



DCM149-2
Ed. 09/2018

Anti CP IgG

per analisi di routine

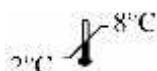
Determinazione quantitativa degli anticorpi IgG contro i Peptidi Citrullinati (CP) nel siero o nel plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO149

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Anti CP IgG è un test immunoenzimatico (ELISA) indiretto in fase solida sviluppato per la determinazione quantitativa degli anticorpi di classe IgG diretti contro i Peptidi Citrullinati (CP), presenti nel siero o nel plasma umano.

Il kit Anti CP IgG è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'Artrite Reumatoide (AR) è una delle malattie autoimmuni più diffuse (1-2% popolazione europea). La manifestazione clinica più significativa è una infiammazione delle membrane sinoviali che porta a dolorosi rigonfiamenti delle articolazioni e all'anchilosi. Nel porre la diagnosi di AR come quadro clinico a sé stante è necessario poter escludere con sicurezza altre forme di artrite: in tale percorso diagnostico il laboratorio gioca un ruolo importante con la determinazione dei fattori reumatoidi (FR) di classe IgM, rilevabili nel 60-80% dei pazienti con AR. I Fattori Reumatoidi sono marcatori sensibili ma non molto specifici.

Al contrario, gli anticorpi anti Peptidi Citrullinati (CP) sono un marcatore dell'Artrite Reumatoide e sono usati in sede di diagnosi grazie all'utilizzo come antigeni di sequenze citrullinate (come ad esempio la filaggrina, i peptidi ciclici derivati da filaggrina, la vimentina ricombinante citrullinata, la fibrina, le proteine citrullinate virali).

Il kit Dia.Metra Anti CP IgG è basato su sequenze peptidiche citrullinate virali ed umane utilizzate come antigeni; questo uso combinato permette la detezione di differenti sottogruppi di anticorpi anti CP all'interno dello stesso campione di pazienti; questo porta ad una migliore analisi diagnostica.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Anti CP IgG si basa sul legame degli anticorpi presenti nei calibratori, nei controlli o nei campioni prediluiti dei pazienti con i peptidi citrullinati sintetici adsorbiti sulla superficie interna dei pozzetti.

Dopo 30 minuti di incubazione la micropiastra viene lavata con tampone di lavaggio per la rimozione delle componenti del siero che non hanno reagito.

Successivamente una soluzione di immunoglobuline anti-human IgG coniugate con perossidasi riconosce gli anticorpi di classe IgG legati agli antigeni immobilizzati. Dopo 30 minuti di incubazione

l'eccesso di coniugato enzimatico che non si è legato specificamente viene rimosso mediante tampone di lavaggio.

Infine si aggiunge ai pozzetti una soluzione substrato cromogenica contenente TMB. Dopo 15 minuti di incubazione si blocca lo sviluppo del colore mediante aggiunta della soluzione stop. Il colore della soluzione diventa giallo. La quantità di colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgG presenti nel campione originale.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONI

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

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

Tampone fosfato 0,1M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$, siero umano

CAL0	REF DCE002/14906-0
CAL1	REF DCE002/14907-0
CAL2	REF DCE002/14908-0
CAL3	REF DCE002/14909-0
CAL4	REF DCE002/14910-0

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

Tampone fosfato 0,1M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$, siero umano

Controllo Negativo	REF DCE045/14901-0
Controllo Positivo	REF DCE045/14902-0

3. Sample diluent (1 flacone, 100 mL)

Tampone fosfato 0,1M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$
REF DCE053-0

4. Conjugate (1 flacone, 15 mL)

Anti h-IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP), BSA 0,1%
REF DCE002/14902-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

CP antigenici adsorbiti su micropiastra
REF DCE002/14903-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (evitare il contatto con la pelle)
REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido solforico 0,15M (evitare il contatto con la pelle)
REF DCE005-0

8. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)

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.

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

Note

Conservare tutti i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce. Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip 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 e i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN_3) o di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/ H_2O_2 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...C₄)

Dal momento che non sono disponibili preparazioni di riferimento internazionale per gli anticorpi anti CP, il sistema di misurazione è calibrato in unità relative arbitrarie. I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	5	10	20	80

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

6.2. Preparazione del campione

Le matrici di elezione per la determinazione degli anticorpi anti CP sono siero o plasma umano.

Tutti i campioni di siero o plasma devono essere prediluiti 1:100 con sample diluent; ad esempio 10 µL di campione possono essere diluiti con 990 µL di sample diluent.

I campioni possono essere conservati refrigerati a 2-8°C per almeno 5 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi, fino a 6 mesi, i campioni dovrebbero essere congelati a -20°C. Per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti, i campioni dovrebbero essere aliquotati.

I Controlli sono pronti all'uso.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (10X) con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni. Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

6.4. 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-C₄), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₄	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 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 micropiastra invertita su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 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 al buio a temperatura ambiente (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. RISULTATI

7.1. Curva di calibrazione

Per il dosaggio Anti CP IgG il metodo utilizzato per il trattamento dei risultati è una elaborazione a 4 parametri con assi lin-log per densità ottica e concentrazione rispettivamente. Inoltre si possono utilizzare un'approssimazione spline e coordinate log-log. Tuttavia si raccomanda di utilizzare una curva Lin-Log.

Innanzitutto occorre calcolare la media delle densità ottiche relative ai calibratori. Utilizzare un foglio di carta lin-log e tracciare le densità ottiche medie di ogni calibratore verso la rispettiva concentrazione. Disegnare la curva che approssima nel modo migliore tutti i punti di calibrazione. I punti dei calibratori possono anche essere collegati con segmenti di linea retta. La concentrazione dei campioni incogniti può essere determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

8. VALORI DI RIFERIMENTO

In uno studio sui valori normali eseguito con campioni di siero provenienti da donatori sani sono stati determinati i seguenti intervalli di normalità con il test Anti CP IgG:

	Anti CP IgG (AU/mL)
Negativo	< 10
Positivo	> 10

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.

I risultati positivi dovrebbero essere verificati relativamente allo stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione relativa alla terapia dovrebbe essere presa individualmente. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri intervalli normale e patologico di anticorpi anti CP sierici.

9. PARAMETRI CARATTERISTICI

9.1. Specificità

Uno studio effettuato su 93 campioni (45 positivi all'Artrite Reumatoide con positività agli anticorpi anti CCP, 48 provenienti da donatori sani) ha mostrato una specificità del 94%.

9.2. Sensibilità

Uno studio effettuato su 93 campioni (45 positivi all'Artrite Reumatoide con positività agli anticorpi anti CCP, 48 provenienti da donatori sani) ha mostrato una sensibilità del 76%.

10. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

BIBLIOGRAFIA

1. Vossenaar ER et al., Arthritis Rheum., 50, 3485, 2004
2. Masson-Bessière C et al., J.Immunol. 166, 4177, 2001
3. Anzilotti C et al., J. Rheumatol., 33, 647, 2006
4. Schellekens GA et al., Arthritis Rheum. 43, 155, 2000
5. Avouac J et al., Ann. Rheum. Dis. 65, 845, 2006
6. Lutteri L et al., Clin. Chim. Acta 76, 386, 2007
7. Pratesi F et al., Arthritis Rheum. 54, 733, 2006
8. Pratesi et al., Clin. Exp. Immunol. 164, 337, 2011

Ed. 09/2018

DCM149-2

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

Prodotto su licenza di Toscana Biomarkers - Siena - Italia



DCM149-2
Ed. 09/2018

Anti CP IgG

for routine analysis

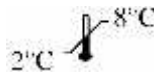
Quantitative determination of IgG class antibodies against Citrullinated Peptides (CP) in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



$\Sigma = 96$ tests

REF DKO149

INTENDED USE

Anti CP IgG is an indirect solid phase enzyme immunometric assay (ELISA) kit designed for the quantitative measurement of IgG class antibodies directed against Citrullinated Peptides (CP) in human serum or plasma.

Anti CP IgG kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Rheumatoid Arthritis (RA) is one of the most common autoimmune diseases (1-2% European population). The most significant clinical symptom is an inflammation of the synovial membranes which causes a painful swelling of the articulations and the ankylosis.

In order to correctly diagnose RA it is necessary to exclude other forms of arthritis: in this diagnostic process, the laboratory plays an important role in the determination of Rheumatoid Factor (RF) antibodies of class IgM, detectable in 60-80% of the patients with RA. The RF antibodies are sensitive but not very specific markers.

On the contrary, anti citrullinated peptides (CP) autoantibodies are a hallmark of RA and are used in diagnostic assays, through the use of citrullinated sequences (such as: filaggrin and filaggrin derived cyclized peptides, citrullinated recombinant vimentin, fibrin, viral citrullinated proteins) as antigens.

Dia.Metra Anti CP IgG assay is based on viral and human citrullinated peptidic sequences that are used as antigens; this combined use allows to detect different subgroups of anti CP antibodies in the same set of patients, leading to a better diagnostic investigation.

2. PRINCIPLE

Anti CP IgG test is based on the binding of antibodies present in calibrators, controls or prediluted patient samples to the synthetic Citrullinated Peptides (CP) coated on the inner surface of the wells. After a 30 minutes incubation the microplate is washed with a wash buffer to remove the non-reactive serum components.

Then an anti-human-IgG horseradish peroxidase conjugated solution recognizes the IgG class antibodies bound to the immobilized antigens. After a 30 minutes incubation, any excess of enzyme

conjugate not specifically bound is washed away with the wash buffer.

Finally a chromogenic substrate solution containing TMB is dispensed into the wells. After 15 minutes of incubation the color development is stopped by adding the stop solution. The solutions color changes into yellow. The amount of color is directly proportional to the concentration of IgG antibodies present in the original sample.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

- Calibrators (5 vials, 1.2 mL each)
Phosphate buffer 0.1M, $\text{NaN}_3 < 0.1\%$, human serum
CAL0 **REF DCE002/14906-0**
CAL1 **REF DCE002/14907-0**
CAL2 **REF DCE002/14908-0**
CAL3 **REF DCE002/14909-0**
CAL4 **REF DCE002/14910-0**
- Controls (2 vials, 1.2 mL each, ready to use)
Phosphate buffer 0.1M, $\text{NaN}_3 < 0.1\%$, human serum
Negative Control **REF DCE045/14901-0**
Positive Control **REF DCE045/14902-0**
- Sample Diluent (1 vial, 100 mL)
Phosphate buffer 0.1 M, $\text{NaN}_3 < 0.1\%$
REF DCE053-0
- Conjugate (1 vial, 15 mL)
Anti h-IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP), BSA 0.1% **REF DCE002/14902-0**
- Coated Microplate (1 breakable microplate)
Microplate coated with CP antigens **REF DCE002/14903-0**
- 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 0.15M (avoid any skin contact) **REF DCE005-0**
- 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)
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).

Notes

Store all reagents between 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until 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, the Calibrators and the 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 Sodium Azide (NaN₃) or Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- 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 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 the Calibrators (C₀...C₄)

Since no international reference preparation for anti CP antibodies is available, the assay system is calibrated in relative arbitrary units. The Calibrators are ready to use and have the following concentration:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	5	10	20	80

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

6.2. Preparation of the Sample

For determination of anti CP antibodies, human serum or plasma are the preferred sample matrixes.

All serum and plasma samples have to be prediluted with sample diluent 1:100; for example 10 µL of sample may be diluted with 990 µL of sample diluent.

Samples may be stored refrigerated at 2-8°C for at least 5 days. For longer storage of up to six months samples should be stored frozen at -20°C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted.

The Controls are ready to use.

6.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (10X) with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C. In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

6.4. 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-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Calibrator C ₀ -C ₄	100 µL		
Controls		100 µL	
Diluted Sample		100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of 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.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of 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. RESULTS

7.1. Calibration curve

For the Anti CP IgG assay a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the preferred data reduction method. Smoothed-Spline Approximation and log-log coordinates are also suitable.

However we recommend using a Lin-Log curve.

First calculate the averaged optical densities for each calibrator well. Use lin-log graph paper and plot the averaged optical density of each calibrator versus the concentration. Draw the best fitting curve approximating the path of all calibrator points. The calibrator points may also be connected with straight line segments. The concentration of unknowns may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

8. REFERENCE VALUES

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with the Anti CP test:

	Anti CP IgG (AU/mL)
Negative	< 10
Positive	> 10

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.

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of serum Anti CP.

9. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

9.1. Specificity

A study performed on 93 samples (45 positive to Rheumatoid Arthritis with positivity to anti CCP antibodies, 48 from healthy blood donors) showed a specificity of 94%.

9.2. Sensitivity

A study performed on 93 samples (45 positive to Rheumatoid Arthritis with positivity to anti CCP antibodies, 48 from healthy blood donors) showed a sensitivity of 76%.

10. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Vossenaar ER et al., Arthritis Rheum., 50, 3485, 2004
2. Masson-Bessière C et al., J.Immunol. 166, 4177, 2001
3. Anzilotti C et al., J. Rheumatol., 33, 647, 2006
4. Schellekens GA et al., Arthritis Rheum. 43, 155, 2000
5. Avouac J et al., Ann. Rheum. Dis. 65, 845, 2006
6. Lutteri L et al., Clin. Chim. Acta 76, 386, 2007
7. Pratesi F et al., Arthritis Rheum. 54, 733, 2006
8. Pratesi et al., Clin. Exp. Immunol. 164, 337, 2011

Ed. 09/2018

DCM149-2

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

Manufactured under license from Toscana Biomarkers -
Siena - Italy



DCM149-2
Ed. 09/2018

Anti CP IgG

para análisis de rutina

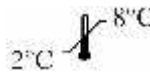
Determinación cuantitativa de los anticuerpos IgG contra los péptidos citrulinados (CP) en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO149

USO PREVISTO

El kit Anti CP IgG es un ensayo inmunoenzimático indirecto en fase sólida (ELISA) desarrollado para la determinación cuantitativa de los anticuerpos de clase IgG directos contra los péptidos citrulinados, presentes en el suero o plasma humano.

El kit Anti CP IgG está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La Artritis Reumatoide (AR) es una de las enfermedades autoinmunes más difundida (1-2% de la población europea). La manifestación clínica clásica es la inflamación de las membranas sinoviales que produce dolorosas hinchazones de las articulaciones y anquilosis. Para el diagnóstico de la AR es necesario excluir otras formas de artritis, el laboratorio juega un papel importante en el recorrido diagnóstico. El factor reumatoide (FR) de clase IgM es detectable en el 60-80% de pacientes afectados por AR, lastimosamente a pesar de su buena sensibilidad es un marcador poco específico. Al contrario los anticuerpos anti Péptidos Citrulinados (CP) son un marcador específico para la AR, se utilizan en la diagnóstica empleando secuencias citrulinadas de diferentes antígenos (filagrina, péptidos cíclicos derivados de la filagrina, vimentina recombinante citrulinada, fibrina y últimamente proteínas citrulinadas virales). EL kit de DIA.METRA anti CP IgG utiliza como antígenos secuencias citrulinadas virales y humanas, la combinación de estas secuencias permite la detección de diferentes subgrupos de anticuerpos anti CP simultáneamente, el resultado es un mejor análisis diagnóstico.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo Anti CP IgG se basa en la unión de los anticuerpos presentes en los calibradores, en los controles o en las muestras prediluidas de los pacientes con los péptidos citrulinados sintéticos absorbidos en la superficie interna de los pocillos.

Tras 30 minutos de incubación, la microplaca se lava con un tampón de lavado para retirar los componentes del suero que no han reaccionado. Una solución de inmunoglobulinas anti IgG humana conjugadas con peroxidasa reconoce los anticuerpos de clase IgG unidos a los antígenos inmovilizados.

Tras 30 minutos de incubación, el exceso de conjugado enzimático que no se ha unido específicamente se retira mediante el tampón de lavado.

Se añade a los pocillos una solución de sustrato cromogénico que contiene TMB. Tras 15 minutos de incubación se bloquea el desarrollo del color mediante la adición de la Solución de parada. El color de la solución se vuelve amarillo. La cantidad del color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos IgG presentes en la muestra original.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

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

Tampón fosfato 0,1 M, NaN₃ < 0,1%, suero humano

CAL0	REF DCE002/14906-0
CAL1	REF DCE002/14907-0
CAL2	REF DCE002/14908-0
CAL3	REF DCE002/14909-0
CAL4	REF DCE002/14910-0

2. Controles (2 frascos, 1,2 mL cada uno, listo para usar)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN₃ < 0,1%, suero humano

Control Negativo	REF DCE045/14901-0
Control Positivo	REF DCE045/14902-0

3. Diluyente de muestra (1 frasco, 100 mL)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN₃ < 0,1%

REF DCE053-0

4. Conjugado (1 frasco, 15 mL)

Anti h-IgG conjugado con peroxidasa de rabano (HRP), BSA 0,1%

REF DCE002/14902-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

CP antigénicos absorbidos en la microplaca

REF DCE002/14903-0

6. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (evítese el contacto con la piel)

REF DCE004-0

7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evítese el contacto con la piel)

REF DCE005-0

8. Solución de lavado conc. 10X (1 frasco, 50 mL)
Tampón fosfato 0,2M pH 7.4 **REF** DCE054-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

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

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8°C.

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierto, se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en el 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 reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN₃) o Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser

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

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

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente 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.
- **ATENCIÓN: se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa adecuadamente, podría contaminarse por agentes externos;** se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad necesaria exacta de conjugando y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática**, se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la fluidica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteinización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; **este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso.** Para tal fin, Dia.Metra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de

los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.

- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de parada. Tanto el sustrato como la Solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₄)

Puesto que no hay disponibles preparados de referencia internacional para los anticuerpos anti CP, el sistema de medición se calibra en unidades relativas arbitrarias. Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	5	10	20	80

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

6.2. Preparación de la muestra

Las matrices de elección para la determinación de los anticuerpos anti CP son suero o plasma humano.

Todas las muestras de suero o plasma deben prediluirse 1:100 con diluyente de muestras. Así, 10 µL de muestra pueden diluirse con 990 µL de diluyente de muestras.

Las muestras pueden conservarse refrigeradas a 2-8°C durante al menos 5 días. Para períodos de conservación más largos, hasta 6 meses, las muestras deberán congelarse a -20°C. Para evitar congelaciones y descongelaciones repetidas, las muestras deberían dividirse en alícuotas.

Los Controles son listo para usar.

6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (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 a 500 mL, teniendo cuidado para

transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.4. 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-C₄), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Controles	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₄	100 µL		
Controles		100 µL	
Muestra diluida		100 µL	
<p>Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.</p> <p>Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.</p> <p>Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.</p>			
Conjugado	100 µL	100 µL	
<p>Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.</p> <p>Lavados: siga las mismas instrucciones del punto anterior.</p>			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Incubar 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (22-28°C).</p>			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.</p>			

7. RESULTADOS

7.1. Curva de calibración

Para Anti CP IgG, el método de elección para el tratamiento de los resultados es un procesamiento de 4 parámetros con ejes lin-log para la densidad óptica y la concentración respectivamente. Además, se pueden usar una aproximación spline y coordenadas log-log. Sin embargo, se recomienda usar una curva Lin-Log.

En primer lugar, calcular la media de las densidades ópticas relativas a los calibradores. Usar una hoja de papel lin-log y trazar las densidades ópticas medias de cada calibrador frente a la respectiva concentración. Dibujar la curva que mejor se aproxime a todos los puntos de calibración. Los puntos de los calibradores también pueden unirse con segmentos de línea recta. La concentración de las muestras desconocidas puede determinarse por interpolación de la curva de calibración.

8. VALORES DE REFERENCIA

En un estudio sobre los valores normales realizado con muestras de suero procedentes de donantes sanos se han determinado los siguientes intervalos de normalidad con el ensayo Anti CP IgG:

	Anti CP IgG (AU/mL)
Negativo	< 10
Positivo	> 10

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.

Los resultados positivos deben verificarse con relación al estado clínico del paciente. Además, cada decisión relativa a la terapia debe tomarse individualmente. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos normal y patológico de anti CP sérico.

9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1. Especificidad

Un estudio efectuado en 93 muestras (45 positivas para AR por test a los Acs. anti CCP, 48 negativas donadores sanos) demostró una especificidad del 94%.

9.2. Sensibilidad

Un estudio efectuado en 93 muestras (45 positivas para AR por test a los Acs. anti CCP, 48 negativas donadores sanos) demostró una sensibilidad del 76%.

10. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vossenaar ER et al., Arthritis Rheum., 50, 3485, 2004
2. Masson-Bessière C et al., J.Immunol. 166, 4177, 2001
3. Anzilotti C et al., J. Rheumatol., 33, 647, 2006
4. Schellekens GA et al., Arthritis Rheum. 43, 155, 2000
5. Avouac J et al., Ann. Rheum. Dis. 65, 845, 2006
6. Lutteri L et al., Clin. Chim. Acta 76, 386, 2007
7. Pratesi F et al., Arthritis Rheum. 54, 733, 2006
8. Pratesi et al., Clin. Exp. Immunol. 164, 337, 2011

Ed. 09/2018

DCM149-2

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@Diаметra.com

Fabricado bajo licencia de Toscana Biomarkers -
Siena, Italy

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