

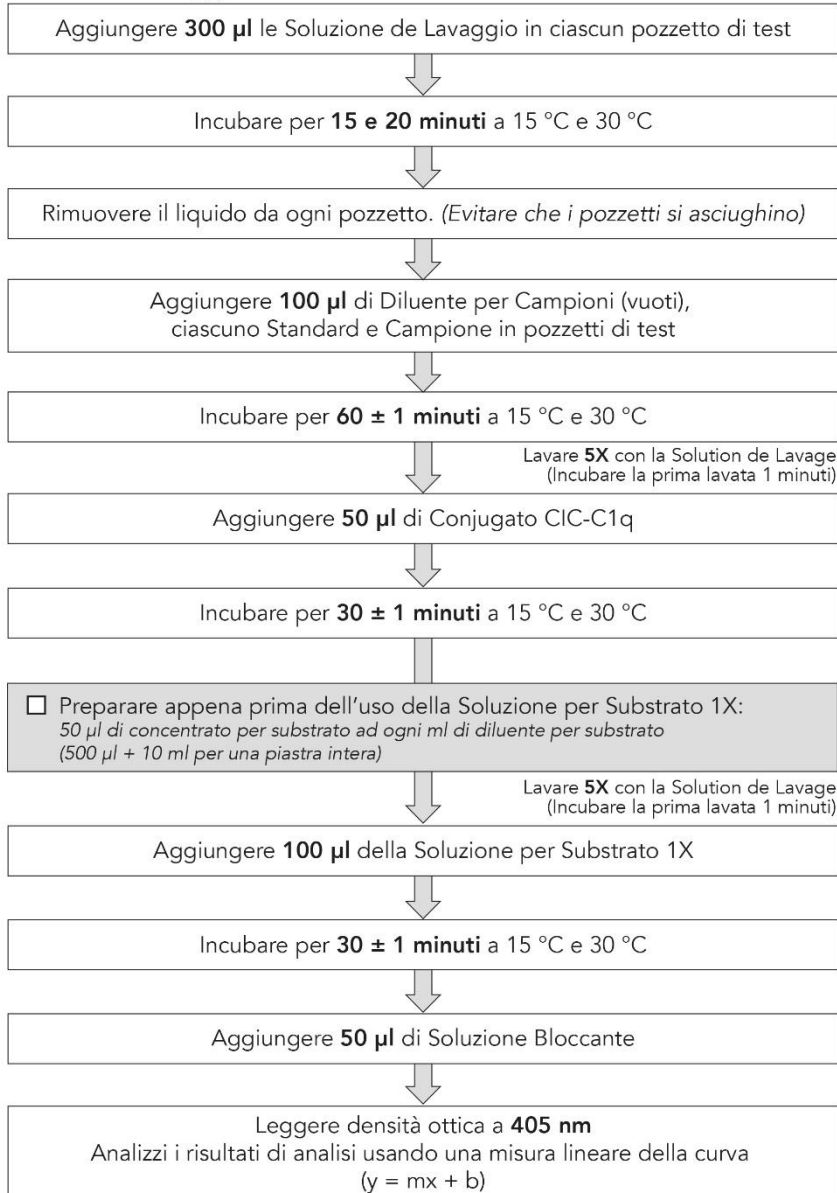
Per la rilevazione deimmunocomplessi nel siero o plasma umano

SOMMARIO

Preparato di il Campione ed il reagente

- Diluire la Soluzione di Lavaggio Concentrato 1:20 con acqua deionizzata.
- Reidrati ogni Standard con 2,0 ml di Reagente Idratante, mescoli completamente, ed lasciare reidratare 15 minuti. *(Sono stabili per 30 giorni.)*
- Diluire il Campioni 1:50 con il Diluente per Campioni di Complemento (10 µL + 490 µL).

Procedura del Saggio





FINALITÀ D'USO

Il saggio immunoenzimatico MicroVue CIC-C1q è progettato per il rilevamento degli immunocomplessi nel siero o nel plasma umani.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Per diversi anni sono state condotte ricerche sull'importanza degli immunocomplessi circolanti (CIC) e della loro correlazione con diverse malattie. La formazione di immunocomplessi costituisce un processo protettivo, in corso e solitamente benigno di un sistema immunitario normale. I CIC vengono eliminati dalla circolazione nell'ospite normale tramite numerosi processi biochimici, enzimatici e cellulari. La chiave per l'eliminazione di numerosi CIC è l'attivazione del percorso classico del complemento.

Tuttavia, in presenza di determinate malattie non ancora completamente note, gli immunocomplessi possono causare lesioni dipendenti dal complemento di vari organi e tessuti. Questa attivazione del complemento può dare inizio a una serie di eventi potenzialmente distruttivi nell'ospite, tra cui la produzione di anafilotossina, lisi di cellule, stimolazione leucocitaria ed attivazione di macrofagi ed altre cellule.¹ Quando gli immunocomplessi si fissano alle pareti dei vasi o alle membrane cellulari, può verificarsi la distruzione del tessuto normale, come avviene in alcuni casi di glomerulonefrite.

Alcune proprietà del CIC influenzano la potenziale patogenicità. Una particolare importanza va riconosciuta ai seguenti elementi: (1) natura, dimensione e concentrazione dell'antigene; (2) natura, dimensione e concentrazione dell'anticorpo e (3) tasso di formazione e clearance degli immunocomplessi.^{1,2}

Gli immunocomplessi circolanti sono stati misurati in diverse condizioni: infezioni, malattie autoimmuni, traumi e malattie con proliferazione neoplastica. Studi correnti evidenziano l'importanza della determinazione del CIC nella valutazione di alcune malattie e, in certi casi, nel controllo dell'efficienza di una terapia. Ciò è particolarmente vero in caso di lupus eritematoso sistemico (SLE) ed in alcune forme di artrite reumatoide (RA).^{3,4} La prima fase della malattia associata alla formazione di immunocomplessi era la malattia da siero, descritta agli inizi del 1900 da von Pirquet. A partire da quel periodo, livelli elevati di CIC sono stati descritti nelle malattie autoimmuni (SLE, sindrome correlata a SLE, RA), glomerulonefrite, malattie neoplastiche (morbo di Hodgkin, leucemia), infezioni batteriche (endocardite batterica subacuta [SBE], lebbra), infezioni parassitarie (malaria, schistosomiasi) e infezioni virali (epatite, mononucleosi).

Sono state descritte oltre 40 tecniche di saggio per la determinazione o la quantizzazione dei CIC. Sono stati descritti test quali il saggio Raji Cell, il test di deviazione C1q, il test di agglutinina eritrocitaria, le procedure di legame di C1q nella fase liquida, il saggio del fattore reumatoide, il test di precipitina PEG e saggi C1q nella fase liquida.^{1,5} Dal momento che la dimensione e le proprietà fisicochimiche del CIC variano in modo significativo, nessuno di questi saggi è stato accettato come standard. Nel 1978 uno studio d'équipe sponsorizzato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) determinò che non vi era alcun singolo metodo adatto a tutte le fasi sospette della malattia e consigliava di eseguire almeno due diverse tecniche di saggio, al fine di rilevare e misurare i CIC in modo adeguato.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il saggio immunoenzimatico MicroVue CIC-C1q si basa sul principio che il fissaggio dei CIC del complemento si lega alla proteina umana C1q purificata.

Nella prima fase, gli standard ed i campioni di siero o di plasma diluiti nel diluente per campioni di complemento vengono aggiunti ai pozzetti per la microtitolazione rivestiti con C1q e incubati. Durante questa incubazione, gli immunocomplessi che si legano a C1q creano un complesso con i pozzetti per microsaggio rivestiti con C1q. Per confermare un risultato CIC positivo, il campione può essere diluito nel diluente di conferma contenente un'elevata concentrazione di sale, con la capacità di impedire il legame di

C1c a C1q,^{6,7} quindi aggiunto ai pozzetti per la microtitolazione ed incubato. Le proteine del siero non legate vengono rimosse con un ciclo di lavaggio.

Nella seconda fase, l'IgG anti-umana di capra, coniugata con perossidasi estratto da radice di rafano (HRP) viene aggiunta in ogni pozzetto di test. Durante questa incubazione, il coniugato si lega agli immunocomplessi che ora sono legati ai pozzetti per microsaggi rivestiti con C1q. Il coniugato non legato viene rimosso con un ciclo di lavaggio.

Nella terza fase, ad ogni pozzetto viene aggiunto un substrato enzimatico. L'anticorpo coniugato con perossidasi estratto da radice di rafano legato reagisce con il substrato cromogeno formando un colore verde. Dopo l'incubazione, viene aggiunto un reagente per interrompere lo sviluppo del colore.

Le assorbanze standard e del campione esaminato (valori A_{405}) vengono misurate in modo spettrofotometrico. L'intensità del colore verde è proporzionale alla quantità di anticorpi IgG CIC che si legano al C1q alla fase solida. Tracciando i valori A_{405} ottenuti con ogni standard rispetto alla concentrazione si ottiene una curva standard. La concentrazione degli immunocomplessi presenti nel campione in esame viene determinata facendo riferimento alla curva standard. I risultati sono espressi in equivalenti di gamma globuline umane aggregate a caldo per ml ($\mu\text{g Eq/ml}$).

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Il kit per saggio immunoenzimatico CIC-C1q contiene i seguenti materiali e reagenti:

A	Standard CIC-C1q	Codici A9503-A9505	2 pezzi, 2 ml
B	(liofilizzato) Una volta ricostituito, ciascuno contiene una quantità accertata di gamma globuline		
C	umane aggregate a caldo (HAGG), in PBS (soluzione salina tamponata con fosfato) e il 2,5% di stabilizzatori		
1	Piastra per microsaggio	Codice A9500	12 pezzi
	per 96 pozzetti, con fissatore e supporto contenente strisce da otto pozzetti rivestiti con proteina C1q umana purificata in una busta protettiva risigillabile		
2	Soluzione bloccante	Codice A3673	6 ml
	Contiene 250 mM di acido ossalico		
3	Soluzione di lavaggio concentrata 20X	Codice A9957	2 pezzi, 50 ml
	Ogni liquido ottenuto contiene soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), lo 1,0% di Tween-20® e lo 0,035% ProClin® 300		
4	Diluyente per campioni di complemento	Codice A3670	50 ml
	Contiene PBS, il 2,5% di stabilizzatori e lo 0,035% di ProClin 300		
5	Diluyente per substrato	Codice A3672	25 ml
	Contiene 0,1 M di tampone citrato e lo 0,05% di H ₂ O ₂		
6	Concentrato per substrato	Codice A3671	1,5 ml
	Contiene lo 0,7% di 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6 acido sulfonico), sale di diammonio		
7	Coniugato CIC-C1q	Codice A9506	2 pezzi, 3 ml
	IgG anti umane (capra) coniugate con perossidasi sospese in un tampone stabilizzante di perossidasi estratto da radice di rafano		
8	Reagente di idratazione	Codice A3675	25 ml
	Contiene lo 0,035% di ProClin 300		
9	Diluyente di conferma	Codice A9511	2 pezzi, 10 ml
	Contiene PBS, 2,5% di stabilizzatori, 1,2 M di NaCl, 0,035% di ProClin 300		

Tween-20® è un marchio di fabbrica di ICI Americas Inc.

ProClin® è un marchio registrato di Rohm and Haas Company.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Timer (60 minuti)
- Calcolatrice o altro metodo di calcolo per la convalida del saggio
- Piastre per microsaggio pulite e non utilizzate e/o provette e cestelli
- Contenitore per la diluizione del tampone di lavaggio
- Flacone di lavaggio o altro sistema di lavaggio per saggio immunologico
- Pipetta multicanale regolabile (8 o 12 canali) o micropipette a ripetizione (opzionale)
- Pipette pulite, 1 ml, 5 ml e 10 ml
- Micropipette e punte per pipette
- Lettore per piastra in grado di effettuare letture alla densità ottica di A_{405} tra 0,0 e 2,0
- Acqua deionizzata o distillata

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *In vitro*.
- Trattare i campioni come materiale a potenziale rischio biologico. Seguire le precauzioni generali durante la manipolazione del contenuto di questo kit e di qualunque campione paziente.
- Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con le normative federali, statali e locali.
- Usare i reagenti forniti come un'unità integrale prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.
- Indossare adeguati indumenti di protezione, guanti e protezioni per occhi/viso durante la manipolazione del contenuto di questo kit.
- Conservare i reagenti del saggio come indicato.
- Non usare le strisce rivestite se la busta protettiva è danneggiata.
- Sottoporre a test ciascun campione in duplicato.
- Come conservante viene utilizzato ProClin 300. Il contatto o l'ingestione accidentale di tamponi o reagenti contenenti ProClin può causare irritazioni alla cute, agli occhi o alla bocca. Adottare una buona pratica di laboratorio per ridurre l'esposizione. In presenza di sintomi, consultare un medico.
- Si consiglia l'uso di pipette multicanale o di pipettatori a ripetizione per garantire la fornitura veloce dei reagenti.
- Per una misurazione accurata dei campioni, aggiungere accuratamente i campioni e gli standard. Pipettare attentamente, usando esclusivamente apparecchiature calibrate.
- L'adeguata raccolta e conservazione dei campioni per il test sono essenziali per ottenere risultati accurati.
- Evitare la contaminazione microbica o crociata di campioni, reagenti o materiali. In caso di contaminazione si possono ottenere risultati errati.
- Non utilizzare un pozzetto per microsaggio per più di un test.
- Disinfettare tutti i campioni, i reagenti ed i materiali immergendoli per almeno 30 minuti in una soluzione di 1:10 di candeggina per uso domestico (ipoclorito di sodio) o in autoclave a 121°C per 30 minuti a 15 psi.
- L'impostazione di tempi e temperature di incubazione diversi da quelli indicati nella sezione relativa alle procedure può fornire risultati errati.
- Il concentrato per substrato è sensibile alla luce. Evitare l'esposizione prolungata alla luce diretta. Quando non sono in uso, conservare i reagenti in un luogo buio.
- Dopo l'inizio del saggio, evitare che i pozzetti per microsaggio si asciughino.
- Quando si aggiungono o si aspirano i liquidi dai pozzetti per microsaggio, non raschiare né toccare il fondo dei pozzetti.
- Campioni inattivati a caldo, iperlipemici o contaminati possono fornire risultati errati.
- Per evitare la formazione di aerosol durante il lavaggio, utilizzare un'apparecchiatura per aspirare il liquido di lavaggio in un flacone contenente candeggina per uso domestico.
- Questo saggio può essere eseguito con qualunque metodo di lavaggio convalidato.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo la manipolazione.
- Per ulteriori informazioni su simboli di pericolo, sicurezza, manipolazione e smaltimento dei componenti di questo kit, consultare la scheda di sicurezza (SDS) reperibile su quidel.com.

CONSERVAZIONE

I kit chiusi devono essere conservati a 2°C e 8°C. Dopo l'apertura del kit, la soluzione di lavaggio concentrata 20X e il reagente idratante possono essere conservati a 2°C e 30°C.

Dopo avere scelto i reagenti o i materiali da usare nel saggio, riportare immediatamente i reagenti inutilizzati alle rispettive temperature di conservazione. Prima dell'uso portare i reagenti ed i materiali a temperatura ambiente (15°C e 30°C).

INDICAZIONE DI INSTABILITÀ O DETERIORAMENTO DEI REAGENTI

Il concentrato per substrato può subire una variazione di colore che va dalla mancanza di colore a verde pallido o scuro. Questa condizione non influenza le prestazioni. Tuttavia, la soluzione per substrato appena preparata deve essere incolore oppure tendere al verde pallido. Un colore verde scuro indica che la soluzione per substrato preparata ha subito un deterioramento, pertanto è necessario eliminarla e preparare una nuova soluzione per substrato in un contenitore in vetro pulito.

L'intorbidamento o l'alterazione del colore della soluzione di lavaggio diluita indica un deterioramento del reagente. Se ciò accade, gettare la soluzione.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Manipolare e smaltire tutti i campioni seguendo le precauzioni generali.

Il saggio necessita di almeno 10 µL di siero o di plasma EDTA. Tutti i campioni devono essere prelevati in modo sterile e preparati secondo tecniche standard per l'esame in laboratorio.⁹ Non inattivare i campioni a caldo. Eliminare qualunque particolato dai campioni eseguendo una centrifuga a bassa velocità prima di effettuare il test.

I campioni possono essere conservati a 2°C e 8°C per un massimo di 7 giorni. Nel caso in cui i campioni debbano essere conservati per periodi più lunghi, è necessario congelarli a -20°C o a temperature inferiori, in un congelatore non a sbrinamento automatico.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE

Consultare la Tabella 1 per ottenere informazioni sulla quantità di soluzione per substrato e strisce per microsaggio necessarie in base al numero di test. Dopo avere prelevato i reagenti ed i materiali necessari, riportare gli elementi inutilizzati alle rispettive temperature di conservazione (fare riferimento alla sezione *CONSERVAZIONE*). **Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i materiali per il saggio a temperatura ambiente (15°C e 30°C).**

1. Soluzione di lavaggio

Miscelare la soluzione di lavaggio concentrata 20X capovolgendo il flacone diverse volte. Se la soluzione di lavaggio concentrata 20X è stata conservata a 2°C e 8°C, possono essersi formati dei cristalli. Per dissolvere i cristalli, scaldare il flacone a bagnomaria ad una temperatura di 37°C e 50°C fino allo scioglimento di tutti i cristalli. Miscelare completamente. Preparare la soluzione di lavaggio per i pozzetti per microsaggio diluendo l'intero contenuto di un flacone di soluzione di lavaggio concentrata 20X fino a raggiungere un totale di un litro, con acqua distillata o deionizzata. Miscelare completamente. La soluzione di lavaggio è stabile per 30 giorni se conservata in un contenitore pulito a 2°C e 8°C. In caso di alterazione del colore o di intorbidimento, gettare il reagente.

2. Selezione delle strisce per microsaggio

Togliere il fissatore di strisce dalla piastra montata. Stabilire il numero di strisce necessarie per il saggio facendo riferimento alla Tabella 1. Togliere le strisce non necessarie e riporle nel contenitore di conservazione, risigillare il contenitore e riportarlo ad una temperatura di 2°C e 8°C. Fissare le strisce da usare nel saggio riposizionando saldamente il fissatore di strisce nella piastra per microsaggio.

3. Ricostituzione dello standard CIC-C1q

Aggiungere 2,0 ml di reagente idratante nelle fiale standard, A-C. Consentire la reidratazione degli standard liofilizzati per almeno 15 minuti, quindi miscelare completamente. Evitare la formazione di schiuma o bolle durante la miscelazione. Gli standard ricostituiti sono stabili per 30 giorni se conservati a 2°C e 8°C.

4. Diluizione dei campioni

Attenzione: tutti i campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infetto. Non utilizzare campioni inattivati a caldo o contaminati. Determinare il numero (N) di campioni da esaminare. Etichettare le provette da 1 a N e registrare sulla scheda fornita la corrispondenza tra i campioni e le provette. Preparare una diluizione di 1:50 di ogni campione usando il diluente per campioni di complemento (es. 10 µL di campione di test miscelato con 490 µL di diluente dei campioni per complemento). Miscelare completamente evitando la formazione di schiuma e bolle. Non conservare né riutilizzare i campioni diluiti. Se la concentrazione misurata degli immunocomplessi in un campione è maggiore della concentrazione di Standard C e si desidera un risultato finale più accurato, si consiglia di ripetere il test del campione con una diluizione di 1:200 (diluizione quadrupla della diluizione di 1:50). **Nota:** I campioni che presentano concentrazioni misurate di CIC minori dello Standard C non devono essere diluiti ulteriormente e riesaminati.

5. Aggiunta di campioni diluiti ai pozzetti per microsaggio

Per aggiungere i campioni diluiti, gli standard, i controlli ed il tampone nei pozzetti è possibile usare uno dei due metodi. Fare riferimento alla fase 3 della sezione Procedura del saggio. In caso di piccole corse, in cui vengono esaminati solo pochi campioni, è possibile aggiungere i campioni diluiti e gli altri reagenti direttamente al pozzetto assegnato tramite l'uso di una micropipetta (100 µL/pozzetto). In caso di corse piccole o grandi, ma soprattutto per corse di maggiori dimensioni, è opportuno utilizzare un pipettatore multicanale per l'aggiunta dei campioni come indicato di seguito. **(Quest'ultima procedura può essere utilizzata anche per aggiungere comodamente il coniugato, il substrato e la soluzione bloccante).**

Al fine di caricare gli standard, i campioni di controllo e i campioni diluiti nei pozzetti per microsaggio nel modo più rapido consentito, è possibile adottare una procedura chiamata "replicazione delle piastre". Invece di aggiungere 100 µL di ogni standard, campione di controllo o diluito nei singoli pozzetti rivestiti con C1q, è possibile aggiungere 120-130 µL di ogni soluzione ai singoli pozzetti in una piastra vuota (non fornita) in base al tipo saggio immunoenzimatico finale desiderato. Dopo avere aggiunto tutte le soluzioni da esaminare nei pozzetti per microsaggio nella piastra vuota, trasferire rapidamente 100 µL da ogni pozzetto vuoto ai pozzetti rivestiti con C1q usando un micropipettatore multicanale. Per eliminare la possibilità di contaminazione crociata, è necessario sostituire le punte delle pipette ogni volta che cambia la composizione dei campioni da trasferire.

6. Diluente di conferma (opzionale)

Se si desidera la conferma, determinare il numero (N) di campioni da confermare. Etichettare le provette da 1c a Nc e registrare sulla scheda fornita la corrispondenza tra i campioni e le provette. Preparare la diluizione corretta (1:50 o 1:200) usando il diluente di conferma. Un campione diluito con diluente di conferma deve essere esaminato contemporaneamente alla stessa diluizione del campione nel diluente per campioni di complemento.

7. Preparazione della soluzione per substrato

Preparare appena prima dell'uso. Determinare il volume necessario della soluzione per substrato dalla Tabella 1. Preparare la soluzione per substrato aggiungendo 50 µL del concentrato per substrato per ml di diluente per substrato. Miscelare completamente.

Tabella 1
Requisiti Del Saggio

Pozzetti ¹	Strisce da 8 pozzetti	Soluzione substrato (ml)	Diluyente per substrato (ml)	Concentrato per substrato (µL)
16	2	1,6	2,0	100
24	3	2,4	3,0	150
32	4	3,2	4,0	200
40	5	4,0	5,0	250
48	6	4,8	5,0	250
56	7	5,6	6,0	300
64	8	6,4	7,0	350
72	9	7,2	8,0	400
80	10	8,0	9,0	450
88	11	8,8	9,0	450
96	12	9,6	10,0	500

¹Determinare il numero di campioni da esaminare ed aggiungere sette (7) pozzetti per i tre standard (da esaminare in duplicato) ed un pozzetto vuoto. Se possibile, si consiglia di esaminare gli standard ed i controlli in duplicato in strisce per microsaggio separate

PROCEDURA DEL SAGGIO

Prima di iniziare il saggio, leggere completamente l'inserto fornito con il prodotto.

Prima di procedere, fare riferimento a PREPARAZIONE DEI REAGENTI.

Durante la manipolazione afferrare la piastra saldamente per evitare la rimozione accidentale del fissatore di strisce.

1. Registrare le posizioni del pozzetto corrispondenti a tutti i campioni del test e standard, come pure il numero di lotto indicato nelle etichette delle fiale. Etichettare un angolo della piastra per microsaggio al fine di stabilirne l'orientamento
2. Preparare le strisce per microsaggio come indicato di seguito:
 - a. Reidratare i pozzetti per microsaggio aggiungendo circa 300 µL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto usando un flacone di lavaggio o un dispositivo automatico di lavaggio piastre.
 - b. Incubare a temperatura ambiente (15°C e 30°C) per 15-20 minuti.
 - c. Rimuovere il liquido dai pozzetti.
 - d. Capovolgere la piastra e picchiettare energicamente due volte sulla carta assorbente per eliminare eventuali residui di liquido. **Evitare che i pozzetti si asciughino.**
3. Aggiungere 100 µL di diluyente per campioni di complemento nei pozzetti che verranno usati per confronto con il vuoto del lettore delle piastre.
4. Aggiungere 100 µL di ciascuno standard CIC-C1q (A, B, C) ricostituito nei pozzetti duplicati.
5. Aggiungere 100 µL di ciascun campione diluito nel pozzetto per microsaggio assegnato. Fare riferimento alla fase 5 della sezione *PREPARAZIONE DEL REAGENTE*.
6. Incubare a temperatura ambiente (15°C e 30°C) per 60 ± 1 minuti.
7. Lavare i pozzetti per microsaggio come indicato di seguito:

Nota: Il lavaggio dei pozzetti per microsaggio può essere eseguito manualmente o tramite un dispositivo automatico di lavaggio delle piastre.

 - a. Dopo l'incubazione descritta nella fase 6 (o nella seguente fase 9), rimuovere il contenuto da ciascun pozzetto.
 - b. Aggiungere circa 300 µL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto usando un flacone di lavaggio o un dispositivo di lavaggio piastre automatico.
 - c. Incubare i pozzetti per 1 minuto a temperatura ambiente (15°C e 30°C).
 - d. Rimuovere il contenuto da ciascun pozzetto.
 - e. Aggiungere a ciascun pozzetto 300 µL di soluzione di lavaggio.
 - f. Rimuovere il contenuto da ciascun pozzetto.
 - g. Ripetere le fasi e-f per altre tre volte.**

- h. Dopo il quinto ciclo di lavaggio, capovolgere la piastra e picchiettare energicamente due volte sulla carta assorbente per eliminare eventuali residui di liquido.
8. Utilizzando una pipetta multicanale o a ripetizione, dispensare 50 µL di coniugato in ogni pozzetto di test lavato, compresi i pozzetti vuoti.
 9. Incubare le strisce per microsaggio a temperatura ambiente (15°C e 30°C) per 30 ± 1 minuti. Durante questo periodo di incubazione, preparare la soluzione per substrato (fare riferimento alla fase 8 della sezione *PREPARAZIONE DEL REAGENTE*).
 10. Lavare i pozzetti per microsaggio dopo l'incubazione di 30 minuti (fase 9), come descritto nella fase 7 della sezione *PROCEDURA DEL SAGGIO*.
 11. Immediatamente dopo il lavaggio, dispensare 100 µL della soluzione per substrato appena preparata in ciascun pozzetto, compresi quelli vuoti.
 12. Incubare le strisce per microsaggio a temperatura ambiente (15°C e 30°C) per 30 ± 1 minuti.
 13. Aggiungere 50 µL di soluzione bloccante a ciascun pozzetto per arrestare la reazione enzimatica. La soluzione bloccante deve essere aggiunta nei pozzetti secondo lo stesso ordine e lo stesso tasso della soluzione per substrato. Picchiettare delicatamente sulla piastra per spargere il colore in modo uniforme.
 14. Determinare la lettura dell'assorbanza a 405 nm per ogni pozzetto di test entro un'ora dall'aggiunta della soluzione bloccante (fase 13), effettuando una correzione in base ai vuoti, conformemente al sistema spettrofotometrico in uso.
 15. Smaltire i residui di campioni diluiti, di substrato e le strisce per microsaggio usate (fare riferimento alla fase 3 della sezione *AVVERTENZE E PRECAUZIONI*). Conservare il supporto e il fissatore per strisce per uso futuro.

METODO DI CONFERMA CONSIGLIATO

Se è necessaria una conferma indipendente di un risultato positivo, o se un risultato positivo non è coerente con l'interpretazione clinica, il campione positivo può essere esaminato utilizzando un test di conferma. Non è possibile confermare un risultato negativo. Il metodo di conferma utilizza un diluente per campioni (diluente di conferma), contenente un'elevata concentrazione di cloruro di sodio.^{6,7} Per confermare un risultato positivo, diluire un'aliquota del campione (1:50 o 1:200) nel diluente di conferma e, allo stesso modo, diluire una seconda aliquota nel diluente per campioni di complemento. Entrambi i campioni vengono quindi esaminati conformemente alle normali procedure di saggio CIC-C1q.

Per ulteriori informazioni, fare riferimento alle sezioni *PREPARAZIONE DEL REAGENTE* e *INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI*.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Una buona pratica di laboratorio consiglia di includere in ogni saggio sia i controlli positivi che i controlli negativi. A tale scopo, i controlli per il saggio MicroVue CIC-C1q sono disponibili presso Quidel (controlli CIC-C1q, codice A013) e devono essere utilizzati conformemente ai rispettivi inserti.

Oltre ai controlli, questo saggio fornisce anche un *METODO DI CONFERMA CONSIGLIATO* e i parametri di *CONVALIDA*.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcoli

La curva standard viene generata utilizzando i valori A_{405} da cui sono stati sottratti quelli vuoti di ogni standard (sull'asse y) e la concentrazione assegnata a ciascuno standard (lungo l'asse x). È necessario che la curva standard sia conforme ai requisiti di convalida. La maggior parte dei computer e delle calcolatrici è in grado di eseguire tale calcolo. Un esempio di curva standard tipica è mostrato in Figura 1.

La concentrazione $\mu\text{g Eq/ml}$ per ciascun campione viene calcolata dalla curva standard utilizzando l'analisi di regressione lineare. I valori calcolati determinati in base alla curva standard devono essere valutati rispetto al cut-off per i risultati positivi. Vedere l'interpretazione più oltre.

Regolazione del fattore di diluizione. La concentrazione di CIC assegnata è stata stabilita ipotizzando una diluizione del campione di 1:50. Se per il dosaggio è stata utilizzata una diluizione maggiore del campione, l'utente deve moltiplicare il risultato calcolato per il fattore di diluizione appropriato. Ad esempio, se la diluizione del campione sottoposto a dosaggio era di 1:200, il risultato calcolato deve essere moltiplicato per 4.

Calcolo del test di conferma. Per confermare un risultato positivo, la concentrazione di immunocomplesso [CIC] determinata nel campione diluito nel diluente di conferma viene divisa per la concentrazione dell'immunocomplesso misurata nel campione diluito nel diluente per campioni di

$$\text{rapp} = \frac{[\text{CIC}] \text{ nel diluente di conferma}}{[\text{CIC}] \text{ nel diluente per campioni di complemento}}$$

Convalida

Determinare la pendenza, l'intersezione y e il coefficiente di correlazione della linea best-fit derivata. I valori devono essere compresi nei seguenti intervalli per qualificare il saggio.

Coefficiente di correlazione (r): Maggiore di 0,95
Pendenza (m): Da 0,022 a 0,056
Intersezione y (b): Da (-)0,108 a (+)0,238

Interpretazione

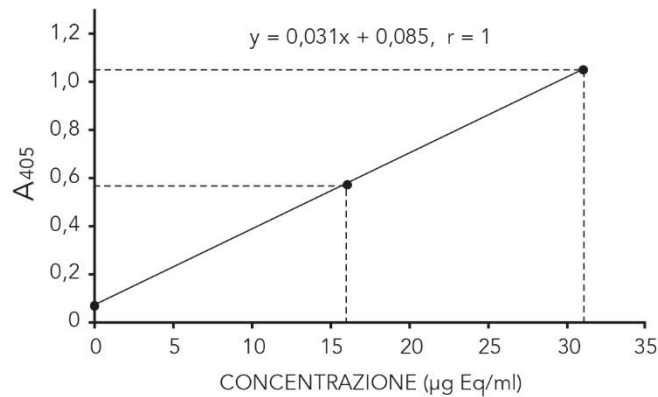
Risultati negativi: I valori inferiori a $4.0 \mu\text{g Eq/ml}$ vengono considerati negativi per livelli significativi di CIC.

Risultati positivi: I valori maggiori o uguali a $4.0 \mu\text{g Eq/ml}$ vengono considerati positivi per livelli significativi di CIC.

Risultati di conferma: se il rapporto è inferiore a 0,7, il risultato CIC positivo è confermato. In altri termini, una riduzione maggiore del 30% conferma un risultato positivo.

Talvolta i campioni positivi potranno non essere confermati. La mancata conferma dei campioni può dipendere dai seguenti motivi: (1) campioni trattati erroneamente (es. contaminati o inattivati a caldo) oppure (2) campioni contenenti autoanticorpi anti C1q. Tali campioni non sono necessariamente negativi per il CIC. Il materiale che causa il risultato falso positivo apparente può mascherare dei CIC concomitanti che, se presenti da soli, fornirebbero un risultato CIC positivo confermabile.

Figura 1
Esempio di curva standard



Campione	(A ₄₀₅)	µg Eq/ml
Standard A	0,09	0.2
Standard B	0,57	15.6
Standard C	1,05	31.1
Campione 1	0,19	3.4
Campione 2	0,82	23.7
Campione 3	0,40	10.2
r = 1,00		m = 0,031 b = 0,085

LIMITI DELLA PROCEDURA

1. L'inattivazione a caldo dei campioni può fornire risultati falsi positivi. Poiché questo test misura aggregati di IgG umane in modo non selettivo, il prelievo e l'elaborazione dei campioni devono evitare il verificarsi di condizioni che promuovono l'aggregazione di IgG.
2. Il saggio immunoenzimatico MicroVue CIC-C1q è stato usato per esaminare i campioni prelevati come siero o plasma in anticoagulante EDTA. Non sono stati verificati test su altri tipi di anticoagulanti.

RISULTATI ATTESI

Tramite il saggio immunoenzimatico MicroVue CIC-C1q sono stati misurati gli immunocomplessi circolanti (CIC) presenti nei sieri provenienti da 312 soggetti. Centosei (106) sieri sono stati prelevati da soggetti normali, asintomatici. La concentrazione di CIC media era pari a 2,1 µg Eq/ml (D.S. = 1,9).

I campioni ottenuti da 206 pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (SLE), artrite reumatoide (RA) o da altre patologie sono stati esaminati tramite il saggio immunoenzimatico MicroVue CIC-C1q e tramite un altro kit per saggio immunoenzimatico disponibile in commercio. La concordanza generale tra i due metodi di test è risultata pari all'87%.

All'interno della popolazione sopra indicata, sono stati esaminati ottantuno (81) pazienti affetti da SLE e trentatre (33) pazienti affetti da RA. Per quanto riguarda questi campioni, i due kit hanno mostrato una concordanza pari all'82%. Questi risultati vengono presentati in Tabella 2.

Tabella 2
Dati Comparativi Per Gruppi Di Pazienti Specific

Risultati del test MicroVue	-	+	-	+
Risultati del test alternativo	-	+	+	-
Pazienti affetti da RA	18	9	3	3
Pazienti affetti da SLE	40	23	15	3
Altro	0	90	2	0

CARATTERISTICHE DEL METODO

Precisione

Per la standardizzazione del saggio è stato utilizzato uno standard per immunocomplesso fornito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) con IgG aggregate a caldo. Per testare l'accuratezza del saggio sono state esaminate cinque diluizioni dello standard OMS in triplicato, in nove corse tramite il kit MicroVue. I valori esaminati sono stati determinati come previsionali delle concentrazioni standard attese (coefficiente di determinazione = 0,97).

Per dimostrare l'idoneità dei campioni di plasma al saggio, sono stati confrontati quarantuno (41) campioni di siero e plasma accoppiati (anticoagulante EDTA) provenienti da pazienti affetti da SLE e RA. Non sono state osservate differenze significative tra i risultati del siero e quelli del plasma ($\alpha = 0,05$).

Riproducibilità

Tre campioni di siero e tre standard sono stati esaminati in nove corse del saggio in tre diversi lotti di kit. Ciascuno standard è stato testato in triplice copia durante ciascuna corsa. Ciascun campione di siero è stato esaminato in un singolo pozzetto durante ogni corsa; la variazione media tra ogni corsa relativamente ai campioni e agli standard è mostrata in Tabella 3 come variazione inter-analisi. La variazione media all'interno di ciascuna corsa per gli standard viene mostrata nella Tabella 3 come variazione intra-analisi.

Tabella 3
Riproducibilità del Saggio

	Media (Eq/ml)	D.S. intra-analisi (% CV)	D.S. inter-analisi (% CV)
Campione 1	30	NT	3.1 (10)
Campione 2	7	NT	2.6 (37)
Campione 3	0	NT	0.3 (N/A)
Standard 1	37	3.2 (9)	3.9 (11)
Standard 2	20	2.1 (10)	1.8 (9)
Standard 3	0	0.1 (N/A)	0.0 (N/A)

NT = non testato N/A = non applicabile

Sensibilità

La sensibilità dell'analite del saggio immunoenzimatico MicroVue CIC-C1q è pari a 1,0 µg Eq/ml.

Specificità

I CIC sono stati esaminati in centosei (106) campioni di siero e plasma prelevati da soggetti normali, asintomatici. La specificità globale del saggio è risultata pari al 94%.

ASSISTENZA

Per servizi al di fuori degli Stati Uniti, contattare il distributore locale. Le ulteriori informazioni circa Quidel, i nostri prodotti ed i nostri distributori possono essere trovate sul nostro Web site a www.quidel.com.

BIBLIOGRAFIA

1. McDougal, J.S, McDuffie, F.C., Immune Complexes in Man: Detection and Clinical Significance, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 24, p. 1, 1985.
2. Endo, L., Corman, L.C., Panush, R.S., Clinical Utility of Assays for Circulating Immune Complexes, *Medical Clinics of North America*, Vol. 69, No. 4, p. 623, July 1985.
3. Abrass, C.K., Nies, K.M., Louie, J.S., Border, W.A., Glasscock, R.J., Correlation and Predictive Accuracy of Circulating Immune Complexes with Disease Activity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus, *Arthritis Rheum.*, Vol. 23, p. 273, 1980.
4. Duquesnoy, B., Circulating Immune Complexes and Complement in Rheumatoid Arthritis, *Ann. Biol. Clin.*, Vol. 42, p. 71, 1984.
5. Theofilopoulos, A.N., The Raji, Conglutinin, and Anti-C3 Assays for the Detection of Complement-Fixing Immune Complexes, *Methods in Enzymology*, Vol. 74, p. 511, 1981.
6. Agnello, V., Winchester, R.J., Kunkel, H.G., Precipitin Reactions of the C1q Component of Complement with Aggregated Gamma-Globulin and Immune Complexes in Gel Diffusion, *Immunology*, Vol. 19, p. 909, 1970.
7. Hack, C.E., Huijbregts, C.C., Paardekooper, J., Influence of Ionic Strength, EDTA Concentration, Endogenous C1q and Polyanions on the ¹²⁵I-C1q-Binding Test, *J. Immunol. Meth.*, Vol. 72, p. 197, 1984.
8. Richardson, J.H., Barkley, W.E., *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, p. 11–13, 1984.
9. Davidson, I., et al., *The Blood*, p. 1 20. in Cl. Davidson and J.B. Henry (ed.), Todd-Sanford Clinical Diagnosis, W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, 1969.

MicroVue è un marchio commerciale di Quidel Corporation. Qualunque altro marchio commerciale riportato nel presente documento appartiene al rispettivo proprietario e il suo utilizzo in questo contesto non implica la sponsorizzazione né il supporto a prodotti o servizi.

REF A001 – MicroVue CIC-C1q Eq EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PIA001004IT00 (09/21)

GLOSSARIO

REF

Numero di catalogo



Marcio CE di conformità

EC REP

Rappresentante autorizzato
nella Comunità Europea

LOT

Codice lotto



Data di scadenza



Produttore



Limitazione di temperatura



Uso previsto



Leggere le istruzioni e di
etichettatura per l'uso



Rischio biologico

IVD

Per uso diagnostico *In Vitro*



Contenuto sufficiente per 96 determinazioni

CONT

Contenuto / Contiene

CONTROL

Controllo
