

1	Intended use
2	Summary and explanation
3	Principle of the assay
4	Reagents
5	Caution
6	Storage and stability
7	Specimen collection and preparation
8	Methodology
9	Ring measurement and result processing
10	Limitations of procedure
11	Expected values
12	Performance characteristics
13	Bibliography
14	Summary of procedure

Deutsch	Seite
Français	Cf. page
Español	Página
Português	Veja páginas
Italian	Pagina

TOTAL HAEMOLYTIC COMPLEMENT

For *in-vitro* diagnostic use only

Product Code: RC001.1/2/3

Product manufactured by:
The Binding Site Group Ltd, PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, U.K.
www.bindingsite.co.uk
Telephone: +44(0)121 436 1000
Fax: +44(0)121 430 7061
e-mail: info@bindingsite.co.uk

FDA (USA) Information
Analyte ID 1046
Test System 61450
Complexity Cat. High



1 INTENDED USE

This kit is intended for measuring human haemolytic complement activity by the classical pathway in human serum, as an aid in diagnosis of immunological disorders, especially those associated with complement component deficiencies.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

The classical complement pathway is a cascade of reactions involving 11 proteins, which leads to lysis of cell membranes and ultimately to cell death.

Activation of the classical complement pathway is brought about by the interaction of antibody-antigen complexes with complement C1, which then activate C4 causing in turn activation of C2, C3 and C5. Activated C5 (C5b) binds C6, C7, C8 and 12 to 18 molecules of C9 to form a large complex known as the membrane attack complex (MAC). It is this complex which disrupts cell membranes leading to cell death. (refs. 1-6)

Decreased complement activity may be caused by deficiencies of any of the individual complement components, hereditary or acquired, and can be associated with hereditary complement deficiencies, glomerulonephritis, systemic lupus erythematosus (SLE), vasculitis and a number of non-immunological conditions. (ref. 7)

3 PRINCIPLE OF THE ASSAY

The method involves serum containing active complement components diffusing radially at 2-6°C from a cylindrical well through an agarose gel containing sheep erythrocytes sensitised with a rabbit anti-sheep erythrocyte antibody, termed 'Haemolysin'. During this diffusion period complement C1 is fixed by the Haemolysin. When incubated at 37°C the complement cascade proceeds, leading to lysis of the sheep erythrocytes, resulting in a clear zone, the size of which is dependent on the original complement activity in the serum.

By measuring the zones of lysis produced by a number of sera of known complement activity a calibration curve may be constructed by plotting the diameter against complement activity on semi-log graph paper. The complement activity of an unknown sample may then be determined by measuring the zone of lysis and reading off the calibration curve providing the ring quality is acceptable (see limitations of procedure, section 10).

4 REAGENTS

- 4.1 Haemolytic complement plates (supplied in resealable foil pouches). These contain sensitised sheep erythrocytes. Up to fourteen samples can be run per plate (including calibrators and controls). Preservative: 0.02% sodium azide.
- 4.2 Calibrators. These are supplied lyophilised. The complement activity is given on the vial label.
- 4.3 Controls. These are supplied lyophilised. The expected complement activity is given on the vial label.

5 CAUTION

All donors of human materials supplied in this kit have been serum tested and found negative for Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to hepatitis C virus and human immunodeficiency virus (HIV1 and HIV2). However, these tests cannot guarantee the absence of infective agents. Proper handling and disposal methods should be established as for all potentially infective material and only personnel adequately trained in such methods should be permitted to perform the procedures.

The plates contain sodium azide as a preservative and must be handled with caution-do not ingest or allow contact with the skin or mucous membranes. If contact does occur wash with a large volume of water and seek medical advice. Explosive metal azides may be formed with the lead and copper plumbing; on disposal of reagent, flush with a large volume of water to prevent azide build up.

Adherence to the given procedure is recommended. The validity of results obtained using methods other than those stated cannot be guaranteed. Reagents from different batch numbers of kits are NOT interchangeable. If large numbers of tests are performed, care should be taken to ensure that all reagents are from the same batch.

6 STORAGE AND STABILITY

The unopened kits should be stored at 2-8°C and can be used until the expiry date given on the kit box label. DO NOT FREEZE. The haemolytic complement plates have a shelf life limited by the survival of the sheep erythrocytes and should be kept refrigerated wherever possible. The agarose gel will be destroyed by freezing, therefore keep plates away from cooling elements in refrigerators. Unopened, plates should be stored flat and upside down (pouch label uppermost) to prevent condensation accumulating in the wells. Handle plates with care to prevent gel damage.

Once reconstituted, calibrators and controls should be used immediately. If storage of reconstituted material is required, e.g. for use with part-used plates, aliquots should be frozen, at -20°C or below.

7 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Complement activity may be activated in improperly handled samples leading to erroneous results. The correct collection, processing, storage and shipment of specimens is therefore essential.

Use fresh serum samples. Microbially contaminated, haemolysed and very lipaemic serum samples or those containing particulate matter should not be used as incomplete lysis may occur. Blood samples should be collected by venepuncture, and allowed to clot at room temperature (18-24°C) for approximately 60 minutes. Centrifuge the sample and transfer to a clean tube. Store for a maximum of 4 hours at 2-8°C or on ice prior to assay. For longer term storage freeze samples at -70°C or below. Frozen specimens should be thawed slowly on ice and tested as soon as possible after thawing. Repeated freezing and thawing should be avoided.

8 METHODOLOGY

(A summary of the entire procedure is given at the end of this instruction leaflet.)

8.1 Materials provided

- 8.1.1 1 x Total Haemolytic Complement Plate
in foil pouch (2 plates in kit RC001.2, 3 plates in kit RC001.3)
- 8.1.2 8 x Gel Dividers
- 8.1.3 1 x Total Haemolytic Complement Calibrator
(2 in 2 plate kit, 3 in 3 plate kit)
- 8.1.4 1 x Total Haemolytic Complement Control Serum
(2 in 2 plate kit, 3 in 3 plate kit)
- 8.1.5 1 x Instruction leaflet
- 8.1.6 Semi-log graph paper

8.2 Materials required but not provided

- 8.2.1 Equipment for collection and preparation of test samples, e.g. samples tubes, centrifuge etc.
- 8.2.2 Pipettes for accurate reconstitution of calibrators and controls and for dilution of calibrators.
- 8.2.3 Micropipettes for sample application. These should be capable of accurately delivering 5µL volumes. Binding Site Micropipettes (code AD041) or 'Hamilton' syringes are recommended.
- 8.2.4 Jewellers' Eyepiece (code AD040) or Digital RID Plate Reader (AD400) for magnifying and accurately measuring the zones of lysis to 0.1mm.
- 8.2.5 Physiological saline.
- 8.2.6 Distilled water.

8.3 Reagent preparation

8.3.1 RID plate

To avoid contamination of the gel, plates should be used in a dust-free environment. Take the plate from the foil pouch and remove the lid. If condensation is visible the plate should be kept upside down until the lid has been removed to prevent droplets falling onto the gel. Check the plate to ensure that no damage has occurred in storage or transit, e.g. splits in the gel. Leave the plate open for 10-15 minutes (or longer if necessary) at room temperature to allow any condensation in the wells or on the gel surface to evaporate. Samples should never be applied to wells in which moisture is still visible.

Plate partitioning: The plates may be partitioned into up to four sections using the gel dividers provided. Each divider should be positioned carefully on the gel, cutting edge downward, with the stabilising arm resting on the central plate label. Press firmly on the arm to cut the gel and leave in position.

Plate partitioning is recommended if the plate is to be used on two separate occasions. Plates must be partitioned prior to use. After initial use, partitioned plates should be resealed in their foil pouches and stored at 2-8°C with the gel divider(s) in place. Store partitioned plates right side up.

8.3.2 Calibrator

The lyophilised calibrators should be reconstituted with distilled water pre-cooled to 2-8°C using the volume indicated on the vial labels. Before use, all material in the bottle, including any adhering to the bung must be completely dissolved by inversion. Prepare a 1/2 dilution by mixing 100µL of calibrator with 100µL of physiological saline which has been pre-cooled to 2-8°C and a 1/4 dilution by mixing 100µL of calibrator and 300µL of pre-cooled saline. The calibrator and its dilutions must be kept as cool as possible during preparation to maintain the integrity of the complement components.

8.3.3 Control

The lyophilised control should be reconstituted with distilled water pre-cooled to 2-8°C using the volume indicated on the vial label. It should be mixed gently by inversion until the contents are completely dissolved.

8.3.4 Sample

Samples should be applied neat. However, if a dilution is required use physiological saline, which has been pre-cooled to 2-8°C.

8.4 Application of calibrators and samples

For best results it is recommended that all reagents, samples and plates etc, be kept cool throughout the application procedure. The use of a cold block will enable the samples to be applied to pre-cooled plates.

The calibrators, control and test samples should be gently mixed immediately before use. 5µL of each of the three calibrator dilutions should be pipetted into three separate wells. The remaining wells should then be filled with 5µL aliquots of samples and control as required. Plates should not be left open for long periods during calibrator / sample application, as this will cause excessive drying of the gel.

8.5 Diffusion

These haemolytic complement plates can be used to perform either a same day assay or an overnight assay. For the same day assay, the samples should be allowed to diffuse at 2-6°C for at least 6 hours to ensure the formation of sufficiently large lytic zone diameters (see limitation 10.2).

When being used to perform an overnight assay, diffusion can be carried out for up to 18 hours. If diffusion is allowed to continue for longer than 18 hours multiple rings and / or incomplete lysis may occur. For both assays the diffusion step should be carried out at 2-6°C but for overnight assay it is especially important that the temperature be kept as close to 4°C as possible to prevent degradation of the more fragile complement components. This will ensure that the final zones of lysis are sharp with well-defined boundaries. **Incubation temperatures >6°C during the diffusion period may prevent complete lysis.**

8.6 Incubation

Following the required period of diffusion, plates should be incubated at 37°C for a minimum of 30 minutes. It is important that the gels do not dry out and to minimise this plates should be resealed in their foil pouches.

8.7 Quality control

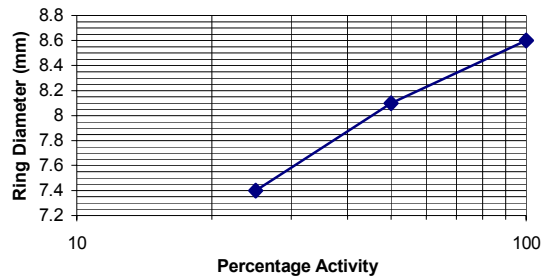
The control should, following reconstitution, be treated exactly like a test sample. Values for the control should be within 20% of the value stated on the vial label.

9 RING MEASUREMENT AND RESULT PROCESSING

After incubation the diameters of the zones of lysis should be measured to the nearest 0.1mm using a jewellers' eyepiece or RID reader. When reading with an eyepiece, use bright side lighting and a dark background. Using the semi-log graph paper provided, plot the diameters (in mm) of the rings formed by the three calibrators along the linear y-axis against their % complement activity (100% for the neat calibrator and 50% and 25% for the two dilutions) along the log x-axis. The three points should then be joined together as shown below. From this curve, % complement activity values for the test samples and controls can be read, and these then converted to CH100 units/mL values.

Example: The following calibration curve was obtained on a plate where diffusion was allowed to continue for 18 hours at 2-6°C. The value of the neat calibrator (100% activity) was 1171 CH100 units/mL.

A test sample applied neat as recommended gave a ring diameter of 8.0mm. From the calibration curve this corresponds to an activity of 45% and hence a complement activity of 527 CH100 units/mL (1171 x 0.45).



10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

- 10.1 The smaller rings obtained by the 6hr assay will give a "flatter" graph making the results less accurate than those obtained with the overnight method.
- 10.2 For samples where there is deficiency in overall complement activity or of a single complement component, the resulting zones of lysis may contain unlysed cells or show multiple rings. Where partial lysis or poor ring quality is observed the quantitative value obtained may be inaccurate. In such cases, a repeat sample should be requested. If the same result is obtained, then samples should be further investigated for dysfunction of the complement pathway.
- 10.3 Haemolysed samples or sera from rheumatoid arthritis patients may also show poor or multiple rings.
- 10.4 If two or more plates are to be used simultaneously a separate calibration curve should be constructed for each plate.
- 10.5 Reuse of part-used plates: The unused wells of part-used plates can be used for assaying further samples on a subsequent occasion providing the plate shows no signs of deterioration. A new calibration curve is required each time. The zones of lysis around previously used wells may increase in size due to further incubation at 37°C. This should not be considered as deterioration and will not affect the performance of the plate.
- 10.6 Calibrators and controls may give rings of poorer quality than fresh samples. This will not affect the accuracy of the assay.

10.7 Trouble shooting

Problem	Possible Cause	Suggested Action(s)
A. No ring for calibrators or control	i) Calibrator/control omitted.	Repeat assay.
	ii) Incubation temperature during diffusion period >6°C.	Repeat assay.
B. No ring for test sample	i) Sample omitted.	Repeat assay.
	ii) Incubation temperature during diffusion period >6°C.	Repeat assay.
	iii) Sample haemolysed during collection or storage.	Review sample collection and storage. Repeat with a fresh sample.
	iv) Haemolytic complement activity low due to classical pathway dysfunction or poor storage/handling of sample.	Review sample storage and handling. Repeat assay if necessary.
C. Non-circular rings	i) Poor sample application.	Repeat assay.
	ii) Gel dried out before use, due to storage damage or expired product.	Repeat assay using new plate.
	iii) Gel dried out during sample application or incubation.	Repeat assay using new plate, minimising time the plate is left open. Incubate with lid on tight and seal in foil pouch.
D. Clear zones on gel prior to use	Plate has been frozen, dried out, expired and/or been contaminated.	Review storage and repeat assay using new plate.
E. Incomplete lysis and/or multiple rings	i) Haemolytic complement activity low due to classical pathway dysfunction or factor deficiency.	Confirm with other clinical findings.
	ii) Sample haemolysed during collection or storage.	Review sample collection and storage. Repeat with a fresh sample.
	iii) Rheumatoid arthritis patient sera.	Check patient's clinical history.
	iv) Incubation temperature during diffusion period >6°C.	Repeat assay.
F. Weak, pitted gel	Plate has been frozen.	Repeat assay using new plate. Review storage.

- 10.8 If an unexpected result is obtained, the assay should be repeated, preferably with a fresh sample.
- 10.9 This kit is used to aid diagnosis only. An abnormal result may suggest certain diseases, which must be confirmed by clinical findings and other serological tests. The results obtained from this assay are not diagnostic proof of the presence or absence of disease.
- 10.10 For FDA (USA) information see front page.

If problem persists, please refer to supplier.

11 EXPECTED VALUES

Normal adult serum complement activities (determined using these kits):

	Median activity (CH100 units/mL)	95 Percentile range (CH100 units/mL)
Number of samples (n) = 38	728	392-1019

Decreased complement activity can be associated with various clinical conditions (see Section 2). Expected values are affected by age, sex, diet, geographical location, pregnancy, illness and other factors. To overcome differences in sample collection/preparation and assay procedure it is strongly recommended that each laboratory establish its own normal ranges. Samples with a complement activity below the 95 percentile range may be complement deficient and should be investigated further. Where partial lysis or poor ring quality is observed the quantitative value obtained may be inaccurate. In such cases, a repeat sample should be requested. If the same result is obtained, then samples should be further investigated for dysfunction of the complement pathway.

12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS**12.1 Precision**

Intra-assay precision was determined by measuring three serum preparations using the 18 hour assay method on five THC plates from a typical batch. Inter-assay precision was determined by measuring a serum preparation using the 18 hour assay method on five THC plates from different batches.

INTRA-ASSAY PRECISION		
	Mean conc. (CH100 units/mL)	CV (%)
Sample 1	1050	0
Sample 2	840	3.9
Sample 3 (Control)	590	10.3

INTER-ASSAY PRECISION		
	Mean conc. (CH100 units/mL)	CV (%)
Sample A	627	1.6

12.2 Comparison

The relative specificity, sensitivity and agreement have been determined against a commercially available reference method using 79 clinical sera and 40 normal adult donor sera. Samples were regarded as negative on the Binding Site kit if their CH100 activity was below the 95 percentile range.

Binding Site assay		Competitor assay	
		+	-
	+	29	11
	-	1	78
Relative sensitivity		96.7%	
Relative specificity		87.6%	
Relative agreement		89.9%	

13 BIBLIOGRAPHY

- 13.1 Janeway CA & Travers P (1994). Immunobiology: The immune system in health and disease. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 13.2 Tomlinson S (1993). Complement defence mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 83-89.
- 13.3 Frank MM & Fries LF (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12, 322-326.
- 13.4 Poddack ER & Tschopp J (1982). Polymerisation of the ninth component of complement (C9): the formation of poly-C9 with a tubular ultrastructure resembling the membrane attack complex of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 574-578.
- 13.5 Kolb WP et al. (1972). Molecular analysis of the membrane attack complex mechanisms of complement. *J Exp. Med.* 135, 549-566.
- 13.6 Muller-Eberhard HJ (1975). Complement. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 697-724
- 13.7 Morgan BP & Walport MJ (1991). Complement deficiency and disease. *Immunol. Today* 12, 301-306.

14 SUMMARY OF PROCEDURE

- 14.1 Reconstitute calibrator and control with distilled water precooled to 2-8°C.
- 14.2 Prepare 1/2 and 1/4 dilutions of the calibrator using cold saline solution.
- 14.3 Allow condensation to evaporate from the plate(s).
- 14.4 Apply the calibrator, calibrator dilutions, control and samples to the plate in 5µL volumes.
- 14.5 Replace lid and allow diffusion to occur for between 6 and 18 hours at 2-6°C.
- 14.6 Incubate at 37°C for a minimum of 30 minutes.
- 14.7 Measure zones of lysis.
- 14.8 Plot calibration curve and read off results.

INHALT

Seite

- 1 Verwendungszweck
- 2 Einführung
- 3 Prinzip
- 4 Reagenzien
- 5 Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen
- 6 Lagerung und Stabilität
- 7 Probensammlung und -vorbereitung
- 8 Testdurchführung
- 9 Ablesen und Interpretation der Ergebnisse
- 10 Grenzen der Methode
- 11 Erwartete Werte
- 12 Leistungsdaten
- 13 Referenzen
- 14 Kurzarbeitsanleitung

GESAMT-HÄMOLYTISCHER KOMPLEMENT-KIT

Nur zur *in-vitro* Diagnostik

Bestell-Nr.: RC001.1/2/3

In England hergestellt von:

The Binding Site Group, P.O. Box 11712, Birmingham B14 4ZB, United Kingdom.
www.bindingsite.co.uk

Vertrieb in Deutschland und Österreich durch:

The Binding Site GmbH, Robert-Bosch-Straße 2A

D-68723 Schwetzingen, Deutschland

Telefon: +49 (0) 6202 92 62 0

Fax: +49 (0) 6202 92 62 222

e-mail: office@bindingsite.de



1 VERWENDUNGSZWECK

Dieser Kit dient zur Messung der gesamt-hämolytischen Komplement-Aktivität des klassischen Weges im Humanserum und unterstützt die Diagnose von immunologischen Erkrankungen, die vor allem mit Defekten der Komplement-Komponenten assoziiert sind.

2 EINFÜHRUNG

Der klassische Komplementweg ist eine Reaktionskaskade, die zur Lyse von Zellmembranen führt und damit das Absterben von Zellen verursacht. An dieser Reaktionskaskade sind insgesamt 11 verschiedene Proteine beteiligt.

Der klassische Komplementweg wird durch die Wechselwirkung von Antigen-Antikörper-Komplexen mit dem Komplementprotein C1 aktiviert. Protein C1 wiederum aktiviert Protein C4, welches seinerseits die Proteine C2, C3 und C5 aktiviert. Aktiviertes Protein C5 (C5b) bindet an die Proteine C6, C7, C8 und zwischen 12 und 18 C9-Molekülen, wobei ein großer Proteinkomplex, Membran-Angriffs-Komplex (MAC) genannt, gebildet wird. Dieser Komplex ist für die Zerstörung der Zellmembran, und damit für das Absterben der Zelle, verantwortlich (Ref. 1-6).

Eine verringerte Komplement-Aktivität kann durch den Mangel jeder individuellen Komplement-Komponente verursacht werden. Dieser Mangel kann erblich oder erworben sein, z.B. kann eine erniedrigte Komplement-Aktivität die Folge von erblichem Angioödem, Glomerulonephritis, systemischem Lupus erythematodes (SLE) und einigen nicht immunologischen Erkrankungen sein (Ref. 7).

3 PRINZIP

Serum, welches aktive Komplement-Komponenten enthält, lässt man bei 2-6°C von einer kreisförmigen Vertiefung ausgehend, radial in ein Agarose-Gel diffundieren. Das Agarose-Gel enthält Schaferythrozyten, die mit einem Kaninchen-Anti-Schaferythrozyten-Antikörper (Hämolyse genannt) Lyse-empfindlich gemacht wurden. Während der Diffusionsperiode wird Komplementprotein C1 durch das Hämolyse fixiert. Bei der anschließenden Inkubation bei 37°C schreitet die Komplement-Reaktionskaskade voran, wobei die Schaferythrozyten lysiert werden. Durch diese Komplement-Reaktionskaskade entsteht eine klare, kreisförmige Zone, deren Größe von der ursprünglichen Komplement-Aktivität im Serum abhängt.

Misst man die Lysis-Zonen, die durch Seren mit bekannter Komplement-Aktivität erzeugt wurden, so kann eine Standardkurve erstellt werden, in dem die Ringdurchmesser gegen die Komplement-Aktivität auf halblogarithmischem Millimeterpapier aufgetragen werden. Zur Bestimmung der Komplement-Aktivität einer unbekannt Probe misst man den Ringdurchmesser der Lysis-Zone und liest den Wert aus der Standardkurve ab, vorausgesetzt die Ringqualität ist ausreichend (siehe Grenzen der Methode, Abschnitt 10).

4 REAGENZEN

4.1 Die hämolytischen Komplement-Platten (in wiederverschließbaren Folienbeutel geliefert) enthalten sensibilisierte Schaferythrozyten. Es können bis zu 14 Proben (inklusive Kalibratoren und Kontrollen) pro Platte aufgetragen werden. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,02% Natriumazid.

4.2 Kalibratoren: Sie werden in lyophilisierter Form geliefert. Die Komplement-Aktivität ist auf dem Etikett angegeben.

4.3 Kontrollen: Sie werden in lyophilisierter Form geliefert. Die zu erwartende Komplement-Aktivität ist auf dem Etikett angegeben.

5 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Das Ausgangsmaterial zur Erstellung der Kalibratoren und Kontrollen stammt aus menschlichem Blut. Alle Spender wurden jeweils bezüglich Human-Immunschwäche-Virus (HIV 1 & 2), Hepatitis-C-Virus und Hepatitis-B-Oberflächenantigene (HBsAg) untersucht und als negativ befunden. Es gibt aber zur Zeit keine absolut sicheren Testmethoden zum Ausschluss von HIV, Hepatitis-C-Virus oder anderen Infektionsträgern. Deshalb sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden. Umgangs- und Entsorgungsmethoden sollten denen für potentiell infektiösem Material entsprechen. Der Test sollte nur von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden.

Die RID-Platten enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel und müssen mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen behandelt werden. Verschlucken oder Berühren mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Nach Kontakt die Hautstelle mit viel Wasser abspülen und ärztlichen Rat einholen. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohren explosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung mit ausreichender Menge Wasser nachspülen, um Azidablagerungen zu vermeiden.

Es wird empfohlen, den Test gemäß der vorliegenden Arbeitsanleitung durchzuführen. Die Richtigkeit der Ergebnisse, die mit einer abgeänderten Vorschrift erhalten wurden, kann nicht garantiert werden. Reagenzien unterschiedlicher Chargen dürfen NICHT untereinander gemischt oder gemeinsam verwendet werden. Bei großem Testdurchsatz muss darauf geachtet werden, dass alle Reagenzien der GLEICHEN Charge entstammen.

6 LAGERUNG UND STABILITÄT

Die ungeöffneten Kits können bei 2-8°C gelagert und bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden. NICHT EINFRIEREN! Die hämolytischen Komplement-Platten haben eine begrenzte Haltbarkeit, die durch das Überleben der Schaferythrozyten limitiert wird. Das Agarose-Gel wird durch Einfrieren zerstört, deshalb die Platten vor Berührung des

Kühlelements im Kühlschrank schützen. Ungeöffnete Platten flachliegend, Oberseite nach unten (Etikett muss oben sein) lagern, damit sich kein Kondenswasser in den Vertiefungen ansammeln kann. Die Platten vorsichtig behandeln um eine Schädigung des Gels zu vermeiden. Die rekonstituierten Kalibratoren und Kontrollen sofort verwenden. Ist eine Lagerung von rekonstituierten Komponenten erforderlich, z.B. für die Verwendung von teilweise genutzter Platten, so sollten die Aliquots bei mindestens -20°C gelagert werden.

7 PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

Das Komplementsystem kann durch falsche Handhabung von Proben aktiviert werden, was zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann. Demzufolge ist die korrekte Entnahme, Aufbereitung, Lagerung und Versand der Proben entscheidend. Immer frisches Serum verwenden. Die Verwendung von mikrobiell oder mit Partikeln verunreinigter, oder hämolytischer oder sehr lipämischer Seren vermeiden, da eine unvollständige Lyse verursacht werden kann. Blutproben über Venenpunkturen sammeln und bei Raumtemperatur (18-24°C) für etwa 60 Minuten gerinnen lassen. Die Probe zentrifugieren und in ein sauberes Röhrchen überführen. Vor der Messung kann die Probe maximal 4 Stunden bei 2-8°C oder auf Eis gelagert werden. Für eine längeren Lagerung die Proben bei mindestens -70°C einfrieren. Eingefrorene Proben sollten langsam auf Eis aufgetaut werden und so schnell wie möglich nach dem Auftauen gemessen werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Seren vermeiden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

(Am Ende dieser Arbeitsanleitung befindet sich eine Zusammenfassung (Kurzanleitung) der Testdurchführung.)

8.1 Packungsinhalt

- 8.1.1 1 x *Total Haemolytic Complement Plate* (Hämolytische Komplement-Platte (THC), in Folie eingeschweißt) - RC001.1 (2 Platten im Kit [RC001.2], 3 Platten im Kit [RC001.3])
- 8.1.2 2 x *Gel Dividers* (Gel-Trennplatten)
- 8.1.3 1 x *Total Haemolytic Complement Calibrator* (Hämolytische Komplement-Kalibrator) - RC001.1 (2 im Zweiplatten-Kit [RC001.2], 3 im Dreiplatten-Kit [RC001.3])
- 8.1.4 1 x *Total Haemolytic Complement Control Serum* (Hämolytische Komplement-Kontrolle) - RC001.1 (2 im Zweiplatten-Kit [RC001.2], 3 im Dreiplatten-Kit [RC001.3])
- 8.1.5 1 x Arbeitsanleitung
- 8.1.6 Halblogarithmisches Millimeterpapier

8.2 Zusätzlich benötigte, nicht im Kit enthaltene Materialien

- 8.2.1 Ausrüstung zur Gewinnung und Vorbereitung der Seren, z. B. Glasröhrchen, Zentrifugen etc.
- 8.2.2 Pipetten für die exakte Rekonstitution der Kalibratoren und Kontrollen und für die Verdünnung des Kalibrators.
- 8.2.3 Mikropipetten zum Auftragen der Proben. Diese sollten 5µl exakt pipettieren können. Es werden Binding Site Mikropipetten (Bestell-Nr.: AD041) oder „Hamilton“-Spritzen empfohlen.
- 8.2.4 Juwelier-Lupe (Bestell-Nr.: AD040) oder digitales RID-Platten-Lesegerät (RID-Reader, AD400) für die Messung der Lysis-Zone mit einer Genauigkeit von ± 0,1mm.
- 8.2.5 Physiologische Kochsalzlösung.
- 8.2.6 Destilliertes Wasser.

8.3 Vorbereitung der Reagenzien

8.3.1 RID-Platten

Um eine Verunreinigung der Platten zu vermeiden, sollte nach Möglichkeit in staubfreier Umgebung gearbeitet werden. Die Platte aus der Folie nehmen. Ist auf dem Plattendeckel Kondenswasser sichtbar, die Platte bis zum Gebrauch mit der Gel-Oberseite nach unten lagern um zu verhindern, dass Wassertropfen auf die Gel-Oberfläche gelangen. Vor dem Gebrauch die RID-Platte auf eventuelle Schäden (z. B. Risse), die durch Transport oder Lagerung entstanden sein könnten, überprüfen. Den Deckel öffnen und die Platte 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur offenstehen lassen, so dass eventuell vorhandenes Kondenswasser aus den Vertiefungen oder Geloberfläche verdunsten kann. Proben nicht in Vertiefungen, die noch Kondenswasser enthalten, pipettieren.

Unterteilung der Platte: Die Platten können mit den beiliegenden Gel-Trennplatten unterteilt werden. Dazu die Gel-Trennplatten vorsichtig, mit der scharfen Kante nach unten, auf dem Gel in Position bringen. Dabei muss der Stabilisierungsarm auf dem zentralen Plattenetikett liegen. Dann die Trennplatte fest ins Gel drücken und dort belassen.

Die Unterteilung der Platte wird empfohlen, wenn nur ein Teil der 14 Vertiefungen benutzt werden soll. Unterteilte, teilweise benutzte Platten immer bei 2-8°C in der Folie verpackt aufbewahren. Die Gel-Trennplatten nicht entfernen und das Gel mit der Oberfläche nach oben lagern.

8.3.2 Kalibratoren

Den lyophilisierten Kalibrator mit 2-8°C kaltem destilliertem Wasser mit dem auf dem Etikett angegebenen Volumen rekonstituieren. Vor dem Gebrauch muss sichergestellt werden, dass das gesamte Material vollständig gelöst ist. Stellen Sie die Flasche auf den Kopf um Material zu lösen, das am Stopfen anhaftet. Von dem Kalibrator eine 1/2 (100µL Kalibrator + 100µL NaCl-Lösung) und eine 1/4 Verdünnung (100µL Kalibrator + 300µL NaCl-Lösung) mit 2-8°C kalter physiologischer Kochsalzlösung herstellen. Der Kalibrator und die entsprechenden Verdünnungen müssen während der Herstellung und bis zum Gebrauch möglichst kühl gelagert werden um die Funktionsfähigkeit der Komplement-Komponenten zu gewährleisten.

8.3.3 Kontrolle

Das lyophilisierte Kontrollserum mit 2-8°C kaltem destilliertem Wasser mit dem auf dem Etikett angegebenen Volumen rekonstituieren. Solange vorsichtig schütteln bis sich das Material vollständig gelöst hat.

8.3.4 Probenvorbereitung

Die Proben werden unverdünnt aufgetragen. Falls eine Verdünnung erforderlich ist, das Serum mit 2-8°C kalter physiologischer Kochsalzlösung verdünnen.

8.4 Auftragen der Kalibratoren, Kontrolle und Proben

Für die optimale Testdurchführung wird empfohlen, dass alle Reagenzien, Proben und Platten während des Auftragens der Proben gekühlt werden. Die Platten können gekühlt werden, indem sie auf einen kalten (aber nicht gefroren) Kühl-AKKU gestellt werden.

Die Kalibratoren, Kontrolle und Proben vor dem Auftragen vorsichtig schwenken um jeweils homogene Lösungen sicherzustellen. Je 5µL der drei Kalibratoren (unverdünnt, 1/2 und 1/4 Verdünnung) in je eine Vertiefung pipettieren. In die verbleibenden Vertiefungen je 5µL der Kontrolle und der Probandenserien pipettieren. Die Platte nach dem Auftragen der Seren sofort mit dem Deckel verschließen um das Austrocknen des Gels zu verhindern.

8.5 Diffusion

Mit diesen hämolytischen Komplement-Platten kann der Test an einem Tag oder über Nacht durchgeführt werden. Soll der Test noch am gleichen Tag ausgewertet werden, lässt man die Diffusion (2-6°C) über einen Zeitraum von mindestens 6 Stunden laufen. Nach 6 Stunden hat die Lysis-Zone eine sicher auswertbare Größe erreicht. (siehe GRENZEN DER METHODE 10.2)

Erfolgt die Diffusion über Nacht, so sollte die Zeit von 18 Stunden nicht überschritten werden. Bei beiden Verfahrensweisen wird der Diffusionsschritt bei 2-6°C durchgeführt, wobei bei der

18 stündigen Diffusion es besonders wichtig ist, dass die Temperatur immer um 4°C liegt. Bei höheren Temperaturen kann es zum Verfall der empfindlicheren Komplement-Komponenten kommen. Die genaue Einhaltung der Temperatur stellt sicher, dass die Grenzen der Lysis-Zonen scharf begrenzt und gut ablesbar werden. **Eine Inkubationstemperatur von >6°C während der Diffusionsperiode kann eine vollständige Lyse verhindern.**

8.6 Inkubation

Nach der Diffusionsperiode werden die Platten für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Um zu verhindern, dass das Gel während der Inkubation austrocknet, die Platte wieder in die Folie einpacken.

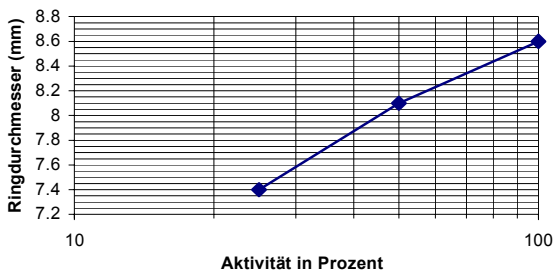
8.7 Qualitätskontrolle

Die Kontrolle nach der Rekonstitution wie ein Patientenserum behandeln. Der für die Kontrolle abgelesene Wert sollte nicht mehr als ± 20% von dem auf dem Etikett angegebenen Wert abweichen.

9 ABLESEN UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Nach der Inkubation bei 37°C kann die Lysis-Zone bis auf 0,1mm genau unter Verwendung einer Lupe oder eines RID-Readers abgelesen werden. Bei Verwendung einer Lupe ist helles Seitenlicht und ein dunkler Hintergrund sinnvoll. Für die Erstellung der Standardkurve werden die Ringdurchmesser der drei Kalibratoren auf der linearen Y-Achse gegen ihre entsprechende Aktivität in Prozent (100%= unverdünnter Kalibrator, 50% und 25% für die entsprechenden Verdünnungen) auf der logarithmischen X-Achse aufgetragen. Das halblogarithmische Millimeterpapier liegt dem Kit bei. Die drei Punkte sollten wie in der unten gezeigten Abbildung miteinander verbunden werden. Von dieser Standardkurve können dann die Aktivitätswerte der Kontrolle und der Patientenserum in Prozent abgelesen und anschließend in CH100-Einheiten/mL umgerechnet werden.

Beispiel: Die folgende Standardkurve wurde nach Inkubation von 18h bei 2-6°C erhalten. Der Wert des unverdünnten Kalibrators (100%ige-Aktivität) beträgt 1171 CH100-Einheiten/mL. Eine Patientenprobe wurde wie empfohlen unverdünnt aufgetragen und ergab einen Ringdurchmesser von 8,0mm. Legt man unten gezeigte Standardkurve zu Grunde, entspricht dies einer Aktivität von 45% und daraus errechnet sich eine Komplementaktivität von 527 CH100-Einheiten/mL (1171 x 0,45).



10 GRENZEN DER METHODE

- Bei einer Inkubationszeit von 6 h sind die Lyseringe kleiner und woraus eine entsprechend flachere Standardkurve resultiert. Dadurch sind die Ergebnisse etwas ungenauer als die, die bei einer Inkubationszeit über Nacht ermittelt wurden.
- Bei Proben, die einen Defekt in der Gesamt-Komplement-Aktivität oder bei einer Komplement-Komponente haben, können die erzeugten Lysis-Zonen noch unlysierte Zellen enthalten oder multiple Ringe auftreten. Bei vorliegender partieller Lyse oder schlechter Ringqualität könnte der quantitative Wert ungenau sein. In solchen Fällen sollte erneut eine Probe angefordert werden. Hat sich wiederum das Ergebnis bestätigt, sollte die Probe auf eine Fehlfunktion der Komplementkaskade weiterhin untersucht werden.
- Hämolytische Seren, oder Seren von Patienten mit Rheumatischer Arthritis können ebenfalls schwache oder multiple Lyseringe erzeugen.
- Bei Verwendung von zwei oder mehreren Platten zur gleichen Zeit, muss auf jeder Platte eine Kalibrationskurve mitgeführt werden.
- Arbeiten mit teilweise benutzten Platten: Die unbenutzten Vertiefungen einer teilweise benutzten Platte können noch verwendet werden, wenn die Platte keine Anzeichen der Zersetzung zeigt. Für jede Verwendung muss eine eigene Standardkurve erstellt werden! Die Lysis-Zonen der schon benutzten Vertiefungen können sich durch die nochmalige Inkubation bei 37°C etwas vergrößern. Dies muss nicht als Zeichen des Verfalls der Platte gewertet werden, denn die Ergebnisse des aktuellen Tests werden dadurch nicht beeinflusst.
- Kalibratoren und Kontrollen können eine schwächere Ringqualität aufweisen als frische Proben. Dies beeinflusst nicht die Genauigkeit des Tests.

10.7 Trouble Shooting

Problem	Fehlerquelle	Lösung
A. Keine Ringe für Kalibratoren und Kontrolle	i) Kalibrator/ Kontrolle nicht aufgetragen.	Test wiederholen.
	ii) Temperatur während Diffusionsperiode >6°C.	Test wiederholen, Kühlschrank überprüfen.
B. Keine Ringe für Proben	i) Probe nicht aufgetragen.	Test wiederholen.
	ii) Temperatur während Diffusionsperiode >6°C.	Test wiederholen, Kühlschrank überprüfen.
	iii) Probe während Abnahme oder Lagerung hämolytisch.	Probenentnahme und -lagerung überprüfen. Test mit frischer Probe wiederholen.
	iv) Erniedrigte Gesamthämolytische Komplementaktivität aufgrund einer Störung im klassischen Komplementweg, oder falsche Behandlung der Proben.	Probenentnahme und -lagerung überprüfen. Falls nötig Test mit frischer Probe wiederholen.
C. Ungleichmäßige Ringe	i) Proben nicht richtig aufgetragen.	Test wiederholen.
	ii) Gel wegen falscher Lagerung oder Verfall vor Gebrauch ausgetrocknet.	Test mit frischen Platten wiederholen.
	iii) Gel während des Probenauftrags oder Inkubation ausgetrocknet.	Test mit frischen Platten wiederholen. Dabei die Platten so kurz wie möglich offen lassen und während der Inkubation in eine feuchte Kammer legen.
D. Vor Gebrauch klare Zonen auf dem Gel	Platte war eingefroren oder ausgetrocknet, oder Haltbarkeit überschritten, und/oder verunreinigt.	Lagerbedingungen überprüfen – Test mit frischer Platte wiederholen.

Problem	Fehlerquelle	Lösung
E. Unvollständige Lyse und/oder multiple Ringe	i) Erniedrigte gesamthämolytische Komplementaktivität des klassischen Wegs aufgrund einer Fehlfunktion oder Defekt einer Komponente.	Bestätigung des Ergebnisses andere serologische Tests.
	ii) Probe während Abnahme oder Lagerung hämolytisch.	Probenentnahme und -lagerung überprüfen. Test mit frischer Probe wiederholen.
	iii) Seren von Patienten mit Rheumatischer Arthritis.	Klinische Befunde überprüfen.
	iv) Temperatur während Diffusionsperiode >6°C.	Test wiederholen.
F. Brüchiges, unebenes Gel	Platte war eingefroren.	Lagerbedingungen überprüfen – Test mit frischer Platte wiederholen.

- Werden ungewöhnliche Ergebnisse erhalten, sollte der Test, wenn möglich, mit einer frischen Probe wiederholt werden.
- Dieser Kit dient nur zur Unterstützung der Diagnose. Ein pathologisches Ergebnis weist auf bestimmte Erkrankungen hin, muss aber durch andere serologische Untersuchungen und dem klinischen Befund bestätigt werden. Die mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse können nicht als diagnostischer Beweis für das Vorliegen bzw. Nichtvorliegen einer Krankheit gewertet werden.
- FDA (USA) Informationen: siehe englische Packungsbeilage.

Kann das Problem nicht gelöst werden, wenden Sie sich bitte an Ihre Lieferfirma.

11 ERWARTETE WERTE

Seren von gesunden Erwachsenen zeigen folgende Komplement-Aktivitäten. Diese Werte wurden mit dem hier beschriebenen Kit ermittelt.

	Mittlere Aktivität (CH100 Einheiten/mL)	95-Perzentile-Bereich (CH100 Einheiten/mL)
Anzahl der Proben (n) = 38	728	392 - 1019

Eine verminderte Komplementaktivität kann bei verschiedenen Erkrankungen (siehe Abschnitt 2) auftreten. Die zu erwartenden Werte werden durch das Alter, Geschlecht, Ernährung, geographische Lage, Schwangerschaft, Krankheit und andere Faktoren beeinflusst. Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Normalbereich ermittelt, da durch die unterschiedliche Probenentnahme, Probenaufbereitung und Testdurchführung Abweichungen auftreten können. Proben, deren Komplementaktivität unterhalb der 95-Perzentile-Bereichs liegen, können einen Komplementdefekt aufweisen und sollten weiter untersucht werden. Bei vorliegender partieller Lyse oder schlechter Ringqualität könnte der quantitative Wert ungenau sein. In solchen Fällen sollte erneut eine Probe angefordert werden. Hat sich wiederum das Ergebnis bestätigt, sollte die Probe auf eine Fehlfunktion der Komplementkaskade weiterhin untersucht werden.

12 LEISTUNGSDATEN

12.1 Präzision

Die Intra-Assay-Präzision wurde mit drei Proben unter Verwendung der 18h-Inkubationsmethode auf fünf THC-Platten einer typischen Charge ermittelt. Für die Bestimmung der Inter-Assay-Präzision wurde eine Serumprobe unter Verwendung der 18h-Inkubationsmethode auf 5 THC-Platten unterschiedlicher Chargen getestet.

INTRA-ASSAY-PRÄZISION		
	Mittlere Aktivität (CH100 Einheiten/mL)	% VK
Probe 1	1050	0
Probe 2	840	3,9
Probe 3 (Kontrolle)	590	10,3

INTER-ASSAY-PRÄZISION		
	Mittlere Aktivität (CH100 Einheiten/mL)	% VK
Probe A	627	1,6

12.2 Vergleichsuntersuchung

Die relative Spezifität, Sensitivität und Übereinstimmung wurde im Vergleich zu einem anderen kommerziell erhältlichen Test mit 79 klinischen und 40 normalen Seren von Blutspendern ermittelt. Seren wurden mit dem Test von Binding Site als negativ eingestuft, wenn die CH100-Aktivität unterhalb des 95-Perzentile-Bereichs lagen.

Binding Site Test	Alternativer Test	
	+	-
+	29	11
-	1	78
Relative Sensitivität	96,7%	
Relative Spezifität	87,6%	
Relative Übereinstimmung	89,9%	

13 REFERENZEN

- Janeway CA & Travers P (1994). Immunobiology: The immune system in health and disease. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Tomlinson S (1993). Complement defence mechanisms. *Curr. Opin.Immunol.* 5,83-89.
- Frank MM & Fries LF (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12, 322-326.
- Poddack ER & Tschopp J (1982). Polymerisation of the ninth component of complement (C9): the formation of poly-C9 with a tubular ultrastructure resembling the membrane attack complex of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 574-578.
- Kolb WP et al. (1972). Molecular analysis of the membrane attack complex mechanisms of complement. *J Exp. Med.* 135, 549-566.
- Muller-Eberhard HJ (1975). Complement. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 697-724
- Morgan BP & Walport MJ (1991). Complement deficiency and disease. *Immunol. Today* 12, 301-306.

14 KURZARBEITSANLEITUNG

- Kalibrator und Kontrolle mit 2-8°C kaltem destilliertem Wasser rekonstituieren (Volumina sind auf dem Etikett angegeben).
- Vom Kalibrator eine 1/2 und eine 1/4 Verdünnung mit gekühlter physiologischer Kochsalzlösung erstellen.
- Kondenswasser auf der Platte, bzw. in den Vertiefungen verdunsten lassen.
- Je 5µL der Kalibratoren (unverdünnt, 1/2 und 1/4 Verdünnung), Kontrolle und Patientenserum auftragen.
- Platte mit dem Deckel gut verschließen und zwischen 6 und 18 Stunden bei 2-6°C inkubieren (Diffusion).
- Platte mindestens 30 Min bei 37°C inkubieren.
- Die Durchmesser der Lysis-Zonen messen.
- Die Standardkurve zeichnen und die Ergebnisse der Patientenserum daraus ablesen.

1	Indications
2	Présentation générale
3	Principe du test
4	Réactifs
5	Précautions
6	Stockage et stabilité
7	Collecte et préparation des échantillons
8	Méthodologie
9	Mesure des anneaux et résultats
10	Limites de la procédure
11	Valeurs usuelles
12	Performances
13	Bibliographie
14	Résumé de la procédure

COFFRET DE DOSAGE DU COMPLEMENT HEMOLYTIQUE TOTAL

**Pour un usage en diagnostic *in vitro*
uniquement**

Code Produit: RC001.11/21.3

Produits fabriqués en Angleterre par la société :

*The Binding Site Group Ltd., PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, UK.
www.bindingsite.co.uk*

Distribués en France par la société :

*The Binding Site France, 14 rue des Glairaux, BP226, 38522 Saint-Egrève,
Cedex.*

Téléphone : 04.38.02.19.19

Fax : 04.38.02.19.20

info@bindingsite.fr



1 INDICATIONS

Ce coffret a été spécialement conçu pour mesurer l'activité hémolytique dans le sérum humain par la voie classique du complément sérique. Il apporte une aide dans le diagnostic des désordres immunologiques et en particulier ceux associés à des déficiences en composants du complément.

2 PRESENTATION GENERALE

L'activation classique du complément met en jeu une cascade de réactions impliquant 11 protéines et conduisant à la lyse membranaire puis à la mort cellulaire.

L'activation du complément par la voie classique est induite par les anticorps. Elle est initiée par la liaison de complexes antigène-anticorps avec la fraction C1 du complément. Ce qui activera C4 puis C2, C3 et C5. Le C5 activé (C5b) fixe le C6, C7, C8 et 12 à 18 molécules de C9 pour former le complexe d'attaque membranaire (CAM). Ce complexe provoque la formation d'un canal lytique qui entraîne la mort cellulaire (réf. 1-6).

Une diminution de l'activité du complément peut être due à une déficience de l'une des fractions. Cette déficience peut être héréditaire ou acquise, et peut être associée à des déficiences héréditaires du complément, aux glomérulonéphrites, au lupus érythémateux disséminé (LED), aux vascularites et à d'autres conditions non-immunologiques (réf. 7).

3 PRINCIPE DU TEST

La méthode consiste à laisser diffuser à 2-6°C les fractions activées du complément à partir d'un puits cylindrique fait dans une gélose contenant des hémolysines (globules rouges de mouton sensibilisés par des anticorps de lapin anti globules rouges de mouton). Pendant la diffusion, la fraction C1 se fixe aux hémolysines. Lors de l'incubation à 37°C, la cascade du complément s'active et conduit à la lyse cellulaire des globules rouges de mouton. Ce qui se visualise par un halo clair dont la taille est dépendante de l'activité hémolytique du complément sérique.

En mesurant les plages de lyse produites par des sérums dont l'activité hémolytique du complément est calibrée, il est possible de construire une courbe de calibration en reportant le diamètre sur l'axe des Y et l'activité hémolytique sur l'axe des X sur papier semi-logarithmique. L'activité hémolytique des échantillons dosés sera déterminée en mesurant la plage de lyse et en se reportant à la courbe de calibration à condition que la qualité des anneaux soit acceptable (voir la section 10 limite de la procédure).

4 REACTIFS

4.1 Complément hémolytique plaques (fournies sous sachet aluminium réutilisable). Elles contiennent des globules rouges de mouton sensibilisés. 14 échantillons peuvent être testés par plaque (comprenant les calibrateurs et les contrôles). Conservateur : azide de sodium 0,02%.

4.2 Calibrateurs. Ils sont fournis sous forme lyophilisée. L'activité hémolytique est indiquée sur les étiquettes du flacon.

4.3 Contrôles. Ils sont fournis sous forme lyophilisée. L'activité hémolytique est indiquée sur les étiquettes du flacon.

5 PRECAUTIONS

Tous les sérums des donneurs humains ont été soumis aux tests des hépatites B (antigène HBs) et C et de l'HIV 1 et HIV 2 et se sont avérés négatifs. Toutefois, tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Des procédures adaptées doivent être établies et seul un personnel entraîné est autorisé à faire ces tests.

Les plaques contiennent de l'azide de sodium comme conservateur et doivent être manipulées avec précaution. Ne pas ingérer ou mettre en contact avec la peau ou les muqueuses. Encas de contact, laver avec un grand volume d'eau et consulter un médecin. Des azides de métaux explosifs peuvent se former avec le cuivre et le plomb. Laver à grande eau les récipients afin d'éviter la formation des azides.

Il est recommandé de suivre scrupuleusement la procédure. La validité des résultats obtenus en utilisant des méthodes autres que celles indiquées ne peut pas être garantie. Les réactifs ayant des numéros de lots différents NE SONT PAS interchangeables. Si de grandes séries de tests doivent être réalisées, s'assurer que tous les réactifs proviennent d'un même lot.

6 STOCKAGE ET STABILITE

Les coffrets non ouverts doivent être conservés à 2-8°C et doivent être utilisés avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la boîte. NE PAS LES CONGELER. Les plaques d'agarose ont une durée de vie limitée par la durée de vie des globules rouges de mouton et doivent être conservées le plus possible au réfrigérateur. Le gel d'agarose peut être endommagé par la congélation, il est recommandé de ne pas placer les gels trop près des plaques réfrigérantes des réfrigérateurs. Les plaques non ouvertes doivent être stockées à plat, à l'envers (étiquette de la pochette vers le haut) afin d'éviter l'accumulation de condensation dans les puits. Manipuler les plaques avec précaution afin d'éviter d'endommager le gel.

Une fois reconstitués, les calibrateurs et les contrôles doivent être utilisés immédiatement. S'il est nécessaire de les conserver, pour une utilisation partielle et ultérieure de la plaque par exemple, il est recommandé de les aliquoter et de les congeler à -20°C ou à une température inférieure.

7 COLLECTE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le complément peut être activé dans les échantillons manipulés de mauvaise façon et ainsi conduire à des résultats erronés. Les procédures de collecte, de stockage et de transport sont par conséquent essentielles. Utiliser des échantillons fraîchement prélevés. Il n'est pas conseillé d'utiliser des échantillons contaminés par des bactéries, hémolysés, très lipidiques ou contenant des particules de matière (une lyse incomplète apparaît). Les échantillons de sang doivent être collectés par ponction veineuse et permettre la formation de caillot à température ambiante (18-24°C) en approximativement 60 minutes. Centrifuger l'échantillon et transférer le dans un tube propre. Stocker pour un maximum de 4 heures à 2-8°C ou dans la glace à la suite du test. Pour un stockage plus long, conserver les échantillons congelés à -70°C ou moins. Les échantillons doivent être dégelés doucement et testés aussi vite que possible après décongélation. Les congélations et décongelations successives doivent être évitées.

8 METHODOLOGIE

(Un résumé de la procédure entière est donné à la fin de cette fiche technique.)

8.1 Matériel fourni

- 8.1.1 1 x 1 ou 2 ou 3 *Total Haemolytic Complement Plate* (Plaques d'agarose de 14 puits emballées dans des pochettes aluminium) (dépendant de la taille du coffret).
- 8.1.2 8 x *Gel Dividers* (séparateurs de gel par plaque).
- 8.1.3 1 x 1 ou 2 ou 3 *Total Haemolytic Complement Calibrator* (calibrateur) (dépendant de la taille du coffret).
- 8.1.4 1 x 1 ou 2 ou 3 *Total Haemolytic Complement Control Serum* (contrôle) (dépendant de la taille du coffret).
- 8.1.5 1 x fiche technique.
- 8.1.6 1 x papier graphique semi log.

8.2 Matériel nécessaire et non fourni

- 8.2.1 Matériel de prélèvement et de préparation des échantillons (tubes, centrifugeuse).
- 8.2.2 Pipettes pour la reconstitution précise des calibrateurs et du contrôle et pour la dilution des calibrateurs si nécessaire.
- 8.2.3 Micropipettes de précision de 5µL pour le dépôt des échantillons. Les micropipettes Binding Site (code AD041) ou les seringues «Hamilton» sont recommandées.
- 8.2.4 Loupe de joaillier (code AD040) ou lecteur digital de plaques d'IDR (AD400) pour mesurer de façon précise (lecture à 0,1mm près) les zones de lyse.
- 8.2.5 0,9% solution saline.
- 8.2.6 Eau distillée.

8.3 Préparation des réactifs

8.3.1 Plaques d'agarose

Afin d'éviter toute contamination, les gels seront utilisés dans un environnement sans poussière. Sortir la boîte de sa pochette aluminium et ôter son couvercle. Si des gouttelettes de condensation sont visibles sur le couvercle, maintenir la plaque à l'envers jusqu'à l'ouverture afin d'éviter que l'eau de condensation ne retombe dans les puits. Vérifier que la plaque n'ait pas été endommagée pendant le stockage ou le transport. Laisser la plaque ouverte pendant 10 à 15 minutes (ou plus longtemps si nécessaire) pour que l'eau de condensation s'évapore. Ne pas déposer d'échantillons dans les puits contenant de l'eau de condensation.

Segmentation de la plaque : Pour un nombre de dosages inférieur à 14, il est possible de sectionner le gel en 4 sections à l'aide des séparateurs de gel. Déterminer au préalable le nombre de puits à utiliser. Sectionner le gel en posant délicatement la barrette à sa surface puis appuyer fermement afin de couper le gel dans toute son épaisseur. Laisser les séparateurs en place même après utilisation.

La segmentation de la plaque est recommandée si la plaque doit être utilisée en deux occasions différentes. La plaque doit être découpée avant utilisation. Après une première utilisation, les plaques partiellement utilisées doivent être replacées dans leur pochette et conservées à l'endroit à 2-8°C.

8.3.2 Calibrateurs

Les calibrateurs lyophilisés doivent être reconstitués par le volume indiqué sur l'étiquette avec de l'eau distillée à 2-8°C. Avant utilisation toute la poudre doit être reconstituée par retournement. Préparer une dilution au 1/2 (100µL de calibrateur et 100µL de solution saline qui a été réfrigérée à 2-8°C) et une dilution au 1/4 (100µL de calibrateur et 300µL de solution saline réfrigérée). Les dilutions et le calibrateur doivent être conservés le plus fraîchement possible afin d'éviter la «mise en route» de la cascade du complément.

8.3.3 Contrôle

Le contrôle lyophilisé doit être reconstitué par le volume indiqué sur l'étiquette avec de l'eau distillée à 2-8°C. Avant utilisation toute la poudre doit être reconstituée par retournement.

8.3.4 Echantillons

Les échantillons doivent être déposés purs. Toutefois, s'il était nécessaire de les diluer, utiliser la solution saline préalablement mise à 2-8°C.

8.4 Dépôt des échantillons, calibrateurs et contrôles

Pour garantir les meilleurs résultats, il est recommandé de maintenir, jusqu'aux dépôts, tous les réactifs et les échantillons à 2-8°C. L'utilisation d'un bloc réfrigérant permet le dépôt des échantillons sur les plaques réfrigérées.

Homogénéiser par retournement les réactifs et les échantillons avant utilisation. Déposer 5µL de chaque dilution du calibrateur dans 3 puits distincts. Déposer 5µL du contrôle et des échantillons dans les puits restants. Ne pas laisser la plaque ouverte trop longtemps afin de ne pas laisser le gel se dessécher.

8.5 Diffusion

Ces plaques peuvent être utilisées au cours d'une journée ou après une nuit de diffusion. Pour l'utilisation au cours d'une journée, il est recommandé de laisser diffuser au minimum 6 heures à 2-6°C pour que les plages de lyse soient visibles (cf. limites 10.2).

Pour une diffusion nocturne, il est possible de laisser diffuser 18 heures. Si la diffusion est prolongée au-delà de 18 heures, il est possible d'observer des halos multiples ou/et une lyse incomplète. Dans tous les cas, il est recommandé que cette étape se fasse à 2-6°C mais pour la diffusion nocturne il est important de maintenir la température le plus près possible de 4°C

afin d'éviter la dégradation des composants fragiles du complément. Ainsi les limites des plages de lyse seront plus nettes. **Des températures d'incubation supérieures à 6°C durant la période de diffusion peuvent empêcher la lyse complète.**

8.6 Incubation

Après la diffusion, les plaques doivent être incubées à 37°C pendant 30 minutes minimum. Il est important que le gel ne se dessèche pas. Pour cela le remettre dans sa pochette aluminium.

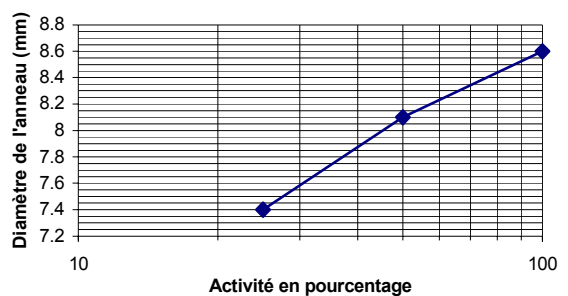
8.7 Contrôle qualité

Le contrôle (après reconstitution) doit être traité de la même manière qu'un échantillon. La valeur obtenue du contrôle doit être +/- 20% de la valeur cible indiquée sur l'étiquette du flacon.

9 MESURE DES ANNEAUX ET RESULTATS

Après incubation, les diamètres des plages de lyse doivent être mesurés (à 0,1mm près) à l'aide d'une loupe de joaillier ou d'un lecteur. La lecture à l'aide de la loupe de joaillier se fait sur un fond noir, en utilisant un éclairage latéral. En utilisant le papier semi-log fourni, reporter les diamètres (en mm) des anneaux formés par les trois calibrateurs sur l'axe linéaire y et leur pourcentage d'activité en complément (100% pour le calibrateur pur, 50% et 25% pour les 2 autres dilutions) sur l'axe logarithmique x. Les trois points doivent être joints comme sur la courbe représentée ci-dessous. A partir de cette courbe, il est possible de déterminer les pourcentages d'activité du complément des échantillons et des contrôles, ils peuvent ensuite être convertis en unités CH100/mL.

Exemple : La courbe ci-dessus a été obtenue à partir d'une plaque où la diffusion a été réalisée sur une période de 18 heures à 2-6°C. La valeur du calibrateur pur (100% d'activité) était de 1171 unités CH100/mL. Un échantillon déposé pur comme recommandé a donné un anneau d'un diamètre de 8,0mm. D'après la courbe de calibration, ceci correspond à une activité de 45% et par conséquent à une valeur de 527 unités CH100/mL (1171 x 0,45).



10 LIMITES DE LA PROCEDURE

- 10.1 Les anneaux plus petits obtenus avec le test en 6 heures donneront une courbe plus plate et par conséquent des résultats moins précis que ceux obtenus avec la méthode sur la nuit.
- 10.2 Pour les échantillons présentant un déficit d'une ou plusieurs fractions du complément, les plages de lyse peuvent montrer des cellules non lysées ou des anneaux multiples. Si des résultats de lyse partielle ou une mauvaise qualité des anneaux sont observés, la valeur quantitative obtenue peut être imprécise. Dans certains cas, un nouveau prélèvement devra être testé. Si le même résultat est obtenu, de futurs prélèvements devront être testés pour un dysfonctionnement de la voie du complément.
- 10.3 Les échantillons hémolysés ou des sérums provenant de patients atteints d'arthrite rhumatoïde peuvent également présenter des anneaux multiples ou faibles.
- 10.4 Si deux ou plusieurs plaques sont utilisées simultanément, il est recommandé d'établir une courbe de calibration pour chaque plaque.
- 10.5 Utilisation ultérieure des plaques partiellement utilisées : Si la plaque ne présente pas de dommage, il est possible d'utiliser les puits vierges. Une nouvelle courbe de calibration est nécessaire. Suite aux incubations répétées à 37°C les plages de lyse autour des puits précédemment utilisés peuvent s'agrandir. Ceci ne doit pas être considéré comme une détérioration des plaques et n'affecte en rien leur performance. Les calibrateurs et contrôles peuvent donner des anneaux de précipitation moins nets que ceux obtenus avec les échantillons frais. Ceci n'affecte en rien les résultats du test.
- 10.6 Les calibrateurs et les contrôles peuvent donner des anneaux de précipitation moins nets que ceux obtenus avec des échantillons frais. Ceci n'affecte en rien la fiabilité du test.

10.7 Causes d'erreurs possibles

Problèmes	Causes possibles	Actions à mener
A. Pas d'anneaux pour les calibrateurs et le contrôle	i) Calibrateurs et contrôle non déposés.	Répéter le test.
	ii) Température d'incubation durant la période de diffusion > 6°C.	Répéter le test.
B. Aucun anneau pour l'échantillon	i) Echantillon non déposé.	Répéter le test.
	ii) Température d'incubation durant la période de diffusion > 6°C.	Répéter le test.
	iii) Echantillon hémolysé durant la collecte ou le stockage.	Revoir la collection de l'échantillon et le stockage. Répéter avec un échantillon frais.
C. Anneaux non circulaires	iii) Activité hémolytique du complément basse due à un dysfonctionnement de la voie classique ou mauvais stockage ou mauvaise manipulation de l'échantillon.	Revoir le stockage des échantillons et la répéter le test si nécessaire.
	i) Mauvaise application de l'échantillon.	Répéter le test.
	ii) Gel desséché avant utilisation du à un mauvais stockage ou un produit périmé.	Répéter le test.
	iii) Gel desséché durant l'application de l'échantillon ou de l'incubation.	Répéter le test en évitant de laisser la plaque ouverte trop longtemps. Incuber la plaque avec le couvercle et placer le tout dans le sachet aluminium fermé.

Problèmes	Causes possibles	Actions à mener
D. Zones claires avant utilisation du gel	Les plaques ont été congelées, ont séchées ou ont été contaminées par des bactéries.	Revoir les conditions de stockage et répéter le test en utilisant une nouvelle plaque.
E. Lyse incomplète et/ou anneaux multiples	i) Activité hémolytique du complément basse due à un dysfonctionnement de la voie classique ou à une déficience d'un facteur.	A confirmer par des indications cliniques.
	ii) Echantillon hémolysé durant la collecte ou le stockage.	Revoir la collection de l'échantillon et le stockage Répéter avec un échantillon frais.
	iii) Sérums de patients atteints d'arthrite rhumatoïde.	Vérifier l'histoire clinique des patients.
	iv) Température d'incubation durant la période de diffusion > à 6°C.	Répéter le test.
F. Gel faiblement piqué	La plaque a été congelée.	Répéter le test en utilisant une nouvelle plaque. Revoir le stockage.

- 10.8 Si un résultat inattendu est obtenu, le test doit être répété avec un sérum frais.
 10.9 Ce coffret apporte une aide dans le diagnostic. Un résultat anormal peut suggérer certaines maladies qui doivent être confirmées par la clinique et par d'autres tests sérologiques. Les résultats obtenus à partir de ce test ne sont pas une preuve diagnostic de la présence ou l'absence de maladies.
 10.10 Informations FDA : Voir première page.

Si un problème persiste, se référer au fournisseur.

11 VALEURS USUELLES

La norme pour les adultes a été établie à partir de la moyenne des résultats obtenus en utilisant ces coffrets.

	Moyenne d'activité (CH100 unités/mL)	Gamme 95 percentile (CH100 unités/mL)
Nombre d'échantillons (n) = 38	728	392 - 1019

La diminution de l'activité du complément peut être associée à différentes conditions (cf. paragraphe 2). Les valeurs attendues peuvent être affectées par l'âge, le sexe, un régime, la situation géographique, la grossesse, la maladie, et d'autres facteurs. Pour diminuer les différences dans la collection ou la préparation des échantillons ou dans le test, il est fortement conseillé à chaque laboratoire d'établir ses propres normes. Les échantillons avec une activité du complément inférieure à gamme 95 percentiles peuvent être considérés comme déficients et des tests supplémentaires doivent être réalisés. Si des résultats de lyse partielle ou une mauvaise qualité des anneaux sont observés, la valeur quantitative obtenue peut être imprécise. Dans certain cas, un nouveau prélèvement devra être testé. Si le même résultat est obtenu, de futurs prélèvements devront être testés pour un dysfonctionnement de la voie du complément.

12 PERFORMANCES

12.1 Précision

La précision intra-lot a été déterminée en mesurant trois sérums avec 18 heures d'incubation sur 5 plaques du même lot. La précision inter-essai a été déterminée en mesurant un sérum avec 18 heures d'incubation sur 5 plaques de lots différents.

PRECISION INTRA-LOT		
	Conc. moy. (unités CH100/mL)	% en CV
Echantillon 1	1050	0
Echantillon 2	840	3,9
Echantillon 3 (contrôle)	590	10,3
PRECISION INTER-ESSAI		
	Conc. moy. (unités CH100/mL)	% en CV
Echantillon A	627	1,6

12.2 Comparaison

La spécificité, la sensibilité et la corrélation relatives ont été déterminées par rapport à une méthode de référence commerciale en utilisant 79 sérums de patients et 40 sérums d'adultes sains. Les échantillons sont considérés comme négatifs si leur activité CH100 est inférieure à la gamme 95 percentile.

Coffret Binding Site	Autre coffret commercial	
	+	-
	29	11
	1	78
Sensibilité relative	96,7%	
Spécificité relative	87,6%	
Corrélation relative	89,9%	

13 BIBLIOGRAPHIE

- 13.1 Janeway CA & Travers P (1994). Immunobiology: The immune system in health and disease. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
 13.2 Tomlinson S (1993). Complement defence mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 83-89.
 13.3 Frank MM & Fries LF (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12, 322-326.
 13.4 Poddack ER & Tschopp J (1982). Polymerisation of the ninth component of complement (C9): the formation of poly-C9 with a tubular ultrastructure resembling the membrane attack complex of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 574-578.
 13.5 Kolb WP et al. (1972). Molecular analysis of the membrane attack complex mechanisms of complement. *J Exp. Med.* 135, 549-566.
 13.6 Muller-Eberhard HJ (1975). Complement. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 697-724
 13.7 Morgan BP & Walport MJ (1991). Complement deficiency and disease. *Immunol. Today* 12, 301-306.

14 RESUME DE LA PROCEDURE

- 14.1 Reconstituer les calibrateurs et contrôles avec de l'eau distillée à 2-8°C.
 14.2 Préparer les dilutions au 1/2 et au 1/4 du calibrateur avec une solution saline réfrigérée.
 14.3 Laisser évaporer l'eau de condensation des plaques.
 14.4 Déposer 5µL des calibrateurs, du contrôle et des échantillons dans le nombre de puits nécessaires.
 14.5 Remettre le couvercle et laisser diffuser 6 ou 18 heures à 2-6°C.
 14.6 Incuber au minimum 30 minutes à 37°C.
 14.7 Mesurer les plages de lyse.
 14.8 Etablir la courbe de calibration et en déduire les résultats.

ÍNDICE

Página

- 1 Propósito
- 2 Resumen y explicación
- 3 Principio
- 4 Reactivos
- 5 Advertencias
- 6 Almacenamiento y estabilidad
- 7 Recolección y preparación de las muestras
- 8 Metodología
- 9 Medición e interpretación
- 10 Limitaciones
- 11 Valores esperados
- 12 Características
- 13 Bibliografía
- 14 Resumen del procedimiento

COMPLEMENTO HEMOLÍTICO TOTAL

Spanish

Sólo para el diagnóstico *in vitro*

Código de Producto: RC001.1/.2/3

Fabricado por:

The Binding Site Group Ltd, PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, U.K.
www.bindingsite.co.uk

The Binding Site Spain S.L.U.,
C/ Balmes 243 4ª 3ª, 08006 Barcelona
Teléfono 902027750
Fax: 902027752
e-mail: info@bindingsite.es



1 PROPÓSITO

Este kit es para cuantificar la actividad del complemento hemolítico humano por la vía clásica en el suero, como un apoyo en el diagnóstico de enfermedades inmunológicas, especialmente de aquellas asociadas a deficiencias de componentes del complemento.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La vía clásica del complemento es una cascada de reacciones de 11 proteínas implicadas que conlleva a la lisis de las membranas celulares y finalmente a la muerte celular.

La activación de la vía clásica del complemento se produce por la interacción de los complejos anticuerpo-antígeno con el complemento C1, inactivando el C4 y causando sucesivamente la activación de C2, C3 y C5. El C5 activado (C5b) fija C6, C7, C8 y de 12 a 18 moléculas del C9 para formar un complejo grande, conocido como Complejo de ataque de Membrana (MAC). Este es el complejo que rompe las membranas celulares conllevando la muerte celular (Refs. 1-6).

Un descenso de la actividad del complemento puede ser ocasionada por deficiencias en cualquier componente individual de complemento, hereditarias o adquiridas, y pueden estar asociadas a las deficiencias hereditarias del complemento, glomeronefritis, lupus eritematoso sistémico (SLE), vasculitis y un número de condiciones no-inmunológicas (Ref. 7).

3 PRINCIPIO

El método consiste en la difusión radial de un suero (que contiene componentes activos del complemento) en los pocillos de un gel de agarosa (que contiene eritrocitos de cordero previamente sensibilizados con un anticuerpo de conejo llamado "Hemolisina") a temperatura de 2-6°C. Durante el tiempo de difusión se fija el complemento C1 por la Hemolisina. Cuando se incuba a 37°C se origina la cascada de complemento y la lisis de los eritrocitos de cordero, dando lugar a una zona clara, el tamaño de ésta depende de la actividad de complemento presente en el suero.

Midiendo las zonas de lisis producidas por un número de sueros con actividad de complemento conocida, puede realizarse la curva de calibración trazando el diámetro contra la actividad del complemento sobre un papel gráfico semi-logarítmico. La actividad de complemento en una muestra desconocida deberá determinarse midiendo la zona de lisis y leerse de la curva de calibración, siempre y cuando la calidad del anillo sea aceptable (vea las limitaciones del procedimiento, sección 10).

4 REACTIVOS

- 4.1 Placas con complemento hemolítico (envasadas en sobres herméticos): Éstas contienen eritrocitos de cordero sensibilizados. Pueden realizarse hasta catorce (14) muestras en una pasada (incluyendo calibradores y controles). Conservantes: azida sódica 0,02%.
- 4.2 Calibradores: liofilizados. La actividad de complemento se indica en la etiqueta del vial.
- 4.3 Controles: liofilizados. La actividad de complemento esperada se indica en la etiqueta del vial.

5 ADVERTENCIAS

El material de partida para la elaboración de los calibradores y controles proviene de sangre humana. Cada una de las muestras han sido examinadas y encontradas libres de anticuerpos del virus del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (HIV 1 & 2), Hepatitis C así como antígenos superficiales de Hepatitis B (HBsAg). No obstante, hasta la fecha no existen métodos seguros para la exclusión de estos agentes infecciosos ni de otros. Por lo tanto, deben tratarse los reactivos como potencialmente infecciosos. Tanto la manipulación como los métodos de eliminación de desechos deberán realizarse conforme a la normativa de materiales infecciosos y sólo personal adecuadamente instruido deberá efectuar el test.

Las placas RID y otros componentes del kit contienen azida sódica y deben tratarse según las medidas de seguridad correspondientes. Debe evitarse tanto la ingesta como el contacto con la piel y las mucosas. En caso de contacto, aclarar con abundante agua y consultar a un médico. La azida sódica puede formar ácidos metálicos explosivos en contacto prolongado con tubos de plomo o cobre. Tras la eliminación aclarar con gran cantidad de agua con el fin de evitar depósitos de azida.

Se recomienda seguir el procedimiento descrito en estas instrucciones de empleo. De no seguir estas instrucciones, no se pueden garantizar los resultados. NO SE PUEDEN intercambiar reactivos de diferentes números de lote. En caso de realizar gran cantidad de pruebas, deberá tenerse en cuenta que todos los reactivos sean del MISMO LOTE.

6 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El kit sin estrenar es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase almacenándolo entre 2 y 8°C. ¡NO CONGELAR! Las placas con complemento hemolítico tienen una duración limitada debido los eritrocitos de cordero y deben guardarse en el frigorífico si posible. Una congelación destruirá el gel, por lo que deberán estar alejados de los elementos congeladores del frigorífico. Las placas no estrenadas deberán almacenarse planas y con la cara superior hacia abajo (la etiqueta está en la cara superior), con el fin de prevenir en los pocillos una acumulación de condensación. Tratar las placas con cuidado para evitar deteriorar el gel.

Una vez reconstituidos los calibradores y controles deberán utilizarse inmediatamente. Para un almacenamiento más largo, deberán ser alícuotados y congelados (-20°C o más bajo).

7 RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En muestras manipuladas de manera incorrecta, se puede activar la actividad del complemento, lo cual puede llevar a resultados erróneos. Por lo tanto, es esencial la corrección en la recogida, procesamiento, almacenamiento y envío de las muestras. Para este test utilizar muestras de suero recientes. No debe emplearse suero contaminado microbiológicamente, hemolizado o muy lipémico así como aquellas muestras que contengan partículas en suspensión. Las muestras de suero se deben recolectar mediante extracción intravenosa y permitir la coagulación a temperatura ambiente (18-24°C) durante aproximadamente 60 minutos. Centrifugar la muestra y transferirla a un tubo limpio. Las muestras pueden almacenarse entre 2-8°C hasta un máximo de 4 horas antes del análisis. Para una conservación a un plazo más largo, congelar y conservar a -70°C o menos las muestras. Las muestras se deben descongelar despacio, y ser analizadas lo antes posible tras la descongelación. Evitar repetidas congelaciones y descongelaciones.

8 METODOLOGÍA

(Al final de estas instrucciones se hace un resumen del procedimiento.)

8.1 Material suministrado

- 8.1.1 1 x *Total Haemolytic Complement Plate* (Placa con complemento hemolítico total, 2 placas en RC001.2, 3 placas en RC001.3)
- 8.1.2 8 x *Gel Dividers* (Divisores de gel)
- 8.1.3 1 x *Total Haemolytic Complement Calibrator* (Calibrador complemento hemolítico total, 2 en kit de 2 placas, 3 en kit de 3 placas)
- 8.1.4 1 x *Total Haemolytic Complement Control Serum* (Suero control complemento hemolítico total, 2 en kit de 2 placas, 3 en kit de 3 placas)
- 8.1.5 1 x Instrucciones
- 8.1.6 Papel gráfico semilogarítmico

8.2 Materiales necesarios pero no suministrados

- 8.2.1 Equipamiento para la colección y preparación de las muestras, p.ej. tubos de muestras, centrífuga, etc.
- 8.2.2 Pipetas para una adecuada reconstitución de los calibradores y controles y para la dilución de los controles.
- 8.2.3 Micropipetas para la aplicación de las muestras. Estas deberán dispensar 5µL exactos. Recomendamos las Binding Site Micropipettes (Artículo AD041) o jeringuillas 'Hamilton'.
- 8.2.4 Lupa de joyero (Artículo AD040) o Digital RID Plate Reader (lector digital de microplacas RID, Artículo AD400) para un aumento y medición exacta del área de lisis.
- 8.2.5 Salina fisiológica.
- 8.2.6 Agua destilada.

8.3 Preparación de los reactivos

8.3.1 Placa RID

Para evitar una contaminación del gel, se deberán utilizar las placas en un ambiente libre de polvo. Sacar la placa de su embalaje y abrir la tapa. Nota: En caso de verse en la tapa de la placa condensación, colocar la placa boca abajo hasta haber quitado la tapa, evitando así que caigan gotas dentro del gel. Asegurarse de que la placa no tenga daños durante el almacenamiento (p. Ej. grietas en el gel). Abrir la tapa y dejar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos (si necesario, más tiempo) para permitir la evaporación de la condensación. ¡No pipetar las muestras en pocillos que todavía tengan condensación!

Partición de la placa: Las placas pueden dividirse antes de su empleo hasta en cuatro secciones, utilizando para ello los divisores de gel. Colocar cada divisor con cuidado y con la arista afilada hacia abajo. El brazo estabilizador deberá descansar sobre la etiqueta de plástico central. Presionar firmemente sobre el brazo para cortar el gel y dejarlo en posición.

La división de las placas solamente se recomienda cuando se vaya a emplear en dos ocasiones y debe realizarse antes del empleo. Tras el uso parcial, las placas deberán guardarse en su sobre hermético bien cerrado entre 2 y 8°C con los separadores puestos. Guardar las placas divididas boca arriba.

8.3.2 Calibrador

Los calibradores liofilizados se deben reconstituir con agua destilada previamente enfriada a 2-8°C con el volumen de indicado en la etiqueta. Antes del empleo, todos los productos embotellados deben estar totalmente disueltos (por inmersión) como mínimo durante 30 minutos. Preparar una dilución 1/2 mezclando 100µL de calibrador con 100µL de suero fisiológico (physiological saline) previamente enfriado a 2-8°C y una dilución 1/4 mezclando 100µL de calibrador y 300µL de suero salino previamente enfriado. El calibrador y las diluciones del mismo deberán mantenerse durante la preparación en frío con el fin de mantener la integridad de los componentes de complemento.

8.3.3 Control

El control liofilizado debe ser reconstituido con el volumen indicado en la etiqueta de agua destilada previamente enfriada a 2-8°C. Mezclar por inversión con cuidado hasta que todos los contenidos se hayan disuelto completamente.

8.3.4 Muestra

La muestra no necesita ser diluida. Si se necesitara una dilución, utilizar solución salina fisiológica previamente enfriada a 2-8°C.

8.4 Aplicación de calibradores y muestras

Para obtener buenos resultados, se recomienda que todos los reactivos, muestras, placas etc. se mantengan fríos durante todo el tiempo de la manipulación. El uso de un bloque frío permitirá a las muestras ser aplicadas directamente a placas pre-enfriadas.

Antes de usar, agitar con cuidado los calibradores, el control y las muestras. Aplicar 5µL de cada uno de los tres calibradores diluidos en tres pocillos diferentes. En los pocillos restantes se deberán pipetar 5µL de muestras alícuotadas y de controles. Para que el gel no se seque, las placas no deben estar mucho tiempo abiertas.

8.5 Difusión

Estas placas de complemento hemolítico pueden emplearse en un ensayo en el mismo día o con una noche de por medio. Para el test en el mismo día, las muestras deberán poder realizar la difusión a 2-6°C durante al menos 6 horas para garantizar la formación de un área de lisis suficientemente grande (ver limitación 10.2).

Cuando se emplee en un test al día siguiente, la difusión puede realizarse hasta 18 horas. Si se prolongara más de 18 horas pueden aparecer aros múltiples y/o la lisis incompleta. Para ambos tests la difusión deberá realizarse a 2-6°C pero para el test nocturno se recomienda especialmente que la temperatura sea lo más cercana posible a 4°C para prevenir la degradación de los componentes de complemento más frágiles. Esto asegurará que las áreas de lisis finales sean bien marcadas y con límites mejor definidos. **Una temperatura de incubación de >6°C durante el periodo de lisis puede evitar una lisis completa.**

8.6 Incubación

De acuerdo con el período de difusión necesario, las placas deben incubarse a 37°C como mínimo 30 minutos. Es importante que el gel NO se seque. Por ello se deben incubar las placas dentro de los sobres herméticos bien cerrados

8.7 Control calidad

El control debe ser manipulado tras la reconstitución, exactamente igual que las muestras. El valor del control debe estar dentro del 20% del valor indicado en la etiqueta del vial.

9 MEDICIÓN E INTERPRETACIÓN

Tras el tiempo de incubación, se deben medir los diámetros con una precisión de 0,1mm, mediante una lupa de joyero o un lector RID. En la lectura con lupa debe utilizarse una luz brillante de costado y un fondo oscuro. Utilizando el papel semilogarítmico suministrado, dibujar los diámetros (en mm) de los aros formados de los tres calibradores al lado del eje "y" contra su % de actividad de complemento (100% para el calibrador sin diluir y 50% y 25% para las dos diluciones) a lo largo del eje "x". Los tres puntos deberán juntarse según se indica a continuación. De esta "curva" puede leerse el % de actividad de complemento de las muestras y de los controles y estos convertir después a valores CH100 unidades/mL.

Ejemplo: La siguiente curva de calibración se obtuvo de una placa donde se permitió una difusión de 18 horas a una temperatura de 2-6°C. El valor del calibrador sin diluir (actividad 100%) fue de 1171 CH100 unidades/mL. Una muestra sin diluir, según recomendación, dio un diámetro de aro de 8,0mm. Según la curva de calibración esto corresponde a una actividad del 45% y una actividad de complemento de 527 CH100 unidades/mL (1171 x 0,45).



10 LIMITACIONES

- Los aros más pequeños obtenidos por el test de 6 horas darán un gráfico "aplanado" haciendo que los resultados no sean tan precisos como aquellos obtenidos por el método con incubación durante toda la noche.
- En muestras con déficits en la actividad de todos los complementos o en un componente individual del complemento, las zonas de lisis resultantes pueden contener células no lisadas o mostrar anillos múltiples. En caso de resultados en donde se observe una lisis parcial o anillos de poca calidad, el valor cuantitativo obtenido puede ser impreciso. En estos casos, debe repetirse el análisis. Si se obtiene el mismo resultado, se deberá analizar si las muestras presentan una disfunción de la vía del complemento.
- Muestras hemolizadas o suero de pacientes con artritis reumatoide pueden presentar aros pobres o múltiples.
- Si se emplean dos o más placas simultáneamente, se deberá hacer por cada placa una curva de calibración por separado.
- Reemplazo de placas utilizadas parcialmente: Los pocillos no utilizados de las placas usadas parcialmente pueden utilizarse para otras muestras. Siempre y cuando no muestren signos de deterioro. Cada vez es necesario realizar una curva de calibración. La zona de lisis alrededor de pocillos anteriormente utilizados puede incrementar el tamaño debido a otra incubación a 37°C. Esto no se debe considerar como deterioro y no afecta al resultado de la placa.
- Los calibradores y controles pueden dar aros de menor calidad que las muestras recientes. Esto no afecta a la precisión del test.

10.7 Resolución de problemas

Problema	Causa (s) Posible(s)	Sugerencia(s)
A. No hay aro para calibradores o control	i) Omisión Calibrador/control.	Repetir prueba.
	ii) Temperatura de incubación durante el periodo de difusión >6°C.	Repetir prueba.
B. No hay aro para la muestra	i) Omisión de la muestra.	Repetir prueba.
	ii) Temperatura de incubación durante el periodo de difusión >6°C.	Repetir prueba.
	iii) Muestra hemolizada durante recolección o almacenamiento.	Revisar recolección de muestras y almacenamiento. Repetir con una muestra fresca.
	iv) Baja actividad de complemento hemolítico debido a disfunción de la vía clásica del complemento o deficiencias en el almacenamiento /manipulación de la muestra.	Revisar almacenamiento y manipulación de las muestras. Repetir prueba si fuera necesario.
C. Aros no circulares	i) Aplicación de la muestra deficiente.	Repetir prueba.
	ii) Gel se ha secado antes del uso o el producto ha caducado.	Repetir prueba con una placa nueva.
	iii) Gel se ha secado durante la aplicación de la muestra o durante la incubación.	Repetir prueba minimizando el tiempo de apertura de la placa. Incubar con tapa bien cerrada en cámara húmeda o sellada en sobre hermético.
D. Zonas claras en el gel antes de usar	La placa ha sido congelada, se ha secado el gel, ha caducado y/o ha sido contaminada.	Revisar almacenamiento y repetir el test con una placa nueva.

Problema	Causa (s) Posible(s)	Sugerencia(s)
E. Lisis incompleta y/o aros múltiples	i) Baja actividad de complemento hemolítico debido a disfunción de la vía clásica o deficiencia de factor.	Confirmar con otros resultados clínicos.
	ii) Muestra hemolizada durante la recolección o almacenamiento.	Revisar recolección muestras y condiciones almacenamiento. Repetir prueba con una muestra fresca.
	iii) Sueros de pacientes con artritis reumatoide.	Comprobar historial clínico del paciente.
	iv) La temperatura de incubación durante el periodo de difusión es >6°C.	Repetir prueba.
F. Gel débil, picado	i) La placa ha sido congelada.	Repetir prueba con placa nueva. Revisar condiciones de almacenamiento.

10.8 Si se obtuviera un resultado no esperado, deberá repetirse el test preferiblemente con una muestra fresca.

10.9 Este kit es un apoyo en el diagnóstico de la enfermedad. Un resultado no esperado puede sugerir ciertas enfermedades las cuales deben confirmarse usando un método alternativo de análisis. Los resultados obtenidos con este test no confirman el diagnóstico de la presencia o ausencia de la enfermedad.

10.10 FDA (USA) Advertencia: ver la primera página de la metodología en inglés.

Si hay algún problema no indicado en esta tabla, por favor diríjase al proveedor.

11 VALORES ESPERADOS

Actividades complemento en suero de adultos normales (determinadas utilizando estos kits):

	Actividad mediana (CH100 unidades/mL)	Rango percentil 95 (CH100 unidades/mL)
Número de muestras (n) = 38	728	392-1019

Una actividad de complemento decreciente puede estar asociada a varias condiciones (ver sección 2). Los valores esperados pueden verse afectados por la edad, sexo, dieta, localización geográfica, embarazo, enfermedad y otros factores. Para salvar diferencias en la recolección/preparación de las muestras y en el procedimiento del test se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales. Muestras con una actividad de complemento inferior al rango percentil 95 pueden tener deficiencia de complemento y deberán ser investigadas más detalladamente. En caso de resultados en donde se observe una lisis parcial o anillos de poca calidad, el valor cuantitativo obtenido puede ser impreciso. En estos casos, debe repetirse el análisis. Si se obtiene el mismo resultado, se deberá analizar si las muestras presentan una disfunción de la vía del complemento.

12 CARACTERÍSTICAS

12.1 Precisión

La precisión intra-serie se determinó mediante la medición de tres preparaciones de suero utilizando el método de 18 horas sobre 5 placas THC de un lote típico. La precisión inter-serie se determinó mediante la medición de tres preparaciones de suero utilizando el método de 18 horas sobre 5 placas THC de diferentes lotes.

PRECISIÓN INTRA-SERIE		
	Conc. media (CH100 unidades/mL)	CV (%)
Muestra 1	1050	0
Muestra 2	840	3,9
Muestra 3 (Control)	590	10,3

PRECISIÓN INTER-SERIE		
	Conc. media (CH100 unidades/mL)	CV (%)
Muestra A	627	1,6

12.2 Estudio comparativo

Se realizó un estudio comparativo de especificidad, sensibilidad y correlación relativa con 79 muestras clínicas y 40 sueros de donantes de suero adultos normales utilizando este kit y con un método de referencia comercial. Las muestras con el kit de Binding Site se consideraron negativas si la actividad CH100 estaba por debajo del rango percentil 95.

Test de Binding Site	Test competidor	
	+	-
+	29	11
-	1	78
Sensibilidad relativa	96,7%	
Especificidad relativa	87,6%	
Correlación relativa	89,9%	

13 BIBLIOGRAFÍA

- Janeway CA & Travers P (1994). Immunobiology: The immune system in health and disease. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Tomlinson S (1993). Complement defence mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 5,83-89.
- Frank MM & Fries LF (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12, 322-326.
- Poddack ER & Tschopp J (1982). Polymerisation of the ninth component of complement (C9): the formation of poly-C9 with a tubular ultrastructure resembling the membrane attack complex of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 574-578.
- Kolb WP et al. (1972). Molecular analysis of the membrane attack complex mechanisms of complement. *J Exp. Med.* 135, 549-566.
- Muller-Eberhard HJ (1975). Complement. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 697-724
- Morgan BP & Walport MJ (1991). Complement deficiency and disease. *Immunol. Today* 12, 301-306.

14 RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

- Reconstituir calibrador y control con agua destilada previamente enfriada a 2-8°C.
- Preparar diluciones 1/2 y 1/4 del calibrador utilizando solución salina.
- Permitir que se evapore la condensación de la(s) placa(s).
- Aplicar el calibrador, diluciones de calibrador, control y muestras en la placa en volúmenes de 5µL.
- Colocar la tapa y permitir la difusión entre 6 y 18 horas a una temperatura de 2-6°C.
- Incubar como mínimo 30 minutos a una temperatura de 37°C.
- Medir áreas de lisis.
- Trazar curva de calibración e interpretar resultados.

1	Utilização
2	Resumo e explicação
3	Princípio do método
4	Reagentes
5	Precauções
6	Conservação e estabilidade
7	Colheita e preparação das amostras
8	Metodologia
9	Medição dos halos e processamento dos resultados
10	Limitações da técnica
11	Valores de referência
12	Desempenho do kit
13	Bibliografia
14	Resumo da técnica

COMPLEMENTO HEMOLÍTICO TOTAL

Português

Para diagnóstico *in vitro***Código do Produto: RC001.1/2/3**

Produto fabricado por:
 The Binding Site Group Ltd, PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, U.K.
 www.bindingsite.co.uk
 Telefone: +44 (0)121 436 1000
 Fax: +44 (0)121 473 7061
 e-mail: info@bindingsite.co.uk

**1 UTILIZAÇÃO**

Este kit destina-se à determinação da actividade do Complemento Hemolítico Total humano através do "pathway" clássico no soro humano, como contributo no diagnóstico de doenças imunológicas especialmente aquelas associadas com deficiências dos componentes do complemento.

2 RESUMO E EXPLICAÇÃO

O "pathway" clássico é uma sucessão de reacções em cascata que envolve 11 proteínas, as quais conduzem à lise das membranas celulares e, em última fase à morte das células.

A activação do "pathway" do complemento clássico ocorre devido à interacção dos complexos antigénio/anticorpo com o complemento C1 o qual, por sua vez, activa o C4, conduzindo de seguida à activação do C2, C3 e C5. Activado o C5 (C5b) liga-se ao C6, C7, C8 e 12 a 18 moléculas de C9 para formar um grande complexo conhecido como o complexo de ataque da membrana (CAM). É este complexo que rompe as membranas das células conduzindo à sua morte. (refs. 1-6)

Uma diminuição da actividade do complemento pode ser causada por deficiências de qualquer um dos componentes do complemento individualmente, genética ou adquirida e pode estar associada com deficiências genéticas do complemento, Glomerulonefrites, Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) Vasculites e um número de alterações não imunológicas. (ref. 7)

3 PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método é baseado na Imuno Difusão Radial (com incubação de 2-6°C) de soro contendo componentes do complemento activo a partir de um poço cilíndrico através de gel de agarose contendo eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpos eritrócitos de coelho anti-carneiro designados por hemolizinas. Durante o período de difusão o complemento C1 é fixado pelas hemolizinas. Com incubação a 37°C o processo de reacções em cascata do complemento conduz à lise dos eritrócitos de carneiro resultando numa zona clara, cujo tamanho depende da actividade do complemento inicial no soro.

Medindo as zonas de lise produzidas por um número de soros de actividade do complemento conhecida, pode ser construída uma curva de calibração em papel semi-logarítmico dispondo no eixo vertical (y) o valor do diâmetro dos halos das zonas claras e no eixo horizontal (x) a actividade do complemento correspondente. A actividade do complemento em amostras desconhecidas pode ser determinada através da medição das suas zonas de lise (halos) e da leitura na curva de calibração, considerando que a qualidade do anel do halo é aceitável (ver as limitações do procedimento, secção 10).

4 REAGENTES

- 4.1 Placas de complemento hemolítico (placas em invólucro de papel de alumínio). Estas placas contêm eritrócitos de carneiro sensibilizados. Podem ser processadas até 14 amostras por placa (incluindo calibradores e controlos). Conservantes: 0,02% de azida de sódio.
- 4.2 Calibradores. Estes calibradores são fornecidos liofilizados. A actividade do complemento está referida no rótulo do frasco.
- 4.3 Controlos. Estes controlos são fornecidos liofilizados. Os valores esperados da actividade do complemento estão referidos no rótulo do frasco.

5 PRECAUÇÕES

A todos os dadores de soro humano que é fornecido neste kit foram realizados testes, tendo-se revelado negativos para os antígenos de superfície da Hepatite B (HBsAg) e anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV1 e HIV2) e para o vírus da Hepatite C. Contudo, estes testes não podem garantir a ausência de agentes infecciosos. Deve proceder-se a um manuseamento e métodos de destruição adequados para todo o material potencialmente infectado e apenas a pessoal treinado adequadamente nestes métodos deverá ser permitida a execução destes procedimentos.

As placas contêm azida de sódio como conservante, pelo que terão que ser manuseadas com precaução – não ingerir nem permitir o contacto com a pele ou membranas mucosas. Se ocorrer um contacto com o produto, deve-se lavar abundantemente com água e consultar um médico. Em contacto com canalizações de chumbo ou cobre, podem-se formar sais explosivos; para evitar que tal aconteça, fazer correr abundante quantidade de água aquando da inutilização dos reagentes.

Recomenda-se a adesão ao procedimento indicado. A validade dos resultados obtidos, usando procedimentos diferentes dos recomendados não pode ser garantida. NÃO utilizar reagentes de kits de lotes diferentes. Se for executado um número elevado de testes deve ter-se a certeza de que todos os reagentes utilizados são do mesmo lote.

6 CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Os kits antes de abertos devem ser conservados a 2-8°C e podem ser utilizados até à data de validade referida no rótulo do kit. NÃO CONGELAR. As placas de complemento hemolítico têm um prazo de validade limitado devido ao tempo de sobrevivência dos eritrócitos de carneiro pelo que, devem ser conservados o maior tempo possível no frigorífico. O gel de agarose será destruído se for congelado pelo que as placas devem ser conservadas afastadas de elementos de congelação dos frigoríficos. As placas enquanto não abertas deverão ser conservadas horizontalmente com a etiqueta do invólucro voltada para cima de modo a evitar a acumulação de condensação nos poços. As placas devem ser manuseadas com cuidado de modo a evitar a destruição de gel.

Uma vez reconstituídos os calibradores e os controlos devem ser usados imediatamente. Em caso de necessidade de guardar estes materiais reconstituídos (quando se usar só parte da placa) aconselha-se a sua distribuição em alíquotas e a conservação a temperatura de -20°C ou inferior.

7 COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A actividade do complemento pode ser activada se as amostras forem incorrectamente manuseadas, conduzindo a resultados erróneos. Como tal, a correcta colheita, processamento, armazenamento e expedição das amostras é crucial. Usar amostras de soro fresco. Amostras contaminadas microbiologicamente, hemólizadas, lipémicas ou que contenham outro tipo de materiais inquitantes, não devem ser usadas por poderem conduzir a lises incompletas. O sangue deve ser colhido por via venosa e permitido coagular à temperatura ambiente (18-24°C) durante aproximadamente 60 minutos. Centrifugar as amostras e transferir para um tubo limpo. Armazenar por um máximo de 4 horas a 2-8°C ou em gelo antes da análise. Para períodos de tempo de armazenamento mais longos, congelar as amostras a -70°C ou inferior. As amostras congeladas devem ser descongeladas lentamente em gelo e testadas o mais brevemente possível depois da descongelação. O congelamento e descongelamento repetidos devem ser evitados.

8 METODOLOGIA

(Um resumo dos procedimentos é mencionado no final deste protocolo de instruções.)

8.1 Conteúdo do kit

- 8.1.1 1 x *Total Haemolytic Complement Plate* (Placa de complemento hemolítico total em invólucro de papel de alumínio, 2 placas no kit RC001.2, 3 placas no kit RC001.3)
- 8.1.2 8 x *Gel Dividers* (seccionadores de gel de agarose por placa)
- 8.1.3 1 x *Total Haemolytic Complement Calibrator* (Calibrador do complemento hemolítico total, 2 no kit de 2 placas, 3 no kit de 3 placas)
- 8.1.4 1 x *Total Haemolytic Complement Control Serum* (Soro controlo do complemento hemolítico total, 2 no kit de 2 placas, 3 no kit de 3 placas)
- 8.1.5 1 x Folheto de instruções
- 8.1.6 Papel semi-logarítmico

8.2 Materiais necessários mas não fornecidos

- 8.2.1 Equipamento para a colheita e preparação das amostras (ex tubos de centrifuga, centrífuga, etc.).
- 8.2.2 Pipeta para uma rigorosa reconstituição dos calibradores e dos controlos e para a diluição dos calibradores.
- 8.2.3 Micropipetas para a aplicação das amostras. Estas deverão dispensar, de um modo exacto, um volume de 5µL. São recomendadas as Micropipetas da The Binding Site (código AD041) ou seringas 'Hamilton'.
- 8.2.4 Usar um ocular (Código AD040) ou um leitor digital de placas de IDR (AD400) para amplificar e medir o diâmetro dos halos de precipitação com uma precisão até 0,1mm.
- 8.2.5 Solução fisiológica salina.
- 8.2.6 Água destilada.

8.3 Preparação dos reagentes

8.3.1 Placas de IDR

Para evitar a contaminação do gel, as placas deverão ser usadas num ambiente isento de poeiras. Retirar a placa do invólucro de alumínio e remover a tampa. Se a condensação for visível a placa deverá ser mantida invertida antes da tampa ser removida para evitar a queda de gotículas no gel. Verificar a placa para assegurar que não ocorreu deterioração durante a conservação ou transporte, por exemplo falhas no gel. Deixar a placa aberta durante 10-15 minutos (ou mais se necessário) à temperatura ambiente para permitir que qualquer condensação nos poços ou na superfície do gel evapore. As amostras nunca deverão ser aplicadas nos poços onde ainda seja visível humidade.

Secionamento das placas: As placas podem ser seccionadas até quatro secções, usando os seccionadores de gel fornecidos, antes da utilização. Cada seccionador deve ser cuidadosamente posicionado no gel, com a lâmina de corte para baixo, com o braço de estabilização em repouso em cima da etiqueta central da placa. Premir o braço para cortar o gel e deixá-lo nessa posição.

O seccionamento das placas é recomendado somente quando a placa é usada em 2 ocasiões. As placas devem ser seccionadas antes de usar. Após a primeira utilização as placas seccionadas devem ser guardadas novamente no invólucro de alumínio e conservadas a 2-8°C com os seccionadores de gel aplicados. Guardar as placas seccionadas com a tampa para cima.

8.3.2 Calibradores

Os calibradores liofilizados devem ser reconstituídos com água destilada pré-arrefecida a 2-8°C usando o volume indicado no rótulo do frasco. Antes de usar, todo o material do frasco incluindo qualquer que se encontre aderente nas suas paredes deve ser completamente dissolvido através de várias inversões do frasco. Preparar uma diluição de 1:2 misturando 100µL do calibrador com 100µL de soro fisiológico previamente arrefecido a 2-8°C e uma diluição de 1:4 misturando 100µL do calibrador a 300µL de soro fisiológico pré-arrefecido. O calibrador e suas diluições devem ser conservados arrefecidos o mais tempo possível durante a preparação de modo a manter a integridade dos componentes do complemento.

8.3.3 Controlo

O controlo liofilizado deve ser reconstituído com água destilada pré-arrefecida a 2-8°C usando o volume indicado no rótulo do frasco. Eles devem ser misturados suavemente por inversões do frasco até que o seu conteúdo esteja completamente dissolvido.

8.3.4 Amostra

As amostras devem ser aplicadas sem diluição. Contudo, se 1 diluição for necessária, usar soro fisiológico pré-arrefecido a 2-8°C.

8.4 Pipetagem dos calibradores e das amostras

Para obtenção de melhores resultados é recomendado que todos os reagentes, amostras e placas etc. sejam conservados completamente arrefecidos durante o processo de aplicação. O uso de um bloco de congelação permite que as amostras sejam aplicadas pré-arrefecidas nas placas.

Os calibradores, controlos e amostras, devem ser homogeneizados suavemente imediatamente antes de usar. Pipetar 5µL de cada uma das três diluições dos calibradores em três diferentes poços. Nos poços restantes devem ser seguidamente pipetados 5µL das amostras e dos controlos conforme recomendado. As placas não devem ser deixadas abertas por longos períodos durante a pipetagem dos calibradores e das amostras porquanto isto causará um excesso de secagem do gel.

8.5 Difusão

A determinação do complemento hemolítico total com estas placas, pode ser executado durante o dia (no mesmo dia) ou no dia seguinte. No teste executado no mesmo dia as amostras podem ser deixadas a difundir entre 2-6°C durante pelo menos 6h, tempo necessário para garantir uma formação suficientemente ampla dos diâmetros das zonas de lise (ver limitações 10.2).

No teste a executar no dia seguinte a difusão pode ter lugar até 18h. Se se prolongar a difusão para além das 18h podem aparecer halos múltiplos/podem ocorrer processos de lise incompletos. Em ambos os processos a difusão pode ter lugar a 2-6°C mas no teste no dia seguinte é especialmente importante que a temperatura possa ser mantida o mais próximo possível de 4°C de modo a evitar a degradação dos componentes do complemento mais frágeis. Isto assegurará que as zonas de lise mais afastadas sejam finas, com contornos bem definidos. **Incubações a temperaturas superiores a 6°C durante o período de difusão podem impedir lises completas.**

8.6 Incubação

Após o período de difusão recomendado as placas devem ser sujeitas a uma incubação de 37°C durante um período mínimo de 30m. É importante que os géis não sequem. Para evitar que isto aconteça as placas devem ser guardadas novamente nos invólucros de papel de alumínio.

8.7 Controlo de qualidade

O soro controlo depois de reconstituído deve ser tratado exactamente como as amostras. Os valores de soro controlo a obter devem estar compreendidos entre ±20% dos valores referidos no rótulo do frasco.

9 MEDIÇÃO DOS HALOS E PROCESSAMENTO DOS RESULTADOS

Depois da incubação os diâmetros das zonas de lise (halos) devem ser medidos com uma aproximação à precisão de 0,1mm, usando uma ocular ou um leitor de placas de IDR. Quando a leitura for feita com o ocular usar uma iluminação lateral forte e fundo escuro. Usando o papel semi-logarítmico fornecido, distribuir ao longo do eixo dos y (vertical) o valor do diâmetro (mm) dos halos formados com os três calibradores e no eixo dos x (horizontal) distribuir a actividade do complemento correspondente a cada um dos calibradores (100% para o calibrador não diluído, 50% e 25% para os outros dois calibradores diluídos). Os três pontos encontrados deverão ser ligados conforme se mostra abaixo. Os valores da actividade do complemento em % para as amostras e os controlos podem então ser lidos nesta curva e seguidamente convertidos em valores de unidades/mL de CH100.

Exemplo: A curva de calibração seguinte foi obtida numa placa em que a difusão foi de 18h a 2-6°C. O valor do calibrador não diluído (actividade de 100%) era de 1171 unidades/mL de CH100.

A amostra não diluída aplicada, deu um halo com um diâmetro de 8,0mm. Na curva de calibração este valor corresponde a uma actividade de 45% e consequentemente a uma actividade do complemento de 527 unidades/mL de CH100 (1171 x 0,45).



10 LIMITAÇÕES DA TÉCNICA

- 10.1 Os halos menores obtidos nos procedimentos de 6h dão um gráfico aplanado menos exacto do que os obtidos com os procedimentos no dia seguinte.
- 10.2 Em amostras onde exista deficiência em toda a actividade do complemento ou num único componente do complemento, as zonas de lise resultantes podem conter células não lisadas ou podem apresentar halos múltiplos. Quando é observada a lise parcial ou os halos são de fraca qualidade, o valor quantitativo obtido pode não ser correcto. Nestes casos, deve ser requerida uma repetição da amostra. Se os resultados obtidos forem os mesmos, então as amostras devem ser investigadas mais aprofundadamente pois podem indicar uma disfunção na cascata do complemento.
- 10.3 Amostras hemolizadas ou soros de doentes com artrite reumatóide podem apresentar também halos múltiplos ou pouco nítidos.
- 10.4 Se duas ou mais placas forem usadas simultaneamente deve ser elaborada uma curva de calibração para cada uma delas.
- 10.5 Reutilização de parte de placa já usada. Os poços não usados de placas anteriormente utilizadas podem ser utilizados posteriormente com novas amostras desde que as placas não manifestem sinais de deterioração. Sempre que se proceder a novas determinações terá que se elaborar uma nova curva de calibração. As zonas de lise dos poços usados anteriormente aumentarão de tamanho devido à subsequente incubação a 37°C. Este facto não deve ser considerado como deterioração pelo que os resultados não serão afectados.
- 10.6 Os calibradores e controlos podem dar halos de qualidade inferior aos de amostras frescas. Isto não afecta a exactidão do teste.

10.7 Resolução de problemas

Problema	Causas possíveis	Ações recomendadas
A. Nenhum halo de calibradores ou controlo	i) Calibrador/controlo omitidos	Repetir o teste
	ii) Temperatura de incubação durante o período de difusão >6°C	Repetir o teste
B. Nenhum halo na amostra	i) Amostra omitida	Repetir o teste
	ii) Temperatura de incubação do período de difusão >6°C	Repetir o teste
	iii) Hemólise da amostra durante a colheita ou durante a sua conservação	Rever a colheita da amostra e a sua conservação. Repetir com amostra fresca
	iv) Baixa actividade do complemento hemolítico devido a disfunções do "pathway" clássico ou deficiente conservação/ transporte da amostra	Rever a conservação da amostra e o transporte. Repetir se necessário
C. Halos irregulares (não circulares)	i) Deficiente aplicação da amostra	Repetir o teste
	ii) Secagem do gel antes de usar, devido a deficiente processo de conservação ou produto com prazo de validade ultrapassado	Repetir o teste usando nova placa
	iii) Secagem do gel durante a aplicação da amostra ou durante a incubação	Repetir o teste usando nova placa, limitando o tempo da placa aberta. Incubar com a placa fechada e introduzir na embalagem de alumínio
D. Zonas visíveis no gel antes de usar	A placa foi congelada, seca, contaminada, ou tem o prazo expirado	Rever a conservação e repetir o teste usando nova placa
E. Lise incompleta e/ou halos múltiplos	i) Reduzida actividade do complemento hemolítico devido a disfunção do "pathway" clássico ou deficiência de factor	Confirmar com outros testes auxiliares de diagnóstico

	ii) Hemólise da amostra durante a colheita ou durante a sua conservação	Rever colheita da amostra e a sua conservação. Repetir o teste com amostra fresca
	iii) Soro de doente com artrite reumatóide	Verifique a história clínica do doente
	iv) Temperatura de incubação durante o período de difusão > a 6°C	Repetir o teste
F. Gel ligeiramente picado	i) A placa foi congelada	Repetir o teste usando nova placa. Rever a conservação

- 10.8 Se forem obtidos resultados inesperados o teste deve ser repetido preferencialmente com uma amostra fresca.
- 10.9 Este kit é usado unicamente como auxiliar de diagnóstico, resultados anormais podem sugerir certo tipo de doenças, o que deve ser confirmado com outros auxiliares de diagnóstico e outros testes serológicos. Os resultados obtidos com este teste não servem como prova de diagnóstico da presença ou ausência da doença.
- 10.10 Informação da FDA (EUA) - ver folha de rosto do Folheto de Instruções em Inglês.

Se os problemas persistirem, contactar o representante.

11 VALORES DE REFERÊNCIA

Actividade do complemento em soros de adultos considerados normais (determinados com estes kits):

	Actividade média (unidades/mL de CH100)	Varição de 95 percentil (unidades/mL de CH100)
Nº de amostras (n)=38	728	392-1019

A diminuição da actividade do complemento pode estar associada a várias situações (Ver secção 2). Os valores de referência são afectados pela idade, sexo, dieta, localização geográfica, gravidez, doença e outros factores. Para ultrapassar a influência das diferenças de colheita/preparação em amostras e no processamento do teste é vivamente recomendado que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência. Amostras com a actividade do complemento inferior a 95 de percentil podem significar deficiência do complemento e devem ser controladas regularmente. Quando é observada a lise parcial ou os halos são de fraca qualidade, o valor quantitativo obtido pode não ser correcto. Nestes casos, deve ser requerida uma repetição da amostra. Se os resultados obtidos forem os mesmos, então as amostras devem ser investigadas mais aprofundadamente pois podem indicar uma disfunção na cascata do complemento.

12 DESEMPENHO DO KIT

12.1 Precisão

A precisão intratestes foi determinada através da medição dos halos de 3 soros usando o procedimento de 18h em 5 placas de CHT de um lote normal. A precisão entre testes foi determinada através de medição dos halos de 1 soro usando o procedimento de 18h em 5 placas de CHT de diferentes lotes.

PRECISÃO INTRATESTES		
	Concentração média (unidades/mL de CH100)	%CV
Amostra 1	1050	0
Amostra 2	840	3,9
Amostra 3 (Controlo)	590	10,3

PRECISÃO INTERTESTES		
	Conc. média (unidades/mL de CH100)	CV (%)
Amostra A	627	1,6

12.2 Comparação

A especificidade, sensibilidade e concordância relativas foram determinadas contra um método comercial de referência disponível usando 79 soros patológicos e 40 soros de doadores adultos saudáveis. As amostras foram consideradas como negativas com o kit da Binding Site quando os valores da actividade do CH100 foram inferiores a um valor de 95 de percentil.

Teste da Binding Site	Teste da concorrência	
	+	-
	29	11
	1	78
Sensibilidade relativa	96,7%	
Especificidade relativa	87,6%	
Correlação relativa	89,9%	

13 BIBLIOGRAFIA

- 13.1 Janeway CA & Travers P (1994). Immunobiology: The immune system in health and disease. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 13.2 Tomlinson S (1993). Complement defence mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 83-89.
- 13.3 Frank MM & Fries LF (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12, 322-326.
- 13.4 Poddack ER & Tschopp J (1982). Polymerisation of the ninth component of complement (C9): the formation of poly-C9 with a tubular ultrastructure resembling the membrane attack complex of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 574-578.
- 13.5 Kolb WP *et al.* (1972). Molecular analysis of the membrane attack complex mechanisms of complement. *J. Exp. Med.* 135, 549-566.
- 13.6 Muller-Eberhard HJ (1975). Complement. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 697-724
- 13.7 Morgan BP & Walport MJ (1991). Complement deficiency and disease. *Immunol. Today* 12, 301-306.

14 RESUMO DA TÉCNICA

- 14.1 Reconstituir o calibrador e controlo com água destilada pré arrefecida a 2-8°C.
- 14.2 Preparar calibradores diluídos a 1/2 e 1/4 usando soro fisiológico arrefecido.
- 14.3 Evaporar a condensação existente nas placas.
- 14.4 Pipetar 5µL do calibrador não diluído, dos calibradores diluídos, do controlo e das amostras, na placa.
- 14.5 Tapar a placa e aguardar que a difusão ocorra entre 6 e 18h à temperatura de 2-6°C.
- 14.6 Incubar a 37°C por um tempo mínimo de 30m.
- 14.7 Proceder à medição das zonas de lise (halos).
- 14.8 Construir a curva de calibração e ler nela os resultados.

INDICE

Pagina

1	Indicazioni
2	Riassunto e descrizione
3	Principio del metodo
4	Reagenti
5	Precauzioni
6	Conservazione e stabilita'
7	Prelievo dei campioni e preparazione
8	Metodologia
9	Misurazione dell'anello ed elaborazione dei risultati
10	Limiti della procedura
11	Valori attesi
12	Prestazioni
13	Bibliografia
14	Sintesi della procedura

COMPLEMENTO EMOLITICO TOTALE

Italian

Per uso diagnostico *in vitro*

Codice Prodotto: RC001.1/2/3

Prodotto da:

The Binding Site Group Ltd, PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, UK
www.bindingsite.co.uk

Telefono: +44 (0) 121 436 1000

Fax: +44 (0) 121 430 7061

e-mail: info@bindingsite.co.uk



1 INDICAZIONI

Il presente kit misura l'attività, nel siero umano, del complemento emolitico umano attraverso la via classica, come sussidio per la diagnosi di disfunzioni immunologiche, in particolar modo quelle associate al deficit dei componenti del complemento.

2 RIASSUNTO E DESCRIZIONE

La via classica del complemento è una cascata di reazioni in cui sono coinvolte 11 proteine, che conduce alla lisi delle membrane cellulari fino alla morte cellulare.

L'attivazione della via classica del complemento avviene per l'interazione di complessi antigene-anticorpo con il complemento C1, che poi attiva il C4 causando, a sua volta, l'attivazione del C2, C3 e C5. Il C5 attivato (C5b) si lega al C6, C7, C8 e a 12-18 molecole di C9 formando un grosso complesso noto come il complesso di attacco alla membrana (MAC). È questo il complesso che distrugge le membrane cellulari causando la morte cellulare (rif. 1-6).

Una diminuzione nell'attività del complemento può essere causata dal deficit di un qualsiasi componente del complemento, sia esso ereditario o acquisito, ed è collegabile ai deficit ereditari del complemento, alla glomerulonefrite, al lupus eritematoso sistemico (LES), alla vasculite e ad un numero di forme non-immunologiche (rif. 7).

3 PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo si basa sulla diffusione radiale a 2-6°C di un siero contenente componenti attivi del complemento da un pozzetto cilindrico in un gel di agarosio contenente eritrociti di pecora sensibilizzati con un anticorpo anti-eritrociti ovini di coniglio noto come emolisina. Durante tale fase di diffusione il complemento C1 viene fissato dall'emolisina. Con l'incubazione a 37°C parte la cascata del complemento, causando la lisi degli eritrociti di pecora e formando una zona chiara la cui misura dipende dall'attività del complemento d'origine nel siero.

Misurando le zone di lisi prodotte da un determinato numero di campioni la cui attività del complemento è nota, sarà possibile tracciare una curva di calibrazione riportando il diametro rispetto all'attività del complemento su carta semilogaritmica. L'attività del complemento in un campione sconosciuto può quindi essere determinata misurando la zona di lisi e leggendo il valore corrispondente sulla curva di calibrazione, purché la qualità dell'anello risulti accettabile (vedi *Limiti della procedura*, sezione 10).

4 REAGENTI

4.1 Piastrre complemento emolitico (fornite in sacchetti di alluminio richiudibili). Queste contengono eritrociti di pecora sensibilizzati. E' possibile misurare fino a quattordici campioni per piastra (compresi i calibratori e i controlli). Conservante: 0,02% sodio azide.

4.2 Calibratori: Forniti liofilizzati. L'attività del complemento è riportata sull'etichetta del flacone.

4.3 Controlli: Forniti liofilizzati. L'attività del complemento attesa è riportata sull'etichetta del flacone.

5 PRECAUZIONI

Il siero dei donatori fornito in questo kit è stato dosato ed è risultato negativo all'antigene dell'Epatite B (HbsAg) ed agli anticorpi dell'Epatite C e al virus dell'immunodeficienza umana (HIV 1 & 2). Tali test tuttavia non sono in grado di garantire l'assenza di agenti infettivi. Devono essere stabiliti metodi di trattamento e di eliminazione adeguati come per tutti i materiali potenzialmente infetti e soltanto il personale esperto ed autorizzato deve eseguire le procedure.

Le piastrre contengono sodio azide come conservante e devono essere maneggiate con cura – non ingerire né permettere il contatto con la pelle o le mucose. In caso di contatto, lavare con molta acqua e rivolgersi al medico. Azidi metalliche esplosive si possono formare con il rame e il piombo. Lavare con molta acqua i recipienti che hanno contenuto questi reagenti allo scopo di evitare l'accumulo di azide.

Si raccomanda di attenersi rigorosamente alla procedura indicata. Non può essere garantita la validità dei risultati ottenuti utilizzando parametri diversi da quelli forniti. I reagenti provenienti da lotti diversi NON sono intercambiabili. Se si effettuano numerosi test, si consiglia di assicurarsi che tutti i reagenti provengano dallo stesso lotto.

6 CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I kit non aperti devono essere conservati a 2-8°C e possono essere utilizzati fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit. NON CONGELARE. Le piastrre del complemento emolitico hanno una scadenza limitata dalla sopravvivenza degli eritrociti di pecora e devono essere conservate a 2-8°C per quanto possibile. Il congelamento distruggerà il gel di agarosio, quindi le piastrre devono essere tenute lontano dagli elementi raffreddanti nei frigoriferi. Le piastrre non aperte devono essere conservate in piano e capovolte (etichetta della confezione verso l'alto) per evitare che la condensa si accumuli nei pozzetti. Manipolare le piastrre con cura per evitare di danneggiare il gel.

Una volta ricostituiti, i calibratori ed i controlli devono essere utilizzati immediatamente. Se è richiesta la conservazione del materiale ricostituito, es. per l'utilizzo con piastrre già parzialmente usate, le aliquote devono essere congelate a -20°C o a temperatura inferiore.

7 PRELIEVO DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

L'attività del complemento può essere attivata se i campioni vengono manipolati in modo improprio e ciò può determinare risultati erronei. Pertanto, corrette modalità di raccolta, processamento, conservazione e trasporto dei campioni costituiscono un requisito essenziale. Utilizzare campioni di siero freschi. I sieri microbiologicamente contaminati, emolizzati e molto lipemici o quei campioni contenenti particelle in sospensione non devono essere utilizzati in quanto si potrebbe verificare una lisi incompleta. I prelievi devono essere effettuati per via venosa, lasciando che il sangue si coaguli a temperatura ambiente (18-24°C) per circa 60 minuti. Centrifugare il campione e trasferirlo in una provetta pulita. Conservare a 2-8°C o su ghiaccio per un periodo di tempo massimo di 4 ore, prima del dosaggio. Per periodi di conservazione più lunghi congelare i campioni a -70°C o a temperature inferiori. I campioni congelati devono essere scongelati lentamente su ghiaccio e analizzati prima possibile dopo lo scongelamento. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente.

8 METODOLOGIA

(Un riassunto dell'intera procedura è riportato al termine di queste istruzioni per l'uso.)

8.1 Materiale fornito:

- 8.1.1 1x *Total Haemolytic Complement Plate* (Piastra complemento emolitico totale, in un sacchetto di alluminio, 2 piastrre nel kit RC001.2, 3 piastrre nel kit RC001.3)
- 8.1.2 8 x *Gel Dividers* (Divisori gel)
- 8.1.3 1 x *Total Haemolytic Complement Calibrator* (Calibratore complemento emolitico totale, 2 nel kit da 2 piastrre, 3 nel kit da 3 piastrre)
- 8.1.4 1 x *Total Haemolytic Complement Control Serum* (Siero di controllo complemento emolitico totale, 2 nel kit da 2 piastrre, 3 nel kit da 3 piastrre)
- 8.1.5 1 x Istruzioni per l'uso
- 8.1.6 Carta semilogaritmica

8.2 Materiale necessario ma non fornito:

- 8.2.1 Apparecchiatura per la raccolta e la preparazione dei campioni per es. provette, centrifuga etc.
- 8.2.2 Pipette per un'accurata ricostituzione dei calibratori e dei controlli e per la diluizione dei calibratori.
- 8.2.3 Micropipette per dispensare i campioni. Devono dispensare accuratamente volumi di 5µL. Si raccomanda l'uso delle micropipette di Binding Site (codice AD041) o delle siringhe 'Hamilton'.
- 8.2.4 Lente Oculare (codice AD040) o Digital RID Plate Reader (lettore digitale di piastrre RID, codice AD400) per l'ingrandimento e la misurazione accurata delle zone di lisi fino a 0,1mm.
- 8.2.5 Soluzione fisiologica.
- 8.2.6 Acqua distillata.

8.3 Preparazione dei reagenti

8.3.1 Piastra RID

Per evitare la contaminazione del gel, le piastrre devono essere utilizzate in un ambiente senza polvere. Prendere la piastra dal sacchetto di alluminio e rimuovere il coperchio. Se è visibile della condensa, la piastra deve essere tenuta al contrario finché il coperchio non viene rimosso per evitare che cadano delle goccioline sul gel. Verificare che la piastra non sia danneggiata durante la conservazione o durante il trasporto, per es. fessure nel gel. Lasciare la piastra aperta a temperatura ambiente per 10-15 minuti (o più a lungo se necessario) per permettere all'eventuale condensa nei pozzetti o sulla superficie del gel di evaporare. Mai dispensare i campioni nei pozzetti dove è ancora visibile dell'umidità.

Partizione delle piastrre: Prima dell'uso, le piastrre possono essere ripartite in quattro sezioni al massimo utilizzando i separatori di gel forniti insieme alle piastrre. Ogni separatore deve essere posizionato con attenzione sul gel, con il bordo tagliente rivolto verso il basso ed il braccio di stabilizzazione appoggiato sull'etichetta centrale della piastra. Esercitare la pressione sul braccio per tagliare il gel e lasciare in posizione.

La partizione delle piastrre è consigliata se la piastra deve essere utilizzata in due riprese diverse. Le piastrre devono essere ripartite prima dell'uso. Dopo il primo utilizzo, risigliare le piastrre nei loro sacchetti di alluminio e conservarle a 2-8°C con i separatori di gel posizionati. Conservare le piastrre ripartite con il lato destro rivolto verso l'alto.

8.3.2 Calibratore

I calibratori liofilizzati devono essere ricostituiti con acqua distillata pre-raffreddata a 2-8°C, utilizzando il volume indicato sulle etichette dei flaconi. Prima dell'uso, tutto il materiale nel flacone compreso quello adeso al tappo deve essere completamente sciolto per inversione. Preparare una diluizione 1:2 miscelando 100µL di calibratore con 100µL di fisiologica pre-raffreddata a 2-8°C e una diluizione 1:4 miscelando 100µL di calibratore con 300µL di fisiologica pre-raffreddata. Il calibratore e le sue diluizioni devono essere mantenute fredde per quanto possibile durante la preparazione, al fine di mantenere l'integrità dei componenti del complemento.

8.3.3 Controllo

Il siero di controllo liofilizzato deve essere ricostituito con acqua distillata pre-raffreddata a 2-8°C, utilizzando il volume indicato sull'etichetta del flacone. Dovrà essere miscelato delicatamente per inversione fino al totale scioglimento del contenuto.

8.3.4 Campioni

I campioni devono essere dispensati interi. Se tuttavia è richiesta una diluizione, utilizzare fisiologica pre-raffreddata a 2-8°C.

8.4 Dispensazione dei calibratori e dei campioni

Per ottenere risultati ottimali, si raccomanda di mantenere freddi i reagenti, i campioni, le piastrre ecc. durante l'intera procedura. L'utilizzo di un blocco freddo consentirà che i campioni siano dispensati in piastrre pre-raffreddate.

I calibratori, il controllo e i campioni devono essere agitati delicatamente prima dell'uso. Dispensare 5µL di ciascuna delle tre diluizioni del calibratore in tre pozzetti diversi. Nei pozzetti restanti dispensare 5µL dei campioni e del controllo come richiesto. Le piastrre non devono essere lasciate aperte per lunghi periodi durante la dispensazione dei calibratori/campioni, poiché ciò potrebbe far seccare troppo il gel.

8.5 Diffusione

Le presenti piastrre del complemento emolitico possono essere utilizzate per effettuare sia un dosaggio in giornata che un dosaggio over-night. Per il dosaggio in giornata, i campioni devono essere lasciati in diffusione a 2-6°C per almeno 6 ore al fine di garantire la formazione di una zona litica con un diametro sufficientemente esteso (vedi LIMITI DELLA PROCEDURA Sezione 10.2).

Per il dosaggio over-night, la diffusione potrà durare fino a 18 ore. Se la diffusione si protrae oltre le 18 ore si potrebbe verificare la formazione di anelli multipli e/o una lisi incompleta. Per entrambe le procedure la diffusione dovrebbe avvenire a 2-6°C ma per il dosaggio overnight è particolarmente importante che la temperatura si mantenga il più possibile vicino a 4°C per evitare la degradazione dei più fragili componenti del complemento. Ciò garantirà che le risultanti zone di lisi siano nette e con confini ben definiti. **Temperature d'incubazione maggiori di 6°C durante la diffusione possono impedire la lisi completa.**

8.6 Incubazione

In seguito alla fase di diffusione richiesta, le piastre devono essere incubate a 37°C per almeno 30 minuti. E' indispensabile che i gel non si seccino e per ridurre al minimo tale fenomeno, si consiglia di risigillare le piastre nei rispettivi sacchetti di alluminio.

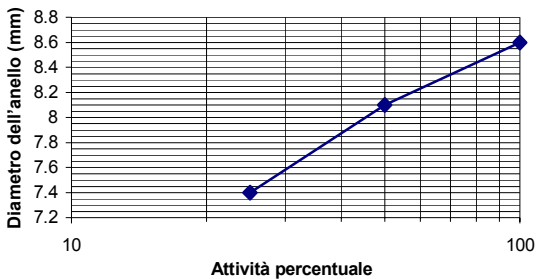
8.7 Controllo qualità

Una volta ricostituito, il siero di controllo deve essere trattato esattamente come un campione. I valori ottenuti per il controllo non possono variare più del 20% rispetto alla concentrazione indicata sull'etichetta del flacone.

9 MISURAZIONE DELL'ANELLO ED ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, devono essere misurati i diametri delle zone di lisi fino a 0,1mm, mediante una lente oculare o un lettore di piastre RID. Quando si usa la lente, occorrono un'illuminazione laterale forte e uno sfondo scuro. Utilizzando la carta semilogaritmica fornita, inserire i diametri (in mm) degli anelli formati dai tre calibratori lungo l'asse-y lineare, rispetto alla loro attività percentuale del complemento (100% per il calibratore intero, 50% e 25% per le due diluizioni) lungo l'asse-x log. Congiungere poi i tre punti come qui di seguito indicato. Da questa curva potranno essere letti i valori di attività percentuale del complemento per i campioni e per i controlli. Questi ultimi potranno essere poi convertiti in valori di unità CH100/mL.

Esempio: È stata ottenuta la seguente curva di calibrazione per una piastra in cui la diffusione è stata portata avanti per 18 ore a 2-6°C. Il valore del calibratore intero (attività 100%) era di 1171 unità CH100/mL. Un campione dispensato intero come prescritto ha dato un diametro dell'anello di 8,0mm. Sulla curva di calibrazione ciò corrisponde a un'attività del 45% e quindi un'attività del complemento di 527 unità CH100/mL (1171 x 0,45).



10 LIMITI DELLA PROCEDURA

- Gli anelli più piccoli ottenuti nel dosaggio a 6 ore produrranno un grafico più "piatto", con risultati meno accurati rispetto a quelli ottenuti con il metodo over-night.
- Per i campioni con deficit nell'attività totale del complemento oppure di un singolo componente del complemento stesso, le zone di lisi risultanti potrebbero contenere cellule non lisate o evidenziare anelli multipli. Quando si osserva una lisi parziale o una scarsa qualità dell'anello, il risultato quantitativo ottenuto può risultare non accurato. In tali casi è necessaria una ripetizione del campione. Se si ottiene nuovamente lo stesso risultato, dovranno essere effettuate ulteriori indagini sul campione al fine di verificare eventuali disfunzioni della via del complemento.
- Campioni emolizzati o provenienti da pazienti con artrite reumatoide possono anch'essi causare anelli mediocri o multipli.
- Se si utilizzano due o più piastre contemporaneamente, inserire una curva di calibrazione per ciascuna piastra.
- Riutilizzo di piastre parzialmente usate: I pozzetti non utilizzati delle piastre parzialmente usate possono essere utilizzati nuovamente per il dosaggio di altri campioni a condizione che la piastra non mostri segni di deterioramento. Una nuova curva di calibrazione è richiesta ogni volta. Le zone di lisi intorno ai pozzetti precedentemente utilizzati possono espandersi in seguito a un'ulteriore incubazione a 37°C. Ciò non deve essere considerato un deterioramento e non influirà sulla resa della piastra.
- I calibratori e i controlli possono dare anelli di qualità inferiore rispetto ai campioni freschi. Ciò non influirà sull'accuratezza del dosaggio.
- Segnalazioni problemi**

Problema	Cause possibili	Interventi consigliati
A. Nessun anello per i calibratori o il controllo	i) Calibratore/controllo omesso.	Ripetere il dosaggio.
	ii) Temperatura d'incubazione durante la diffusione >6°C.	Ripetere il dosaggio.
B. Nessun anello per il campione	i) Campione omesso.	Ripetere il dosaggio.
	ii) Temperatura d'incubazione durante la diffusione >6°C.	Ripetere il dosaggio.
	iii) Campione emolizzato durante il prelievo o la conservazione.	Verificare il prelievo e la conservazione del campione. Ripetere il dosaggio con un campione fresco.
	iv) Attività del complemento emolitico bassa per disfunzioni della via classica o cattiva conservazione e/o manipolazione del campione.	Verificare la conservazione e la manipolazione del campione. Ripetere il dosaggio se necessario.
C. Anelli non circolari	i) Dispensazione scadente dei campioni.	Ripetere il dosaggio.
	ii) Gel seccato prima dell'uso, per deterioramento durante la conservazione o per prodotto scaduto.	Ripetere il dosaggio con una nuova piastra.
	iii) Gel seccato durante la dispensazione dei campioni o durante l'incubazione.	Ripetere il dosaggio con una nuova piastra, riducendo al minimo i tempi in cui la piastra viene lasciata aperta. Incubare con il coperchio ben chiuso nel sacchetto di alluminio sigillato.
D. Zone chiare sul gel prima dell'uso	Piastra congelata, seccata, scaduta e/o contaminata.	Verificare la conservazione e ripetere il dosaggio con una nuova piastra.
E. Lisi incompleta e/o anelli multipli	i) Attività del complemento emolitico bassa per disfunzioni della via classica o carenza del fattore.	Confermare con altri dati clinici.

Problema	Cause possibili	Interventi consigliati
	ii) Campione emolizzato durante il prelievo o la conservazione.	Verificare il prelievo e la conservazione del campione. Ripetere il dosaggio con un campione fresco.
	iii) Siero di paziente con artrite reumatoide.	Verificare l'anamnesi del paziente.
	iv) Temperatura d'incubazione durante la diffusione >6°C.	Ripetere il dosaggio.
F. Gel debole, bucato	i) La piastra è stata congelata.	Ripetere il dosaggio con una piastra nuova. Controllare la conservazione.

10.8 Se si ottiene un risultato inatteso, il dosaggio deve essere ripetuto, preferibilmente con un campione fresco.

10.9 Il presente kit è da ritenersi solamente come sussidio alla diagnosi. Risultati fuori dalla norma possono suggerire determinate patologie che tuttavia devono essere confermate dai dati clinici ed altri test sierologici. I risultati ottenuti con questo dosaggio non costituiscono una prova diagnostica della presenza o meno della malattia.

10.10 FDA (USA) Avvertenze: vedere la pagina iniziale delle istruzioni per l'uso in Inglese.

Se il problema persiste, contattare il fornitore.

11 VALORI ATTESI

Sono state ottenute le seguenti attività del complemento su sieri provenienti da adulti sani (utilizzando questo kit):

	Attività mediana (unità CH100/mL)	Range 95 percentile (unità CH100/mL)
Numero di campioni (n) = 38	728	392-1019

Un calo nell'attività del complemento è associabile a varie patologie (vedi Sezione 2). I valori attesi sono influenzati da età, sesso, dieta, localizzazione geografica, gravidanza, patologie e altri fattori. Per ridurre al minimo le differenze nella raccolta/preparazione dei campioni e nella procedura stessa si raccomanda che ciascun laboratorio stabilisca i propri range di normalità. I campioni con un'attività del complemento inferiore al range 95 percentile possono avere una carenza del complemento e devono essere ulteriormente sottoposti a verifiche. Quando si osserva una lisi parziale o una scarsa qualità dell'anello, il risultato quantitativo ottenuto può risultare non accurato. In tali casi è necessaria una ripetizione del campione. Se si ottiene nuovamente lo stesso risultato, dovranno essere effettuate ulteriori indagini sul campione al fine di verificare eventuali disfunzioni della via del complemento.

12 PRESTAZIONI

12.1 Precisione

La precisione intra-saggio è stata determinata misurando tre preparazioni di siero utilizzando la procedura a 18 ore su 5 piastre CET provenienti da un lotto tipico. La precisione inter-saggio è stata determinata misurando una preparazione di siero utilizzando la procedura a 18 ore su 5 piastre CET provenienti da lotti diversi.

PRECISIONE INTRA-SAGGIO		
	Conc. media (unità CH100/mL)	CV (%)
Campione 1	1050	0
Campione 2	840	3,9
Campione 3 (Controllo)	590	10,3

PRECISIONE INTER-SAGGIO		
	Conc. media (unità CH100/mL)	CV (%)
Campione A	627	1,6

12.2 Comparazione

La specificità, sensibilità e concordanza relative sono state determinate rispetto a un metodo di riferimento distribuito in commercio, utilizzando 79 sieri clinici e 40 sieri provenienti da donatori sani adulti. I campioni venivano considerati negativi al kit Binding Site se la loro attività CH100 era al di sotto del range 95 percentile.

Dosaggio Binding Site	Dosaggio alternativo	
	+	-
	29	11
	1	78
Sensibilità relativa	96,7%	
Specificità relativa	87,6%	
Concordanza relativa	89,9%	

13 BIBLIOGRAFIA

- Janeway CA & Travers P (1994). Immunobiology: The immune system in health and disease. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Tomlinson S (1993). Complement defence mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 83-89.
- Frank MM & Fries LF (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12, 322-326.
- Poddack ER & Tschopp J (1982). Polymerisation of the ninth component of complement (C9): the formation of poly-C9 with a tubular ultrastructure resembling the membrane attack complex of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 574-578.
- Kolb WP et al. (1972). Molecular analysis of the membrane attack complex mechanisms of complement. *J. Exp. Med.* 135, 549-566.
- Muller-Eberhard HJ (1975). Complement. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 697-724
- Morgan BP & Walport MJ (1991). Complement deficiency and disease. *Immunol. Today* 12, 301-306.

14 SINTESI DELLA PROCEDURA

- Ricostituire il calibratore e il controllo con acqua distillata pre-raffreddata a 2-8°C.
- Preparare le diluizioni 1/2 e 1/4 del calibratore utilizzando fisiologica fredda.
- Lasciare evaporare la condensa dalla piastra.
- Dispensare il calibratore, le diluizioni del calibratore, il controllo ed i campioni nella piastra in volumi di 5µL.
- Rimettere il coperchio e lasciare in diffusione da 6 a 18 ore a 2-6°C.
- Incubare a 37°C per un minimo di 30 minuti.
- Misurare le zone di lisi.
- Tracciare il grafico della curva di calibrazione