

KIT BINDARID™ C1 INACTIVADOR HUMANO DETERMINACION DE ACTIVIDAD FUNCIONAL

Sólo para el diagnóstico *in vitro*

Código Producto: RC002.3

Fabricado por:
The Binding Site Group Ltd., 8 Calthorpe Road, Edgbaston, Birmingham, B15 1QT, UK.
www.bindingsite.co.uk

The Binding Site Group Limited Sucursal en España
Bruc 72 2ª planta, 08009 Barcelona, España
Teléfono 902027750
Fax: 902027752
e-mail: info@bindingsite.es

BINDARID™ es una marca registrada de The Binding Site Group Limited (Birmingham, Reino Unido) en ciertos países.



1 PROPOSITO

Este kit es para cuantificar el inactivador de actividad C1 en el plasma citratado humano.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El primer complemento del complejo C1 es una macromolécula compuesta de tres sub-componentes, C1q, C1r y C1s. Por la activación de la cascada del complemento la unión del inactivador C1 a C1r activado previene la posterior proteólisis del complemento C4 por C1.

La deficiencia del inactivador funcional C1 está asociada con edema angioneurotico hereditario. La concentración del inactivador C1 en las personas afectadas son de hasta el 20% de lo normal, pero sin actividad (ref. 1).

El método de la Inmunodifusión radial (RID) es un método para el uso en rutina en la determinación cuantitativa de diferentes antígenos solubles en fluidos biológicos. Este método está basado principalmente en los trabajos de Fahey & McKelvey (ref. 2) y de Mancini et al. (refs 3 & 4).

3 PRINCIPIO

El método comprende la comparación de la precipitación de C1r realizada por Inmunodifusión radial sobre muestras de plasma nativos y estas mismas muestras tratadas añadiendo IgG agregado por calor. Esto provoca la activación de la cascada del complemento y con ello a la fijación del inactivador C1 al C1r activado.

Las muestras se aplican a placas RID permitiendo una difusión radial de un pocillo cilíndrico por medio de gel de agarosa conteniendo un anticuerpo monoespecífico a C1r humano. Bajo unas condiciones adecuadas se formarán complejos anticuerpo-antígeno formando un aro de precipitación. Cuando se forma un complejo C1r, el inactivador C1 encubre muchos lugares de la molécula C1r, llevando a un deterioro de la calidad del aro.

Las muestras que contienen el inactivador funcionalmente inactivo C1 no muestran esta pérdida de calidad de aro.

4 REACTIVOS

1. Placas RID (envasados en sobres herméticos): Estas contienen anticuerpos policlonales monoespecíficos de oveja contra C1r humano en gel de agarosa. Pueden realizarse hasta siete (7) muestras en una pasada incluyendo controles normal y anormal. Conservantes: azida sódica 0,099%, ácido E-amino-n-caproico (EACA) 0,1%, benzamidina 0,01%.
2. Control(es) normal(es). Liofilizado. Conservantes: azida sódica 0,099%, ácido E-amino-n-caproico (EACA) 0,1%, benzamidina 0,01%.
3. Control(es) anormal(es). Liofilizado. Conservantes: azida sódica 0,099%, ácido E-amino-n-caproico (EACA) 0,1%, benzamidina 0,01%.
4. IgG agregado por calor. Liofilizado. Conservante: azida sódica 0,099%.

5 ADVERTENCIAS

El plasma humano suministrado en el kit han sido sometidos a screening para donantes, resultando negativos a la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B y a la presencia de los anticuerpos de la ante los virus HIV1, HIV2 y HCV. Las técnicas usadas están aprobadas por la FDA (USA) o para el diagnóstico *in vitro* por la UE (Directiva 98/79/EC, Anexo II). Sin embargo los sobredichos ensayos no garantizan la ausencia de agentes infecciosos. 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 solo personal adecuadamente instruido deberá efectuar el test.

AVISO: Los componentes del kit contienen azida sódica y debe ser manipulado con precaución; use guantes y vestuario protector adecuado en todo momento al manipular este producto. No trague ni permita el contacto con la piel o las mucosas (especialmente si hay heridas). En caso de contacto, lave con abundante agua y consulte a un médico. Con el plomo y el cobre pueden formarse azidas metálicas explosivas. Cuando se elimine el reactivo, lave con mucha agua los recipientes para evitar la acumulación de azida.

El presente producto debe ser utilizado por personal especializado. Se recomienda observar estrictamente el procedimiento indicado. No se garantizan resultados válidos obtenidos utilizando parámetros diferentes que los indicados.

Los reactivos de diferentes lotes **NO** son intercambiables. En caso de realizar un número elevado de tests, averigüe 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 2-8°C. ¡NO CONGELAR! Las placas RID deben guardarse entre 2-8°C. ¡A mayor temperatura se deterioran! Una congelación destruirá el gel, por lo que deberán estar alejados de los elementos congeladores del frigorífico. Asimismo deberán evitarse temperaturas elevadas, dado que el gel perdería humedad, afectando a su función. 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.

Los controles e IgG agregado por calor sin estrenar deben guardarse entre 2-8°C. Una vez abiertos son estables durante una semana a una temperatura entre 2-8°C. Para un almacenamiento más largo, deberán ser alícuotados y congelados (-20°C o más bajo). Todos los demás reactivos deben almacenarse entre 2-8°C.

7 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para este test utilizar muestras de plasma citratado recientes o congeladas (-20°C). No deben emplearse plasma 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 separar rápidamente el suero del coágulo con el fin de evitar hemólisis. Las muestras pueden almacenarse entre 2-8°C hasta 48 horas antes del análisis. Para una conservación más prolongada se recomienda alícuotar y congelar a -20°C las muestras. Evitar repetidas congelaciones y descongelaciones.

8 METODOLOGÍA

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

8.1 Contenido del kit

1. 3 x *Human C1 Inactivator F.A.* (placas de inmunodifusión radial embolsadas en aluminio)
2. 8 x *Gel Dividers* (Divisores de gel)
3. 2 x *Human C1 Inactivator F.A. Normal Control* (Control normal, liofilizado)
4. 2 x *Human C1 Inactivator F.A. Abnormal Control* (Control anormal, liofilizado)
5. 4 x *Heat Aggregated Gamma Globulin* (IgG agregado por calor, liofilizado)
6. 1 x folleto de instrucciones

8.2 Materiales necesarios pero no suministrados

1. Equipamiento para la colección y preparación de las muestras, p.ej. tubos de muestras, centrífuga, etc.
2. Pipetas para una adecuada dilución de las muestras y controles.
3. Micropipetas para la aplicación de las muestras. Estas deberán dispensar 10µL exactos. Recomendamos las Binding Site Micropipettes (Artículo AD041) o jeringuillas 'Hamilton'.
4. Lupa de joyero (Artículo AD040) para un aumento y medición exacta del diámetro del aro precipitado, hasta 0,1mm.
5. Agua destilada para la reconstitución de los componentes liofilizados.
6. Suero fisiológico (0,9%/0,15M) para la dilución de muestras y controles.
7. Incubador de 37°C.

8.3 Preparación de los reactivos

8.3.1 Placa(s) 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 solo se vaya a emplear una parte de los 14 pocillos o para la medición de muestras con sospecha de una elevada concentración de antígeno. En estas muestras se puede llegar a una amplia difusión del antígeno, por lo que en zonas apartadas de la placa se reduce la concentración de anticuerpos. Tras el uso parcial, las placas deberán guardarse en su sobre hermético bien cerrado entre 2-8°C con los separadores puestos. Guardar las placas divididas boca arriba y utilizar dentro de las siguientes 4 semanas.

8.3.2 IgG agregado por calor (HAG)

El HAG debe ser reconstituido con el volumen de agua destilada indicada en la etiqueta del vial.

8.3.3 Muestras

Se deben coger dos (2) alícuotas por cada muestra. La primera se debe mezclar con suero fisiológico en una relación de 3 partes de muestra con 1 parte de suero (p.ej. 150µL de muestra con 50µL de suero). La segunda alícuota se debe mezclar con HAG en una relación de 3 partes de muestra y 1 parte de HAG (p.ej. 150µL de muestra con 50µL HAG).

Antes de aplicar en la placa(s) RID incubar a 37°C durante 60 minutos.

8.3.4 Controles

Ambos controles, normal y anormal, se deben reconstituir con el volumen de agua destilada indicada en la etiqueta de los viales correspondientes. Una vez completamente disueltos deben ser tratados de la misma forma que las muestras (ver sección 8.3.3).

8.4 Aplicación de calibradores y muestras

Antes de usar, agitar con cuidado los controles y muestras. Aplicar 10µL de la mezcla control normal/suero salino en un pocillo y en otro la mezcla control normal/HAG. Aplicar en el tercer pocillo 10µL de la mezcla control anormal/suero salino y al cuarto pocillo la mezcla control anormal/HAG. En los restantes pocillos aplicar las mezclas muestra/suero salino y muestra/HAG.

8.5 Incubación

Tras la aplicación de las muestras se debe cerrar la tapa e incubar plana con la tapa hacia arriba a temperatura ambiente (20-24°C). ¡Bajo ninguna circunstancia se puede secar el gel durante la incubación! Por ello se deben incubar las placas dentro de los sobres herméticos bien cerrados o bien dentro de una cámara húmeda (caja de plástico con tapa con toallitas húmedas). La incubación mínima es de 96 horas. La temperatura influye en el diámetro del aro final, por lo que debe evitarse temperaturas extremas.

8.6 Control de calidad

El control debe ser manipulado exactamente igual que las muestras. El control normal con HAG debe mostrar un deterioro de calidad de aro considerable comparando con el aro dado de la mezcla de control normal con salino.

Por el contrario, no debe haber diferencia alguna en la calidad del aro entre las alícuotas del control anormal.

9 MEDICIÓN E INTERPRETACIÓN

9.1 Medición del aro

Tras el tiempo de difusión necesario, se deben medir los diámetros a simple vista o con una lupa de joyero. **Es importante utilizar una luz brillante de costado y un fondo oscuro.** Notar cualquier diferencia en la intensidad del aro entre muestras y controles. Ver el siguiente ejemplo de interpretación:

9.2 Interpretación

El siguiente diagrama es una guía para la interpretación de la intensidad de precipitación de los aros para muestras "normal" y Inactivador C1 funcionalmente inactivo.

Plasma normal		Plasma Inactivador C1 (funcionalmente inactivo)	
3+1 Suero salino	3+1 HAG	3+1 Suero salino	3+1 HAG



Aro débil



Muy débil/ No visible



Aros visibles

10 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

10.1 RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Causa(s) posible(s)	Sugerencia(s)
A. No hay aro en:		
1. Control(es)	Omisión del control.	Repetir prueba.
2. Muestra	Omisión de la muestra.	Repetir prueba.
3. Control(es) y muestras	Deterioro placa.	a) Deterioro durante almacenamiento. Repetir prueba utilizando una placa nueva. b) Producto caducado. Repetir prueba utilizando placa/kit nuevos.
B. Aros no circulares		
	i) Aplicación de la muestra deficiente.	Repetir prueba.
	ii) Gel se ha secado antes del uso.	a) Deterioro durante almacenamiento. Repetir prueba utilizando una placa nueva. b) Producto caducado. Repetir prueba utilizando placa/kit nuevos.
	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.
	iv) Reducción de anticuerpos locales debido a una concentración de antígeno demasiado alta.	Diluir muestras y repetir prueba.
C. Gel turbio		
	i) La placa ha sido congelada.	Repetir prueba utilizando placas nuevas. Comprobar almacenamiento.
	ii) Gel se ha secado antes del uso.	Ver B (ii).
	iii) Gel se ha secado durante la aplicación de la muestra o durante la incubación.	Ver B (iii).
D. Gel quebradizo, no nivelado		
	Gel se ha secado antes del uso.	Repetir prueba con placa nueva. Verificar almacenamiento.
E. Aros dobles / múltiples		
	Precipitación no específica cerca del pocillo (motivo: PEG en el gel).	Leer aro exterior.

10.2 El diagnóstico y tratamiento no debe basarse solo en el Activador C1 de actividad funcional. Se deben tener en cuenta el historial así como otras pruebas clínicas.

10.3 En caso de obtener unos resultados no esperados, se deberá repetir la prueba con una muestra reciente.

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

11 BIBLIOGRAFÍA

- Zicarri R J Cooper N R (1978). Modulation of the Antigenicity of C1r and C1s by C1 Inactivator. *J. Immunol.*, **121**, 2148-2152.
- Fahey, J L & McKelvey, E M (1965). Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.*, **94**, 84-90.
- Mancini, G, Vaerman, J P *et al* (1964). Protides of the biological fluids (XI Colloquium). Peters H. (ed), Publ. Elsevier Publishing Co., Amsterdam p370.
- Mancini, G, Carbonar, A O *et al* (1965). Immunodiffusion. *Immunochem*, **2**, 235-254.

12 RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

- Tomar dos alícuotas de cada muestra o control.
- Tratar una alícuota de cada con IgG agregada por calor, mezclando 150µL de muestra con 50µL de IgG agregada por calor.
- Tratar la segunda alícuota de cada con solución salina fisiológica, mezclando 150µL de muestra con 50µL de solución salina fisiológica.
- Incubar muestras y controles a 37°C por 1 hora.
- Dejar que se evapore la condensación de la(s) placa(s) RID.
- Aplicar las muestras y controles a la(s) placa(s) de RID en volúmenes de 10µL.
- Tapar e incubar a temperatura ambiente (aproximadamente 20-24°C) durante 96 horas.
- Comparar las intensidades de los anillos de las mismas muestras y controles entre las alícuotas tratadas de diferente forma.