplejos (CIC) y su relación con distintas enfermedades ha sido objeto de investigación durante muchos años.

La formación de inmunocomplejos es un proceso normal de protección del sistema inmunitario. Los inmunocomplejos circulantes se eliminan de la circulación mediante distintos procesos celulares, bioquímicos y enzimáticos.

La clave para la eliminación de muchos CIC es la activación de la vía clásica del complemento.

Sin embargo, resulta difícil de entender que en algunas enfermedades los inmunocomplejos pueden iniciar el daño de órganos y tejidos. En este caso, la activación del complemento puede iniciar eventos destructivos, como la producción de anafilotoxinas, la estimulación de leucocitos y la activación de macrófagos y de otras células.

En algunos casos de glomerulonefritis, en los que los inmunocomplejos se fijan a las membranas celulares, se produce la destrucción de los tejidos.

Los inmunocomplejos circulantes (CIC) están presentes en muchos individuos que sufren de lupus eritematoso sistémico (SLE) y artritis reumatoide (RA), especialmente en aquellos con complicaciones de vasculitis.

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

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

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El kit (CIC-C3d) se basa en el principio de que los inmunocomplejos afines a la fracción C3d son

bloqueados por el anti-C3d inmovilizado en la microplaca.

En la primera fase del procedimiento, se añaden los sueros y las muestras a la microplaca recubierta con anti-C3d y, a continuación, se dejan incubar. Durante esta fase, los inmunocomplejos afines a la fracción C3d se unen al anti C3d que recubre la microplaca. Con el lavado de la microplaca se retiran las proteínas del suero no unidas.

En la segunda fase, se añade el conjugado anti IgG humana-peroxidasa, que se une a los inmunocomplejos ahora fijados a la microplaca. Con el lavado se retira el conjugado no unido.

En la tercera fase, se añade el substrato TMB, que reacciona con el conjugado unido a la microplaca. La intensidad del color medida a 450 nm es proporcional a los niveles de CIC IgG.

La concentración de inmunocomplejos presentes en la muestra se determina mediante una Curva de calibración.

Los resultados se expresan como microgramos de gammaglobulina humana agregada por calor equivalentes por mL ($\mu\text{gEq/mL}$)

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (3 frascos, 1,5 mL cada uno)

CAL0

REF DCE002/1706-0

CAL1

REF DCE002/1707-0

CAL2

REF DCE002/1708-0

2. Controles (2 frascos, 1,5 mL cada uno)

Control negativo

REF DCE045/1701-0

Control positivo

REF DCE045/1702-0

3. Tampón de incubación (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 74 mM pH 7,4; BSA 1 g/L

REF DCE008-0

4. Conjugado (1 frasco, 0,5 mL)

Conjugado anti IgG humana conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/1702-0

5. Tampón de conjugado (1 frasco, 20 mL)

Tampón fosfato 74 mM pH 7,4; BSA 1 g/L

REF DCE009-0

6. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)
Anticuerpo anti C3d absorbido en la microplaca
REF DCE002/1703-0
7. Solución de lavado conc. 10X (2 frascos, 50 mL
cada uno)
Tampón fosfato 0.2M pH 7,4 REF DCE054-0
8. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)
REF DCE004-0
9. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)
Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la
piel) REF DCE005-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

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

Nota

Conservar todos los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradoreses y de los controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradoreses y los controles positivo y negativo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser

tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.

- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el substrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀-C₂)

Los Calibradores están listos para el uso.

Los Calibradores tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂
µgEq/mL	0	16	64

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.2. Preparación del conjugado diluido

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

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

6.3. Preparación de la solución de lavado

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

6.4. Preparación de la muestra

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

Dispensar en una probeta:

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

Mezclar con cuidado. Evitar el uso del vórtex.

6.5. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.

- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₂), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

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

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar controles para los rangos bajo, medio y alto de CIC C3d para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la Curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de

absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la Curva de calibración (C_0 - C_2) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (E_m) de cada Calibrador (C_0 - C_2) en función de las concentraciones.

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

8.3. Cálculo de los resultados

Interpolarse del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en $\mu\text{Eq/mL}$.

9. VALORES DE REFERENCIA

	$\mu\text{Eq/mL}$ de agregado de IgG
Muestras negativas	<16
Muestras dudosas	entre 16 y 18
Muestras positivas	>18

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

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la determinación de dos sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es del 6.1%.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando la determinación de dos sueros de control distintos con dos kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es del 13.9%

10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 12,5 – 25 – 50 – 100 $\mu\text{Eq/mL}$ de

CIC C3d ha dado un valor medio ($\pm\text{SD}$) de 99.84% \pm 5.07%.

10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de CIC C3d medible que puede distinguirse del Calibradores cero es 0,60 $\mu\text{Eq/mL}$ con un límite de confianza del 95%.

10.4. Especificidad

Se han analizado muestras de suero de 45 personas sanas o asintomáticas. La especificidad del ensayo es del 96%.

Se han analizado muestras de suero de 24 pacientes con SLE, artritis reumatoide y otras enfermedades. La especificidad del ensayo es del 90%.

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

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

Ed. 09/2018

DCM017-10

Dia.Metra S.r.l.

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

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

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

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

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

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

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

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

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

Valori inspiegabilmente fuori scala

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

CV% intrasaggio elevato

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

CV% intersaggio elevato

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

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

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

Too low reaction (too low ODs)

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

Too high reaction (too high ODs)

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

Unexplainable outliers

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

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

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

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

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

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

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

Valores inexplicablemente fuera de escala

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

CV% intraensayo elevado

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

CV% interensayo elevado

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

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

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

Réaction trop faible (DO trop basse)

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

Réaction trop intense (DO trop élevée)

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

Valeurs inexplicablement hors plage

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

CV% intra-essai élevé

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

CV% inter-essai élevé

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