

CONTENTS

- 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
- 15 RID Reference Table

Deutsch

Français

Español

HUMAN C1 INACTIVATOR BINDARID™ RADIAL IMMUNODIFFUSION KIT

For *in vitro* diagnostic use only

Product Code: RN019.3

BINDARID™ is a trademark of The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK

Product manufactured by:

The Binding Site Group Ltd, PO Box 11712, Birmingham, B14 4ZB UK
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 Code: 1026

Test System ID Code: 61080

Complexity Cat: High



1 INTENDED USE

This kit is intended for measuring human C1 Inactivator (C1 esterase inhibitor) in serum as an aid in the diagnosis and treatment of angioedema.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

C1 inactivator is a member of the serpin family of serine protease inhibitors. It acts as an inhibitor of the classical complement pathway, covalently binding to activated C1r and C1s, releasing the C1r: C1s: C1 inactivator complex into solution, thereby reducing C4 and C2 cleavage. C1 inactivator also regulates a number of proteins of the coagulation and fibrinolytic pathways.

C1 inactivator deficiency is the commonest of the inherited complement component deficiencies. It is the cause of hereditary angioedema (increases blood vessel permeability resulting in swelling of the tissues). Two types exist: type I in which reduced serum levels of functionally active C1 inactivator occur, and type II, in which normal or even elevated levels of functionally inactive C1 inactivator are present. Acquired C1 inactivator deficiency is rare, all reported cases having been secondary to lymphomas or myelomas, (refs. 1-3).

Radial immunodiffusion (RID) is a technique that is routinely used for measuring the concentration of various soluble antigens in biological fluids. It is principally derived from the work of Fahey & McKelvey (ref. 4) and Mancini *et al* (refs. 5 & 6).

3 PRINCIPLE

The method involves antigen diffusing radially from a cylindrical well through an agarose gel containing an appropriate mono-specific antibody. Antigen-antibody complexes are formed which, under the right condition, will form a precipitin ring. The ring size will increase until equilibrium is reached between the formation and breakdown of these complexes, this point being termed 'completion'. At this stage, a linear relationship exists between the square of the ring diameter and the antigen concentration. By measuring the ring diameters produced by a number of samples of known concentration, a calibration curve may be constructed. The concentration of the antigen in an unknown sample may then be determined by measuring the ring diameter produced by that sample and reading off the calibration curve.

There are three different procedures that may be used with this kit (see Section 8.4). Procedures ONE and TWO require that rings are measured at completion. A linear calibration curve is constructed for Procedure TWO, whereas for Procedure ONE a reference table (based upon the ideal linear calibration curve) is provided, which converts ring diameters directly to protein concentrations. Using Procedure THREE, ring diameters are measured before completion; the calibration curve produced will be non-linear.

4 REAGENTS

- 4.1 RID plates. (supplied in foil pouches). These contain monospecific antibody to C1 inactivator in agarose gel. Up to fourteen samples can be run per plate (including calibrators). Preservatives: 0.099% sodium azide, 0.1% E-amino-n-caproic acid (EACA), 0.01% benzamidine.
- 4.2 Calibrators. These are supplied in stabilised liquid form as a set of three containing high, medium and low concentrations of C1 inactivator. The concentrations of C1 inactivator given on the vial labels have been obtained by comparison with a commercially available standard; however in the absence of international agreement the accuracy of the available standard cannot be guaranteed. Preservatives: 0.099% sodium azide, 0.1% EACA, 0.01% benzamidine.
- 4.3 7% Bovine Serum Albumin (BSA) solution. This is supplied in stabilised liquid form and is included for use as a diluent. Preservatives: 0.099% sodium azide, 0.1% EACA, 0.01% benzamidine.
- 4.4 Control Serum. This is supplied in stabilised liquid form. The expected C1 inactivator concentration is marked on the bottle label. Preservatives: 0.099% sodium azide, 0.1% EACA, 0.01% benzamidine.

5 CAUTION

All donors of human serum supplied in this kit have been serum tested and found negative for Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to human immunodeficiency (HIV1 and HIV2) and Hepatitis C Virus. 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, calibrators, controls and BSA contain 0.099% sodium azide as a preservative. Handle with caution - do not ingest or allow contact with skin and 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 large volumes 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 expiry dates of individual components are given on the component labels. RID plates should be stored at 2-8°C and are damaged by temperature extremes. Freezing will destroy the gel, therefore RID plates should be kept away from cooling elements in refrigerators. High temperatures should also be avoided as this will result in moisture loss from the gel, affecting performance. 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.

Unopened calibrators and controls should be stored at 2-8°C. Once opened they are stable for at least one week at 2-8°C, but for longer storage they should be aliquoted and frozen. All other reagents should be stored at 2-8°C.

7 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use fresh or deep frozen (-20°C or below) serum samples. Microbially contaminated, haemolysed and very lipaemic serum and samples containing particulate matter should not be used. Blood samples should be collected by venepuncture, allowed to clot naturally and the serum separated as soon as possible to prevent haemolysis. The serum may be stored at 2-8°C for up to 48 hours prior to assay, or for prolonged storage, aliquoted and kept at -20°C or below. Repeated freezing and thawing should be avoided.

The BSA included in the kit should be used as diluent when required, as this will maintain the viscosity of the material. Results can therefore be accurately compared with the calibrator which has a similar viscosity to normal serum.

8 METHODOLOGY

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

8.1 Materials provided

- 8.1.1 3 x Human C1 Inactivator NL Bindarid (radial immunodiffusion plates in foil pouches)
- 8.1.2 8 x Gel dividers
- 8.1.3 3 x Human C1 Inactivator NL Calibrator (liquid calibrators)
- 8.1.4 1 x 5mL 7% BSA
- 8.1.5 1 x Human C1 Inactivator NL Control Serum (liquid control serum)
- 8.1.6 1 x instruction leaflet, including RID reference table

8.2 Materials required but not provided

- 8.2.1 Equipment for collection and preparation of test samples, eg sample tubes, centrifuge etc.
- 8.2.2 Pipettes for accurate dilution of samples, when required.
- 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 Jeweller's Eyepiece (Code AD040) or digital RID plate reader (AD400) for magnifying and accurately measuring the precipitin ring diameters to 0.1mm.
- 8.2.5 Graph paper

8.3 Reagent preparation

8.3.1 RID plate(s)

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 sectioning blades provided prior to use. 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 only part of the plate is to be used initially or when measuring suspected high concentration samples which could (by diffusing over a wide area) result in antibody depletion occurring elsewhere on the plate. 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 and use within four weeks.

8.3.2 Calibrators:

The calibrators are prediluted and should be mixed gently before use. They should be applied to the plates neat. The medium and low calibrators should only be used when a calibration curve is required, as for Procedures TWO and THREE.

8.3.3 Control:

The liquid control serum should be applied to the plates undiluted mixing gently immediately before use.

8.3.4 Samples:

Samples should not normally require dilution. If samples containing high C1 inactivator concentrations are to be measured, dilution will be necessary. In such cases it is

suggested that to obtain adequate accuracy a minimum volume of 20µL of test sample is mixed with the appropriate volume of BSA. For samples having C1 inactivator concentrations below the detection limits of the plates, one of the following is recommended:

- i) Concentrate the sample
- ii) Make a double fill of the well (see Section 8.5)

8.4 Procedures

8.4.1 Procedure ONE: RID reference table

This method does not require the construction of a calibration curve – sample concentrations corresponding to each ring diameter are read directly off the RID Reference Table. Rings must be allowed to develop to completion which will require a minimum diffusion time of 72 hours. The high calibrator should be run on each plate used to ensure all are performing correctly.

8.4.2 Procedure TWO: Calibration curve at completion

In this method, all three calibrators are used to produce a linear calibration curve. Rings must be allowed to develop to completion which will require a minimum diffusion time of 72 hours. To conserve wells, one calibration curve can be used for several plates of the same batch used concurrently. In such cases, the high calibrator should be run on each plate used to ensure all are performing correctly.

8.4.3 Procedure THREE: Calibration curve prior to completion

In this method, all three calibrators are used to produce a calibration curve which is non-linear, as the rings are measured before completion. The minimum recommended diffusion time is 18 hours. It is advisable that a separate calibration curve is constructed for each plate used.

8.5 Application of calibrators and samples

The calibrators, control and test samples should be gently mixed immediately before use. Fill the required number of wells with 5µL of the high calibrator using a micropipette. If Procedure TWO or THREE is being followed fill the required number of wells with the medium and low calibrators as well. The remaining wells should then be filled with 5µL of appropriately diluted test samples and controls. Plates should not be left open for long periods during calibrator/test sample application, as this will cause excessive drying of the gel.

Note: For those samples suspected of containing low concentrations of C1 inactivator, a 'double fill' of the well may be made. The well is initially filled with 5µL of the sample and this is allowed to completely diffuse into the gel, which can take up to 30 minutes. The lid should be kept in place during this period. The second fill (again using 5µL) may then be made, and the plate incubated as normal. Results obtained must be corrected for the double sample volume and will be less accurate than those obtained by the normal 'single fill' procedure.

8.6 Incubation

After sample application, the lid is tightly closed and the plate stored flat at room temperature (approximately 20-24°C). It is essential that the gel is not allowed to dry out during incubation. To minimise evaporation, it is suggested that plates should either be resealed in their foil pouches or stored in a moist box (a sealed plastic box containing damp tissue paper) during incubation. The minimum incubation time for Procedure THREE is 18 hours and for complete diffusion (Procedures ONE and TWO) is 72 hours. Final ring diameters may be affected by temperature; the expected ring size for the high calibrator is 9mm (±0.3mm) when incubated at 20-24°C. Extremes of temperature should be avoided.

8.7 Quality control

The control should be treated exactly like a test sample. Values obtained for the control should be within ±10% of the concentration stated on the vial label.

9 RING MEASUREMENT AND RESULT PROCESSING

After the required diffusion time, ring diameters should be measured to the nearest 0.1mm, using a jeweller's eyepiece or a RID plate reader. When reading with an eyepiece, use bright side lighting and a dark background. If difficulties are experienced, view the plate macroscopically and mark the edges of the rings on the back of the plate using a needle. The distance between these marks may then be more easily measured.

Note: For Procedures ONE and TWO ring diameters must have developed to completion. If there is any doubt, rings should be remeasured after a further 24 hours to ensure there has been no increase in their diameters. The high calibrator should give a ring diameter of 9.0mm ± 0.3mm at completion. If the ring diameter is outside this range, see TROUBLE SHOOTING (Section 10.3).

Procedure ONE

The concentration of C1 inactivator in each test sample can be read directly from the RID Reference Table, **providing it has been applied neat as recommended.**

Concentrations obtained for samples giving ring diameters greater than the high calibrator should be regarded as approximate, due to the possibility of incomplete diffusion. Such samples may also cause local antibody depletion thereby affecting adjacent ring sizes; they should preferably be diluted appropriately and retested. Samples giving ring diameters below the lower limit on the RID Reference Table should be retested in a more concentrated form (see Section 8.3.4). Any change from the recommended sample dilution (i.e. neat) must be taken into account when calculating the results.

Example:

Test Sample	Dilution	Ring Diameter (mm)	Table Value (mg/L)	Original Sample Conc. (mg/L)
C1 inactivator Serum A	Neat	6.4	196	196
C1 inactivator Serum B	Neat	>11	>703	>703
C1 inactivator Serum B (Repeat)	1/2	8.6	406	812*

* Calculated as follows: Table value x Recommended Diln./Actual Diln., i.e. 406mg/L x 1/(1/2).

Procedure TWO

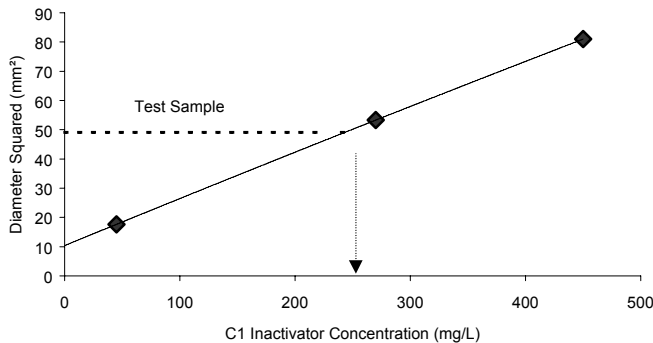
Plot the square of the diameters of the precipitin rings formed by three calibrators versus their C1 inactivator concentrations (given on the calibrator vial label). C1 inactivator concentrations should be along the horizontal (x) axis, ring diameters squared along the vertical (y) axis. A line of best fit is drawn through the three points; the y-intercept should be in range 10-12mm². The C1 inactivator concentration is determined from the calibration curve; remember to adjust the sample concentration obtained by any dilution factor used.

Sample calculation:

C1 inactivator calibrators gave the following ring diameters on a C1 inactivator test plate at completion:

Calibrator	Concn. (mg/L)	Diameter (D) of ring (mm)	D squared (mm ²)
High	450	9.0	81.0
Medium	270	7.3	53.3
Low	45	4.1	16.8

A calibration curve was plotted using these results:



An unknown sample, applied neat as recommended, gave a 7.0mm diameter ring on this plate. From the above curve, this corresponds to a C1 Inactivator concentration of 240mg/L. Therefore, the C1 inactivator concentration in the undiluted sample = 240mg/L.

Procedure THREE

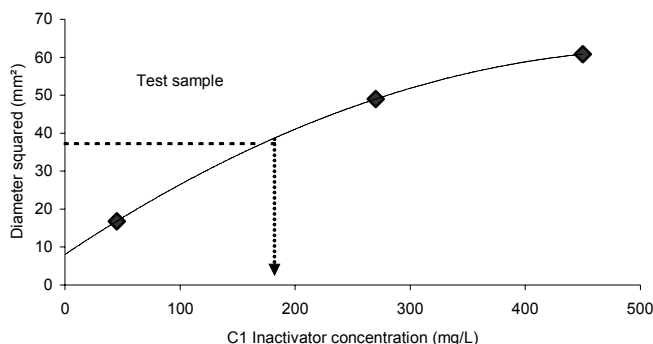
Plot the calibration curve as for Procedure TWO. The graph will not be a straight line but a curve, the gradient of which decreases with increasing protein concentration. The y-intercept should be as indicated for Procedure TWO. Test sample protein concentrations are read off the calibration curve; remember to adjust the sample concentration obtained by any dilution factor used.

Sample Calculation:

C1 inactivator calibrators gave the following ring diameters on a C1 inactivator plate after 18 hours:

Calibrator	Concn. (mg/L)	Diameter (D) of ring (mm)	D squared (mm ²)
High	450	7.8	60.8
Medium	270	7.0	49.0
Low	45	4.1	16.8

A calibration curve was plotted using these results:



An unknown sample, applied neat as recommended, gave a 6.1mm ring on this plate. From the above curve, this corresponds to a C1 Inactivator concentration of 180mg/L. Therefore the C1 Inactivator concentration in the undiluted sample = 180mg/L.

10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

10.1 For Procedure ONE, results generated from ring diameters greater than the high calibrator ring diameter (i.e. 9mm) should be regarded as approximate (see Section 9). For Procedure TWO and THREE, accurate results are limited to the calibration curve between the high and low calibrator values – extrapolation beyond these points is not valid. Samples giving results outside these ranges must be diluted or concentrated as appropriate and retested (see Section 8.3.4).

10.2 **FDA (USA) information – see front page**

10.3 **TROUBLE SHOOTING**

Problem	Possible causes(s)	Suggested action(s)
A. No ring for:		
1. Calibrator(s)	Calibrator omitted.	Repeat assay.
2. Test sample	i) Sample omitted.	Repeat assay.
	ii) Concentration too high/low.	Dilute/concentrate and reassay.
3. Calibrator(s) and test samples	Plate deterioration.	a) Storage damage. Repeat assay using new plate. b) Product expired. Repeat assay using new plate/kit.
	B. Oversize rings for:	
1. High calibrator (more than 9.3mm)	i) Inaccurate ring measurement.	Remeasure using eyepiece or RID plate reader
	ii) Incorrect volume applied.	Check 5µL volume applied.
	iii) Inaccurate volume applied.	a) Micropipette malfunction – check operation and repeat assay. b) Poor technique – repeat assay.
	iv) Partial evaporation of reconstituted calibrator on storage.	Repeat assay using new calibrator/kit.
	v) Plate deterioration.	a) Storage damage. Repeat assay using new plate. b) Product expired. Repeat assay using new kit.
	vi) Local antibody depletion due to adjacent high concentration test samples.	Dilute the sample(s) responsible and repeat assay using new plate.
	vii) Incubation temperature too high (see Section 8.6).	Repeat assay, incubating at 20-24°C.
2. Test samples (above acceptable range – see Section 10.1)	i) Concentration too high.	Dilute and reassay.
	ii) Incorrect volumes applied.	Check 5µL volume applied.
C. Undersized rings for:		
1. High calibrator (less than 8.7mm)	i) Inaccurate ring measurement.	As for B1 above
	ii) Incorrect volume applied.	
	iii) Inaccurate volume applied.	
	iv) Calibrator deterioration.	a) Storage damage. Repeat assay using new calibrator. b) Product expired.
	v) Incubation temperature too low (see Section 8.6).	Repeat assay, incubating at 20-24°C.
2. Test samples (below acceptable range – see Section 10.1)	i) Concentration too low.	See section 8.3.4 and repeat assay.
	ii) Incorrect volume applied.	Check 5µL volume applied.
D. Double/Multiple rings		
	i) Non-specific precipitation close to well (due to PEG in gel).	Read outer ring.
	ii) Poor sample application.	Repeat assay.
	iii) Calibrator deterioration.	a) Storage damage. Repeat assay using new calibrator. b) Product expired. Repeat assay using new kit.
	iv) Sample deterioration.	Reassay using fresh sample.
E. Non-circular rings		
	i) Poor sample application.	Repeat assay.
	ii) Gel dried out before use.	a) Storage damage. Repeat assay using new plate. b) Product expired. Repeat assay using new plate/kit.

Problem	Possible cause(s)	Suggested action(s)
	iii) Gel dried out during sample application or incubation.	Repeat assay minimising the time the plate is left open. Incubate with lid on tight in a moist box or sealed foil pouch.
	iv) Local antibody depletion (due to high concentration samples on the plate).	Dilute samples and repeat assay.
F. Cloudy gel	i) Plate has been frozen.	Repeat assay using new plates. Review storage
	ii) Gel dried out before use.	As for E(ii) above.
	iii) Gel dried out during sample application or incubation.	As for E(iii) above.
G. Weak, pitted gel	Plate has been frozen.	Repeat using new plate. Review storage.
H. Poor calibration curve:		
1. Curve non-linear (Procedure TWO)	i) Incomplete diffusion.	Incubate for further 24 hours and remeasure the rings.
	ii) Calibrator rings under/oversize.	As for B1 or C1 above. (Similar explanations apply to the medium and low calibrators).
	iii) Calibration curve constructed incorrectly.	Check calibration curve construction.
2. y-intercept out-of-range (Section 9)	i) Calibrator rings under/oversize.	As for B1 or C1 above. (Similar explanations apply to the medium and low calibrators).
	ii) Calibration curve constructed incorrectly.	Check calibration curve construction.

10.4 Diagnosis cannot be made and treatment must not be initiated on the basis of C1 inactivator measurements alone. Clinical history and other laboratory findings must be taken into account.

10.5 If an unexpected result is obtained, the assay should be repeated, preferably with a fresh sample.

If a problem cannot be resolved, please refer to supplier.

11 EXPECTED RESULTS

The following results were obtained using this kit:

	Mean (mg/L)	SD (n-1)	Median (mg/L)	95 Percentile range (mg/L)	No. of samples
C1 Inactivator	266	38	261	195-345	86

This data provided has been generated from limited numbers of normal British blood donors and is intended for guidance purposes only. Reduced serum levels of C1 inactivator are associated with hereditary angioedema (type 1), often falling to less than 30% of normal. It is strongly recommended that each user should generate his/her own C1 inactivator concentration ranges for appropriate clinical conditions.

12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

12.1 Precision

The precision (repeatability) of this kit is expressed as the mean and the percentage coefficient of variation (CV) which had been determined using human serum preparation containing high, medium and low concentrations of C1 inactivator. All analyses were performed in our laboratory. Each value was calculated from 10 measurements (duplicate determinations on five separate plates from a typical batch) unless otherwise stated. For Procedures ONE and TWO, rings were measured after 72 hours. For Procedure THREE, rings were read after 18 hours.

Sample Pool	Procedure ONE		Procedure TWO		Procedure THREE	
	Mean conc. (mg/L)	CV	Mean conc. (mg/L)	CV	Mean conc. (mg/L)	CV
High	387	2.0%	411	2.2%	402	2.6%
Medium	231	2.6%	244	3.5%	250	3.1%
Low	82	6.1%	80	6.8%	91	5.8%

12.2 Within plate and inter-batch variation

The within plate variation is expressed as the mean \pm standard deviation of determinations of CV made using 3 plates from separate batches. Six measurements of a single preparation were made per plate.

The interbatch variation is expressed as the CV of mean diameter values obtained from recent batches of plates. The mean diameter for each batch was calculated using the ring diameter at completion obtained using a preparation applied to three plates from each batch (six ring measurements per plates).

C1 inactivator	Within-plate variation		Interbatch variation	
	Mean CV% \pm SD		CV %	
	0.92 \pm 0.09 (N=3)		0.82 (N=3)	

13 BIBLIOGRAPHY

- Protein Reference Unit Handbook of Clinical Immuno Chemistry (1990) Ed. A Milford Ward, Publ. PRU Publications, Sheffield, 161-162.
- Sjoholm, AG. (1990). Inherited complement deficiency states: implications for immunity and immunological disease. *APMIS* **98**, 861-874.
- Cooper, NR (1985). The Classical complement pathway; Activation and regulations of the first complement component. *Adv, immunol.* **37**, 151-216.
- Fahey, JL & McKelvey, EM (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), Amsterdam, Elsevier Publishing Co., P370.
- Mancini, G, Carbonara, A O et al (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem*, **2**, 235-254.

14 SUMMARY OF PROCEDURE

- Select Procedure ONE, TWO or THREE. Procedure THREE must be used if results are required quickly.
- Prepare sample dilutions; this is only required for samples with known high C1 inactivator concentrations.
- Allow condensation to evaporate from RID plate(s).
- Apply calibrator(s), control and samples to RID plate(s) in 5 μ L volumes.
- Replace lid and incubate at room temperature (approximately 20-24°C) for fixed time period (minimum 18 hours) (Procedure THREE) or until rings are complete (minimum 72 hours) (Procedure ONE and TWO).
- Measure the ring diameters.
- Read results off RID Reference Table (Procedure ONE) or plot calibration curve and read off results (Procedures TWO and THREE).

RID reference table for human C1 inactivator
Concentration in mg/L

Diameter of ring (mm)	Conc.
4.0	38.0
4.1	43.2
4.2	48.4
4.3	53.8
4.4	59.3
4.5	65.0
4.6	70.7
4.7	76.6
4.8	82.6
4.9	88.8
5.0	95.0
5.1	102
5.2	108
5.3	115
5.4	121
5.5	128
5.6	135
5.7	142
5.8	149
5.9	157
6.0	164
6.1	173
6.2	181
6.3	189
6.4	196
6.5	205
6.6	213
6.7	221
6.8	230
6.9	238
7.0	247
7.1	256
7.2	265
7.3	274
7.4	284
7.5	294
7.6	303
7.7	313
7.8	322
7.9	332
8.0	342
8.1	352
8.2	363
8.3	373
8.4	383
8.5	395
8.6	406
8.7	417
8.8	428
8.9	439
9.0	450
9.1	461
9.2	473
9.3	484
9.4	496
9.5	508
9.6	521
9.7	533
9.8	545
9.9	558
10.0	570
10.1	583
10.2	596
10.3	609
10.4	623
10.5	636
10.6	649
10.7	662
10.8	676
10.9	690
11.0	703

Note: The above values assume that test samples are applied undiluted in 5 μ L volumes. The high calibrator should give a ring diameter of 9.0 \pm 0.3mm at completion when incubated at 20-24°C.

1	Verwendungszweck
2	Einleitung
3	Testprinzip
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	Bibliographie
14	Kurzanleitung
15	RID-Referenztafel

C1-INKTIVATOR (HUMAN) BINDARID™ KIT FÜR DIE RADIALE IMMUNDIFFUSION

Nur zur *in vitro* Diagnostik

Bestell - Nr.: RN019.3

BINDARID™ ist ein Warenzeichen von The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK

In England hergestellt von:
The Binding Site Group Ltd., 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.
Telefonnummer: +49 (0) 6202 92 62 0
Fax: +49 (0) 6202 92 62 222
e-mail: office@bindingsite.de



1 VERWENDUNGSZWECK

Zur quantitativen Bestimmung von humanem C1-Inaktivator (C1 Esterase Inhibitor) im Serum zur Unterstützung der Diagnose und Behandlung von Angiodemie.

2 EINFÜHRUNG

Der C1-Inaktivator gehört zur Serinprotease-Inhibitor-Familie der Serpine. Seine Funktion ist die Inhibition des klassischen Wegs der Komplementkaskade. Er bindet kovalent an die aktivierten Komponenten C1r und C1s und setzt einen C1r: C1s: C1-Inaktivator-Komplex frei, so dass die C4- und C2-Spaltung vermindert wird. Der C1-Inaktivator reguliert darüberhinaus einige Proteine des Gerinnungsprozesses und der Fibrinolyse.

Die C1-Inaktivator-Defizienz ist die häufigste der Komplement-Defekte. Sie ist die Ursache von erblicher Angiodemie (erhöhte Permeabilität der Blutgefäße und in Folge ein Anschwellen des Gewebes). Man unterscheidet zwei Typen: bei Typ I ist der Serumgehalt an funktionell aktivem C1-Inaktivator herabgesetzt, bei Typ II findet man einen normalen oder sogar erhöhten Serumspiegel an funktionell inaktivem C1-Inaktivator. Erworbene C1-Inaktivator-Defizienzen sind sehr selten, alle bisher bekannten Fälle traten in Folge von Lymphomen oder Myelomen auf (Ref. 1-3).

Die Methode der Radialen Immundiffusion (RID) basiert prinzipiell auf den Arbeiten von Fahey & McKelvey (Ref. 4) und Mancini *et al* (Ref. 5, 6) und ist für die routinemäßige, quantitative Bestimmung von löslichen Antigenen (Proteine) aus Körperflüssigkeiten geeignet.

3 PRINZIP

Lösliche Proteine werden in kreisförmige Vertiefungen eines Agarosegels aufgetragen. Das Antigen diffundiert dann radial in das Gel, in dem der korrespondierende, monospezifische Antikörper gleichmäßig verteilt ist. Es werden Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet, die unter den richtigen Bedingungen Präzipitationsringe bilden. Die Ringgröße nimmt so lange zu, bis sich ein Gleichgewicht zwischen der Bildung und dem Abbau dieser Komplexe einstellt. Dies wird als Diffusionsendpunkt bezeichnet und hier besteht eine lineare Beziehung zwischen den Quadraten der Ringdurchmesser und der Antigenkonzentration. Eine Standardkurve kann erstellt werden, indem die quadrierten Ringdurchmesser der Standards gegen ihre Konzentration aufgetragen werden. Die Antigenkonzentration einer unbekannt Probe kann bestimmt werden, indem der Durchmesser des Präzipitationsrings, der durch die Probe entstanden ist an der Standardkurve abgelesen wird.

Es gibt drei verschiedene Methoden mit diesem Kit zu arbeiten (siehe Abschnitt 8.4). Bei Methode 1 und 2 werden die Ringdurchmesser am Diffusionsendpunkt gemessen und für Methode 2 eine lineare Standardkurve erstellt. Bei Methode 1 werden die Ergebnisse direkt aus der mitgelieferten Referenztabelle, die auf einer idealen linearen Standardkurve basiert, abgelesen. Bei Methode 3 werden die Ringdurchmesser vor dem Erreichen des Diffusionsendpunktes abgelesen und die Standardkurve ist nicht linear.

4 REAGENZIEN

- 4.1 Immundiffusionsplatten (in Folienbeutel eingeschweißt): enthalten monospezifisches Antiserum gegen C1-Inaktivator in einem Agarosegel. Auf jeder Platte können 14 Bestimmungen (inklusive Kalibratoren und Kontrollen) durchgeführt werden. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA (E-Amino-n-Capronsäure) und 0,01% Benzamidin.
- 4.2 Kalibratoren: Ein Set bestehend aus drei Kalibratoren mit hoher, mittlerer und niedriger C1-Inaktivator-Konzentration. Sie liegen als stabilisierte Flüssigkeiten vor und die Konzentration des jeweiligen Kalibrators ist auf dem Flaschenetikett angegeben. Diese Werte wurden durch Vergleich mit einem kommerziell erhältlichen Standard ermittelt. Da es aber keinen international anerkannten Standard gibt, kann die Genauigkeit nicht garantiert werden. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin.
- 4.3 Die 7%ige Rinderserum-Albumin-(BSA)-Lösung: Sie liegt in flüssiger, stabilisierter Form vor und ist für Verdünnungen zu verwenden. Enthaltene

Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin.

- 4.4 Die Kontrolle: liegt als stabilisierte Flüssigkeit vor. Der Sollwert ist auf dem Flaschenetikett angegeben. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin.

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, Kalibratoren, Kontrollen und BSA-Lösung enthalten 0,099% 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

Den Kit bei 2-8°C lagern. Der ungeöffnete Kit ist so bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar. NICHT EINFRIEREN! Die Verfallsdaten der Einzelkomponenten sind auf den jeweiligen Etiketten angegeben. Die RID-Platten bei 2-8°C lagern. Sie werden durch extreme Temperaturen geschädigt: Einfrieren zerstört das Gel, darum die Platten nicht direkt an den Kühlelementen lagern, hohe Temperaturen führen zum Flüssigkeitsverlust im Gel, was ihre Funktion beeinträchtigt. Ungeöffnete Platten flach und mit der Oberseite nach unten (Etikett auf der Oberseite) lagern, damit sich keine Kondensationsflüssigkeit in den Vertiefungen ansammelt. Die Platten stets vorsichtig behandeln, damit sie nicht beschädigt werden.

Ungeöffnete Kalibratoren und Kontrollen bei 2-8°C lagern. Geöffnet sind sie mindestens eine Woche bei 2-8°C stabil. Für längere Aufbewahrungszeiten sollten sie aliquotiert und bei mindestens -20°C eingefroren werden. Alle anderen Kitkomponenten bei 2-8°C lagern.

7 PROBENSAMMLUNG UND VORBEREITUNG

Immer frische oder tiefgefrorene Seren (mindestens -20°C) verwenden. Die Verwendung von mikrobiell oder mit Partikeln verunreinigter Seren, oder hämolytischer oder stark lipämischer Seren vermeiden. Blutproben über Venenpunktur sammeln und auf natürliche Weise gerinnen lassen. Serum vom Gerinnsel trennen, um eine Hämolyse zu vermeiden. Die Seren können bei 2-8°C bis zu 48 Stunden vor dem Test gelagert werden. Für eine längere Lagerung empfiehlt es sich, die Seren unverdünnt bei mindestens -20°C einzufrieren. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Seren vermeiden.

Für die Verdünnungen ausschließlich das im Kit enthaltene Rinderserum-Albumin (BSA) verwenden, um die Viskosität zu erhalten. Dadurch können die Ergebnisse direkt mit den Werten der Kalibratoren verglichen werden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Eine Zusammenfassung der Testdurchführung befindet sich am Ende der Arbeitsanleitung.

8.1 Gelieferte Materialien

- 8.1.1 3 x *Human C1 Inactivator NL Bindarid* (Immundiffusionsplatten, in Folie eingeschweißt)
- 8.1.2 8 x *Gel dividers* (Gel -Trennplatten)
- 8.1.3 3 x *Human C1 Inactivator NL Calibrator* (Kalibratoren - flüssig)
- 8.1.4 1 x 5 mL 7% BSA (7% Rinderserum-Albumin-Lösung - BSA)
- 8.1.5 1 x *Human C1 Inactivator NL Control Serum* (Kontrollserum - flüssig)
- 8.1.6 1 x Arbeitsanleitung, inklusive RID-Referenztabelle

8.2 Zusätzlich benötigte, nicht im Kit enthaltene Materialien

- 8.2.1 Laborausstattung zum Sammeln und Vorbereiten der Proben (z.B. Probenröhrchen, Zentrifuge etc.).
- 8.2.2 Pipetten zur exakten Verdünnung der Proben (falls notwendig).
- 8.2.3 Mikropipetten zum Auftragen der Proben. Diese sollten 5µL exakt pipettieren können. Wir empfehlen Mikropipetten von Binding Site (Bestell-Nr.: AD041) oder "Hamilton-Spritzen".
- 8.2.4 Juwelier-Lupe (Bestell-Nr.: AD040) oder digitales RID-Platten-Lesegerät (AD400) zur Vergrößerung und genauen Messung des Präzipitat-Ringdurchmessers bis auf 0,1mm genau.
- 8.2.5 Millimeterpapier

8.3 Vorbereitung der Reagenzien

8.3.1 RID-Platten

Um eine Verunreinigung der Platten zu vermeiden, sollte nach Möglichkeit in einer staubfreien Umgebung gearbeitet werden. Die Platte aus der Folie nehmen und Deckel öffnen. Hinweis: Ist auf dem Plattendeckel Kondenswasser sichtbar, die Platte bis zum Öffnen des Deckels mit der Gel-Oberseite nach unten lagern, um zu verhindern, dass

Wassertropfen auf die Gel-Oberfläche gelangen. Vor Gebrauch die Platte auf Lager- oder Transportschäden kontrollieren, z. B. Risse im Gel. Den Deckel öffnen und die Platte 10-15 Minuten (wenn nötig auch länger) bei Raumtemperatur offen stehenlassen (Gel-Oberseite nach oben), so dass eventuell vorhandenes Kondenswasser aus den Vertiefungen oder von der Gel-Oberfläche verdunsten kann. Proben nicht in Vertiefungen pipettieren, die noch Kondenswasser enthalten.

Unterteilung der Platte: die Platten können vor Gebrauch mit den beiliegenden Gel-Trennplatten in bis zu vier Teile 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 Plastiketikett aufliegen. 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, oder wenn Proben gemessen werden, bei denen man eine sehr hohe Antigen-Konzentration erwartet. Bei diesen Proben kann es zu einer weitläufige Diffusion des Antigens kommen, wodurch in entfernteren Teilen der Platte die Antikörperkonzentration abnimmt. Unterteilte, teilweise benutzte Platten sind bei 2-8°C in der Folie verpackt bis zu 4 Wochen haltbar. Die Gel-Trennplatten nicht entfernen und das Gel mit der Oberfläche nach oben lagern.

8.3.2 Kalibrator(en)

Die flüssigen Kalibratoren sind vorverdünnt. Vor Gebrauch vorsichtig schütteln und direkt ohne weitere Verdünnung auf die Platte auftragen. Der mittlere und niedrige Kalibrator werden nur für die Erstellung der Standardkurve (Methode 2 und 3) benötigt.

8.3.3 Kontrolle

Die flüssige Kontrolle unverdünnt auftragen. Vor Gebrauch leicht schütteln.

8.3.4 Proben

In der Regel ist keine Verdünnung der Seren notwendig. Nur Seren, die eine hohe C1-Inaktivator-Konzentration enthalten, müssen verdünnt werden. In solchen Fällen wird empfohlen mindestens 20µL der Probe (um eine hohe Präzision zu gewährleisten) mit einem geeigneten Volumen BSA (im Kit enthalten) zu mischen. Für Proben mit einem sehr geringen Antigengehalt, der unterhalb des Messbereichs liegt, wird folgendes empfohlen:

- i) Ankonzentrieren der Probe.
- ii) Doppeltes Probenvolumen auftragen (siehe Abschnitt 8.5).

8.4 Methoden

Es gibt drei verschiedene Methoden, mit den RID-Platten zu arbeiten.

8.4.1 Methode 1: RID-Referenztablelle

Hierbei ist es nicht nötig, eine eigene Standardkurve zu erstellen. Die Ringdurchmesser werden am Diffusionsendpunkt gemessen und die resultierenden Proteinkonzentrationen können direkt aus der beiliegenden RID-Referenztablelle (befindet sich am Ende der Arbeitsanleitung) abgelesen werden. Um sicherzustellen, dass die volle Ringgröße erreicht wird, sollte die Diffusionsdauer mindestens 72 Stunden betragen. Zur Überprüfung der Testdurchführung sollte auf jeder Platte immer der hohe Kalibrator mit aufgetragen werden.

8.4.2 Methode 2: Standardkurve am Diffusionsendpunkt

Bei dieser Methode werden alle drei Kalibratoren verwendet, um eine lineare Standardkurve zu erstellen. Um die volle Ringgröße zu erreichen muss die Diffusion mindestens 72 Stunden dauern. Eine Standardkurve kann für mehrere Platten aus einer Charge verwendet werden. In diesem Fall sollte aber der hohe Kalibrator zur Kontrolle auf jede Platte aufgetragen werden.

8.4.3 Methode 3: Standardkurve vor dem Diffusionsendpunkt

Bei dieser Methode werden alle drei Kalibratoren verwendet, um eine Standardkurve zu erstellen. Diese ist jedoch nicht linear, weil die Ringdurchmesser vor dem Erreichen des Diffusionsendpunkts bestimmt werden. Die Diffusion sollte aber über mindestens 18 Stunden laufen. Für jede Platte sollte eine eigene Standardkurve erstellt werden.

8.5 Auftragen von Kalibrator und Proben

Kalibrator(en), Kontrolle und Proben vor dem Auftragen vorsichtig schütteln. Je 5µL des hohen Kalibrators mit einer Mikropipette oder Hamilton-Spritze in eine Vertiefung pipettieren. Bei Methode 2 oder 3 zusätzlich je 5µL des mittleren und niedrigen Kalibrators in je eine Vertiefung pipettieren. In die restlichen Vertiefungen je 5µL der Testproben (eventuell verdünnt) und Kontrolle pipettieren. Während des Auftragens sollte die Platte nicht unnötig lange offen stehen, damit das Gel nicht austrocknet.

Wichtig: Erwartet man bei einer Probe sehr niedrige C1-Inaktivator-Konzentrationen, kann das zweifache Probenvolumen in eine Vertiefung aufgetragen werden. Zunächst 5µL Probe auftragen und die Probe vollständig ins Gel diffundieren lassen, was bis zu 30 Minuten dauern kann. Während dieser Zeit die Platte mit dem Deckel verschließen. Dann die zweiten 5µL der Testprobe in die gleiche Vertiefung pipettieren und die Platte anschließend normal inkubieren. Beim Berechnen des Ergebnisses muss man das doppelte Probenvolumen berücksichtigen; das Ergebnis ist nicht so genau wie bei einfach pipettierten Proben.

8.6 Inkubation

Nach dem Auftragen der Proben die Platte schließen und flachliegend mit dem Deckel nach oben bei Raumtemperatur (20-24°C) inkubieren. Das Gel darf während der Inkubation auf keinen Fall austrocknen! Darum die Platten entweder in Folie einschweißen oder in einer feuchten Kammer (verschlossene Plastikbox mit feuchten Tüchern) inkubieren. Die minimale Inkubationszeit für Methode 3 beträgt 18 Stunden, für Methode 1 und 2 (Diffusionsendpunkt-Bestimmung) 72 Stunden. Der Ringdurchmesser wird durch die Temperatur beeinflusst. Bei einer Inkubationstemperatur von 20-24°C beträgt der erwartete Ringdurchmesser des hohen Kalibrators 9mm (± 0,3mm). Um falsche Ergebnisse zu vermeiden, ist darauf zu achten, dass die Gele nicht austrocknen. Extreme Temperaturen vermeiden.

8.7 Qualitätskontrolle

Das Kontrollserum immer wie eine Patientenprobe behandeln. Der gemessene Kontrollwert sollte nicht mehr als ±10% von dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Wert abweichen.

9 ABLESEN UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Nach der benötigten Diffusionszeit die Ringdurchmesser mit einer Genauigkeit von 0,1mm mit Hilfe einer Juweliertlupe oder eines RID-Readers bestimmen. Bei Verwendung einer Lupe ist helles Seitenlicht und ein dunkler Hintergrund sinnvoll. Sollten Ringe schwierig auszuwerten sein, die Ringe makroskopisch beurteilen und die Ränder der Ringe auf der Plattenrückseite mit einer Nadel markieren. Die Abstände zwischen diesen Markierungen können leicht gemessen werden.

Wichtig: Bei Methode 1 und 2 müssen die Ringdurchmesser vollständig entwickelt sein. Gibt es daran Zweifel, sollten sie nach 24 Stunden erneut gemessen werden, um sicherzustellen, dass sich der Durchmesser nicht vergrößert hat. Der hohe Kalibrator hat am Diffusionsendpunkt einen Ringdurchmesser von 9,0mm ± 0,3mm. Liegt der Ringdurchmesser nicht in diesem Bereich, siehe "TROUBLE SHOOTING" (Abschnitt 10.3).

Methode 1: RID-Referenztablelle

Die C1-Inaktivator-Konzentration einer Patientenprobe kann direkt aus der RID-Referenztablelle abgelesen werden, **vorausgesetzt die Probe wurde wie empfohlen, unverdünnt aufgetragen.**

Proben, deren Ringdurchmesser größer als der des höchsten Kalibrators ist, ergeben nur ungefähre Konzentrationen, denn es besteht die Möglichkeit, dass sie nicht vollständig diffundiert sind. Außerdem können solche Proben in ihrer Nachbarschaft zu einer Antikörper-Veränderung führen, so dass sie noch die Ringdurchmesser der nebenliegenden Proben beeinflussen. Sie sollten mit einer geeigneten Verdünnung erneut getestet werden. Erhält man Ringdurchmesser, die kleiner als in der RID-Referenztablelle angegeben sind, dann sollten die Seren in konzentrierter Form (siehe Abschnitt 8.3.4) aufgetragen werden. Jede Änderung bei der Probenverdünnung muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Beispiel:

Probe	Verdünnung	Ringdurchmesser (mm)	Tabellenwert (mg/L)	Original-probe (mg/L)
C1-Inaktivator-Serum A	unverdünnt	6,4	196	196
C1-Inaktivator-Serum B	unverdünnt	> 11	> 703	> 703
C1-Inaktivator-Serum B (Wiederholung)	1/2	8,6	406	812*

*Die Konzentration wurde wie folgt berechnet:
RID-Referenztablellen-Wert x empfohlener Verdünnung / tatsächliche Verdünnung: z.B. 406mg/L x (1)/(1/2).

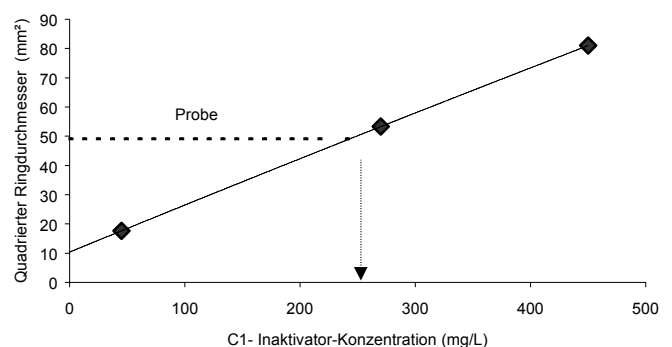
Methode 2: Standardkurve am Diffusionsendpunkt

Die Ringdurchmesser der drei Kalibratoren bestimmen und die Quadrate der Ringdurchmesser gegen ihre jeweilige C1-Inaktivator-Konzentrationen, auftragen. Dabei die C1-Inaktivator-Konzentrationen auf der Abszisse (x-Achse), die quadrierten Ringdurchmesser (mm²) und auf der Ordinate (y-Achse) auftragen. Man wählt als Linie die bestmögliche Verbindung dieser drei Punkte. Der Schnittpunkt mit der y-Achse sollte bei 10-12mm² liegen. Die C1-Inaktivator-Konzentration der Patientenproben aus der Standardkurve ablesen. Wichtig: Korrektur der Probenkonzentration durch etwaige Verdünnungsfaktoren.

Berechnung der Antigenkonzentration in einer Patientenprobe:
Die C1-Inaktivator-Kalibratoren ergeben folgende Ringdurchmesser auf einer C1-Inaktivator-RID-Platte:

Kalibrator	Konzentration mg/L	Ringdurchmesser (mm)	Quadrat des Ringdurchmessers (mm ²)
Hoch	450	9,0	81,0
Mittel	270	7,3	53,3
Niedrig	45	4,1	16,8

Aus diesen Werten wurde die nachstehende Standardkurve erstellt:



Eine unbekannte Patientenprobe, wie empfohlen unverdünnt aufgetragen, ergibt einen Ringdurchmesser von 7,0mm auf dieser RID-Platte. Von obiger Standardkurve abgelesen entspricht dies einer C1-Inaktivator-Konzentration von 240mg/L. D.h. die C1-Inaktivator-Konzentration der unverdünnten Probe ist 240mg/L.

Methode 3: Standardkurve vor dem Diffusionsendpunkt

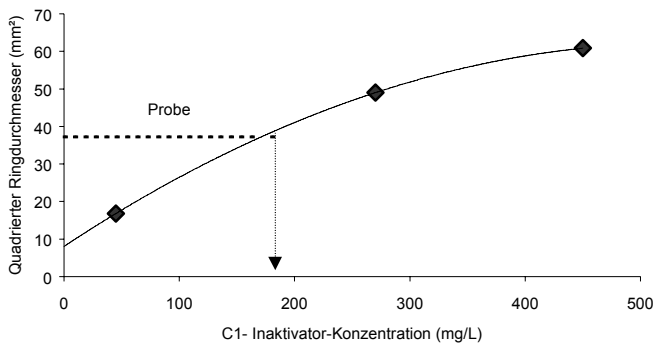
Die Standardkurve wird wie bei Methode 2 erstellt, aber man erhält keine Gerade, sondern eine Kurve. Die Kurve zeigt als Folge der unvollständigen Diffusion bei hohen Konzentrationen einen Abfall. Der Schnittpunkt mit der y-Achse sollte wie bei Methode 2 sein. Wichtig: Korrektur der Probenkonzentration durch etwaige Verdünnungsfaktoren.

Berechnung der Antigenkonzentration in einer Patientenprobe:

Die C1-Inaktivator-Kalibratoren ergeben folgende Ringdurchmesser auf einer C1-Inaktivator-RID-Platte:

Kalibrator	Konzentration (mg/L)	Ringdurchmesser (mm)	Quadrat d. Ringdurchmessers (mm ²)
Hoch	450	7,8	60,8
Mittel	270	7,0	49,0
Niedrig	45	4,1	16,8

Aus diesen Werten wurde die nachstehende Standardkurve erstellt:



Ein unbekanntes Patientenserum, wie empfohlen unverdünnt aufgetragen, ergibt einen Ringdurchmesser von 6,1mm auf dieser RID-Platte. Von obiger Standardkurve abgelesen entspricht dies einer C1-Inaktivator-Konzentration von 180mg/L. D.h. die C1-Inaktivator-Konzentration der unverdünnten Probe ist 180mg/L.

10 GRENZEN DER METHODE

10.1 Methode 1 liefert nur in dem in der RID-Referenztable angegebene Bereich exakte Ergebnisse. Dabei ist zu beachten, dass Ringdurchmesser, die größer als der unverdünnte Kalibrator (9,0 mm) sind, nur Näherungswerte sind (siehe Abschnitt 9). Bei Methode 2 und 3 wird die Richtigkeit von der erstellten Standardkurve begrenzt; eine Extrapolation über die gemessenen Werte hinaus ist nicht zulässig. Werte, die außerhalb des Standardkurvenbereichs liegen, müssen in einer entsprechend niedrigeren oder höheren Konzentration erneut getestet werden (siehe Abschnitt 8.3.4).

10.2 FDA (USA) Informationen : siehe englische Packungsbeilage.

10.3 TROUBLE SHOOTING

Problem	Fehlerquelle	Lösung
A. Keine Präzipitationsringe bei:		
1. Kalibrator(en)	Kalibrator nicht aufgetragen	Test wiederholen
2. Proben	i) Probe nicht aufgetragen	Test wiederholen
	ii) Konzentration zu hoch/niedrig	Probe verdünnen/ ankonzentrieren
3. Kalibrator(en) und Proben	Platte unbrauchbar	a) Lagerungsschaden; Test mit neuer Platte wiederholen
		b) Kit abgelaufen; Test mit neuem Kit wiederholen
B. Zu große Ringe:		
1. Hoher Kalibrator (>9,3mm)	i) Ring ungenau gemessen	Erneute Messung mit Lupe oder RID-Reader
	ii) Falsches Volumen aufgetragen	Überprüfen, ob 5µL aufgetragen wurden
	iii) Ungenaueres Volumen aufgetragen	a) Mikropipette defekt-Funktion überprüfen und Test wiederholen
		b) Verfahrensfehler – Test wiederholen
	iv) Kalibrator während Lagerung teilweise verdunstet	Test mit neuem Kalibrator/Kit wiederholen
	v) Platte unbrauchbar	a) Lagerungsschaden – Test mit neuer Platte wiederholen
b) Kit abgelaufen – Test mit neuem Kit wiederholen		
vi) Lokale Antikörperverminderung wegen zu	Entsprechende Proben verdünnen und auf neuer	

Problem	Fehlerquelle	Lösung
	hoher Antigenkonzentration in der Probe	Platte testen
	vii) Inkubations-temperatur zu hoch (siehe Abschnitt 8.6)	Test wiederholen: Inkubation bei 20 – 24°C
2. Patientenprobe (oberhalb des Wertebereichs : siehe Abschnitt 10.1)	i) Proteinkonzentration zu hoch	Höhere Probenverdünnung – Test wiederholen
	ii) Falsches Volumen aufgetragen	Kontrollieren, dass 5µL aufgetragen werden.
C. Zu kleine Ringe bei:		
1. Hoher Kalibrator (kleiner als 8,7mm)	i) Ring ungenau gemessen	} Siehe B1
	ii) Falsches Volumen aufgetragen	
	iii) Ungenaueres Volumen aufgetragen	
	iv) Kalibrator unbrauchbar	
	v) Inkubations -temperatur zu niedrig (siehe 8.6)	
2. Patientenproben (unterhalb des Wertebereichs - siehe Abschnitt 10.1)	i) Konzentration zu niedrig	Test wiederholen, Inkubation bei 20-24°C
	ii) Falsches Volumen aufgetragen	Kontrollieren, dass 5µL aufgetragen werden
D. Doppel-/ Vielfachringe bei		
	i) nicht spezifische Präzipitation nahe der Vertiefung (Grund: PEG im Gel)	Äußeren Ring ablesen
	ii) Probe schlecht aufgetragen	Test wiederholen
	iii) Kalibrator unbrauchbar	a) Falsche Lagerung; Test mit neuem Kalibrator wiederholen
		b) Kit abgelaufen; Test mit neuem Kit wiederholen
iv) Probe nicht brauchbar	Test mit frischem Probenmaterial wiederholen	
E. Ungleichmäßige Ringe		
	i) Probe nicht gleichmäßig aufgetragen	Test wiederholen
	ii) Gel vor Verwendung ausgetrocknet	a) Falsche Lagerung Test mit neuer Platte wiederholen
		b) Kit abgelaufen; Test mit neuem Kit wiederholen
	iii) Gel während Probenauftrag oder Inkubation ausgetrocknet	Test mit neuer Platte wiederholen. Die Platte nur kurze Zeit offen stehenlassen. Inkubation mit festverschlossenem Deckel in einer feuchten Kammer oder in Folie eingeschweißt
iv) Lokale Antikörperverminderung wegen zu hoher Antigenkonzentration	Die entsprechende Proben verdünnen und auf neuer Platte erneut testen	
F. Trübes Gel		
	i) Platte war eingefroren	Lagertemperatur überprüfen; Test mit neuen Platten wiederholen
	ii) Gel vor Verwendung ausgetrocknet	Siehe E(ii)
	iii) Gel während Probenauftrag oder Inkubation ausgetrocknet	Siehe E(iii)
G. Brüchiges, unebenes Gel		
	Platte war eingefroren	Test mit neuer Platte wiederholen; Lagertemperatur überprüfen
H. Schlechte Standardkurve:		
1. Gerade nicht linear (Methode 2)	i) Unvollständige Diffusion	Weitere 24h inkubieren und erneut Ringdurchmesser bestimmen
	ii) Ringdurchmesser der Kalibratoren zu groß oder zu klein	Siehe B1 und C1 (Gilt auch für den mittleren und niedrigen Kalibrator)
	iii) Standardkurve falsch erstellt	Konstruktion der Standardkurve kontrollieren
2. Schnittpunkt mit der y-Achse außerhalb des Wertebereichs (Abschnitt 9)	i) Ringdurchmesser der Kalibratoren zu groß oder zu klein	Siehe B1 und C1. (Gilt auch für den mittleren und niedrigen Kalibrator)
	ii) Standardkurve falsch erstellt	Konstruktion der Standardkurve überprüfen

10.4 Die Diagnose und die Einleitung einer Therapie darf nicht ausschließlich auf der C1-Inaktivator-Bestimmung basieren. Das klinische Bild und andere serologische Befunde müssen ebenfalls berücksichtigt werden.

10.5 Zeigt eine Patientenprobe ein ungewöhnliches Ergebnis, sollte der Test mit einer frischen Probe wiederholt werden.

Falls Sie Probleme haben, die Sie an Hand dieser Tabelle nicht lösen können, wenden Sie sich bitte an Ihre Lieferfirma.

11 ERWARTETE WERTE

Die folgenden Werte wurden mit diesem Kit erhalten:

	Mittelwert (mg/L)	SD (n-1)	Median (mg/L)	95 Percentile Bereich (mg/L)	Anzahl d. Proben
C1 Inaktivator	266	38	261	195-345	86

Diese Werte wurden mit Hilfe eines gesunden Blutspenderkollektivs ermittelt und dienen nur zur Orientierung. Erniedrigte C1-Inaktivator-Konzentrationen im Serum sind mit der erblichen Angiodemie (Typ1) assoziiert und sind oft niedriger als 30% vom Normalen. Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor eigene C1-Inaktivator-Konzentrationsbereiche für die verschiedenen assoziierten Erkrankungen erstellen sollte.

12 LEISTUNGSDATEN

12.1 Präzision

Die Präzision (Reproduzierbarkeit) des Kits wird durch den Mittelwert und dem prozentualen Variationskoeffizienten (VK) wiedergegeben. Der Variationskoeffizient wird durch Messung von Serum-Pools, die hohe, mittlere und niedrige Konzentrationen an C1-Inaktivator enthalten, bestimmt. Alle Analysen wurden im Labor von Binding Site Limited, Birmingham durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurde jeder Wert durch 10 Messungen (Doppelbestimmungen auf 5 verschiedenen RID-Platten einer normalen Charge) bestimmt. Für Methode 1 und 2 wurden die Ringdurchmesser nach 72 Stunden, für Methode 3 nach 18 Stunden gemessen.

Proben-Pool	Methode 1 (RID-Referenztable)		Methode 2 (Standardkurve)		Methode 3 (zeitlich begrenzte Diffusion) 18 h	
	Mittelwert mg/L	%VK	Mittelwert mg/L	%VK	Mittelwert mg/L	%VK
Hoch	387	2,0	411	2,2	402	2,6
Mittel	231	2,6	244	3,5	250	3,1
Niedrig	82	6,1	80	6,8	91	5,8

12.2 Intra-Assay- und Inter-Assay-Variation

Die Intra-Assay-Variation (Variation innerhalb einer Platte) wird als mittlere Standardabweichung (SD) bei der %VK-Bestimmung bezeichnet. Zur Bestimmung der Variationskoeffizienten wurden RID-Platten von drei verschiedenen Chargen verwendet und pro Platte und Probe 6 Ringdurchmesser bestimmt.

Die Inter-Assay-Variation wird als VK der Ringdurchmesser-Mittelwerte, die auf Platten verschiedener Chargen gemessen wurden, ausgedrückt. Für jede Charge (3 Platten pro Charge) werden die Ringdurchmesser (6 Bestimmungen pro Platte) am Diffusionsendpunkt gemessen und daraus der mittlere Ringdurchmesser berechnet.

	Intra-Assay-Variation	Inter-Chargen-Variation
	Mittlerer %VK ± SD	%VK
C1-Inaktivator	0,92 ± 0,09 (N=3)	0,82 (N=3)

13 BIBLIOGRAPHIE

13.1 Protein Reference Unit Handbook of Clinical Immuno Chemistry (1990) Ed. A Milford Ward, Publ. PRU Publications, Sheffield, 161-162.
 13.2 Sjöholm, AG. (1990). Inherited complement deficiency states: implications for immunity and immunological disease. *APMIS* **98**, 861-874.
 13.3 Cooper, NR (1985). The Classical complement pathway; Activation and regulations of the first complement component. *Adv. immunol.* **37**, 151-216.
 13.4 Fahey, JL & McKelvey, EM (1965). Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.* **94**, 84-90.
 13.5 Mancini, G, Vaerman, J P et al. (1964). Protides of the biological fluids (XI colloquium). Peters H. (ed), Amsterdam, Elsevier Publishing Co., P370.
 13.6 Mancini, G, Carbonara, A O et al (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem*, **2**, 235-254.

14 KURZARBEITSANLEITUNG

- 14.1 Auswahl zwischen Methode 1, 2 oder 3. Methode 3 wird angewendet, wenn die Ergebnisse schnell benötigt werden.
- 14.2 Bei Proben mit hoher C1-Inaktivator-Konzentration Verdünnung herstellen.
- 14.3 Eventuell vorhandenes Kondenswasser verdunsten lassen (Platte 5–15 Minuten offen bei Raumtemperatur stehen lassen).
- 14.4 Kalibrator(en), Kontrolle und Proben auftragen: je 5µL.
- 14.5 Platte mit Deckel verschließen – Inkubation bei Raumtemperatur (ca. 20-24°C): mindestens 18h bei Methode 3 oder bis zum Diffusionsendpunkt (mindestens 72h bei Methode 1 und 2).
- 14.6 Messen der Ringdurchmesser.
- 14.7 Ergebnisse aus der RID-Referenztable ablesen (Methode 1) oder Standardkurve erstellen und aus dieser die Ergebnisse ablesen (Methode 2 und 3).

15 RID-REFERENZ TABELLE

RID-Referenz-Tabelle für Human C1-Inaktivator Konzentrationen in mg/L

Ringdurchmesser mm	Konzentration
4.0	38.0
4.1	43.2
4.2	48.4
4.3	53.8
4.4	59.3
4.5	65.0
4.6	70.7
4.7	76.6
4.8	82.6
4.9	88.8
5.0	95.0
5.1	102
5.2	108
5.3	115
5.4	121
5.5	128
5.6	135
5.7	142
5.8	149
5.9	157
6.0	164
6.1	173
6.2	181
6.3	189
6.4	196
6.5	205
6.6	213
6.7	221
6.8	230
6.9	238
7.0	247
7.1	256
7.2	265
7.3	274
7.4	284
7.5	294
7.6	303
7.7	313
7.8	322
7.9	332
8.0	342
8.1	352
8.2	363
8.3	373
8.4	383
8.5	395
8.6	406
8.7	417
8.8	428
8.9	439
9.0	450
9.1	461
9.2	473
9.3	484
9.4	496
9.5	508
9.6	521
9.7	533
9.8	545
9.9	558
10.0	570
10.1	583
10.2	596
10.3	609
10.4	623
10.5	636
10.6	649
10.7	662
10.8	676
10.9	690
11.0	703

Hinweis: Die in der Tabelle angegebenen Werte gehen davon aus, dass die Proben unverdünnt und mit einem Volumen von 5µL aufgetragen wurden. Der hohe Kalibrator sollte einen Ringdurchmesser von 9,0 ± 0,3mm am Diffusionsendpunkt und einer Inkubationstemperatur von 20-24°C aufweisen.

CONTENU

- 1 Utilisation
- 2 Présentation générale
- 3 Principe du test
- 4 Réactifs
- 5 Précautions
- 6 Stockage et stabilité
- 7 Collection et préparation des échantillons
- 8 Méthodologie
- 9 Mesure des anneaux et résultats
- 10 Limites de la procédure
- 11 Valeurs attendues
- 12 Performances
- 13 Bibliographie
- 14 Résumé de la procédure
- 15 Table de référence IDR

COFFRET D'IMMUNODIFFUSION RADIALE BINDARID™ POUR LE DOSAGE DU C1 INHIBITEUR

Pour un usage en diagnostic *in vitro*
uniquement

Référence: RN019.3

BINDARID™ est une marque de The Binding Site Group Ltd., Birmingham, U.K.

Produit fabriqué en Angleterre par la société :
The Binding Site Group Ltd, PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB,
United Kingdom. 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
e-mail : info@bindingsite.fr



1 UTILISATION

Ce coffret est conçu pour quantifier le C1 inhibiteur (inhibiteur de la C1 estérase) dans le sérum humain. Il apporte une aide au diagnostic et au traitement des angiodèmes.

2 PRESENTATION GENERALE

Le C1 inhibiteur fait parti de la famille des Serpins, inhibiteurs de la protéase de la sérine qui inhibe l'activation du complément par la voie classique. Il se lie de façon covalente aux C1r et C1s activés, libérant le complexe C1r/C1s/C1 inhibiteur en solution. Ce qui réduit le clivage du C4 et du C2. Le C1 inhibiteur régule également de nombreuses molécules de la coagulation et de la fibrinolyse.

Le déficit en C1 inhibiteur est le plus courant des déficits héréditaires des fractions du complément. Il est responsable de l'angiodème héréditaire (qui se traduit par une augmentation de la perméabilité vasculaire entraînant un oedème tissulaire). Ce déficit peut être de deux types: le type I correspond à une diminution du taux sérique de C1 inhibiteur fonctionnellement actif, le type II correspond à un taux sérique normal ou élevé de C1 inhibiteur mais la molécule n'est pas fonctionnelle. Cette maladie est rare, et tous les cas rencontrés sont liés à des myélomes ou des lymphomes (réfs. 1, 2 et 3).

L'immunodiffusion radiale est une technique couramment employée pour quantifier les différents antigènes solubles contenus dans les fluides biologiques. Cette technique dérive des travaux de Fahey, Mc Kelvey (réf. 4) et de Mancini *et al* (réfs. 5 et 6).

3 PRINCIPE DU TEST

Le principe repose sur la diffusion radiale d'un antigène à partir d'un puits cylindrique creusé dans un gel d'agarose contenant un anticorps monospécifique. La formation de complexes antigène-anticorps donnera lieu à un cercle de diffusion autour du puits. La taille du cercle augmentera jusqu'à la zone d'équilibre. Au point final de diffusion, il existe une relation linéaire entre le carré du diamètre de l'anneau de diffusion et la concentration en antigène. Il est possible d'établir une courbe de calibration en mesurant les diamètres des anneaux obtenus à partir d'échantillons de concentration connue. La concentration en antigène d'un échantillon inconnu sera lue directement à partir de la courbe de calibration sur laquelle on aura rapporté le diamètre de l'anneau de diffusion de l'échantillon.

Trois procédures de mesure différentes peuvent être utilisées avec les réactifs Binding Site (voir paragraphe 8.4). Pour la procédure 1 et 2, la mesure des anneaux de diffusion se fait au point final de diffusion. Pour la procédure 2, la concentration est lue sur la droite de calibration ; pour la procédure 1, elle est lue sur la Table de Référence fournie avec les réactifs. Cette Table de Référence est établie à partir d'une droite de calibration idéale. En utilisant la procédure 3, les anneaux sont mesurés avant le point final de diffusion, la courbe de calibration n'est pas linéaire.

4 REACTIFS

- 4.1 Plaques IDR (emballées individuellement dans un sachet aluminium). Elles contiennent un anticorps monospécifique inclus dans le gel d'agarose et dirigé contre la protéine C1 inhibiteur. 14 échantillons (calibrateurs inclus) peuvent être mesurés sur chaque plaque. Conservateurs : azide de sodium 0,099%, Acide E amino caproïque (EACA) et 0,01%, benzamidine 0,01%.
- 4.2 Calibrateurs. Ils sont fournis sous forme liquide stable contenant des concentrations basses, moyennes et hautes en C1 inhibiteur. Les concentrations de C1 inhibiteurs données sur les étiquettes des flacons ont été obtenues par comparaison avec un standard commercial disponible ; Néanmoins en l'absence d'accord international, l'exactitude des standards disponibles ne peut être garantie. Conservateurs : azide de sodium 0,099%, EACA 0,1%, benzamidine 0,01%.

- 4.3 Solution de sérum albumine bovine (BSA) à 7%. Elle est fournie sous forme liquide stable et doit être utilisée comme diluant. Conservateurs : azide de sodium 0,099%, EACA 0,1%, benzamidine 0,01%.
- 4.4 Contrôle. Il est fourni sous forme stable liquide. La concentration attendue en C1 inhibiteur est indiquée sur l'étiquette du flacon. Conservateurs : azide de sodium 0,099%, EACA 0,1%, benzamidine 0,01%.

5 PRECAUTIONS

Tous les sérums humains issus de donneurs de sang fournis dans ce coffret ont été testés et trouvés négatifs pour l'antigène de surface de l'hépatite B (Ag Hbs) et pour les anticorps dirigés contre l'hépatite C, le HIV1 et le HIV2. Toutefois, ils ne peuvent garantir l'absence d'agents infectieux. Tous les échantillons doivent donc être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés par un personnel averti.

Les plaques, les calibrateurs, les contrôles et la BSA contiennent 0,099% d'azide de sodium comme conservateur. Manipuler avec précaution – ne pas ingérer ou mettre en contact avec la peau et les muqueuses. En cas de contact, laver à grande 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 ayant contenu ces réactifs.

Il est recommandé de suivre scrupuleusement le protocole. La validité des résultats obtenus en utilisant d'autres méthodes que celles préconisées ne peut être garantie.

Des 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 fermés se conservent entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. NE PAS CONGELER. La date de péremption des composants individuels est indiquée sur les étiquettes des composants. Les plaques doivent être stockées entre 2 et 8°C et risquent d'être endommagées par des températures extrêmes. La congélation abîme le gel, c'est pourquoi les plaques doivent être éloignées des éléments réfrigérants. Les températures élevées dessèchent le gel affectant les performances. Les plaques de gélose neuves doivent être stockées à plat et à l'envers afin d'éviter l'accumulation d'eau de condensation dans les puits. Manipuler les plaques avec précaution afin d'éviter d'endommager le gel.

Les calibrateurs et les contrôles non ouverts doivent être stockés entre 2 et 8°C. Une fois ouverts, ils sont stables au moins une semaine à 2-8°C. Pour une conservation plus longue, il est recommandé de les aliquoter avant congélation. Tous les autres réactifs sont à conserver entre 2 et 8°C.

7 COLLECTION ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Il est recommandé d'utiliser du sérum fraîchement prélevé ou congelé (-20°C ou à une température inférieure). Les échantillons contaminés par des bactéries, hémolysés, très lipidiques ou contenant des particules de matière ne doivent pas être utilisés. Les échantillons de sang doivent être collectés par ponction veineuse, les laisser coaguler naturellement et séparer le sérum dès que possible afin d'empêcher l'hémolyse. Le sérum peut être stocké à 2-8°C pendant 48 heures avant le test ou pour une période de stockage prolongée à -20°C ou à une température inférieure. Les congélations et décongélations successives doivent être évitées.

La BSA incluse dans le coffret doit être utilisée comme diluant si nécessaire pour maintenir la viscosité du sérum. Les résultats peuvent ainsi être comparés de façon précise à ceux du calibrateur qui a une viscosité similaire à celle d'un sérum normal.

8 METHODOLOGIE

(Résumé du mode opératoire à la fin de la présente fiche technique.)

8.1 Matériel fourni

- 8.1.1 3 x *Human C1 Inactivator NL Bindarid* (plaques d'immunodiffusion radiale fournies dans un emballage individuel)
- 8.1.2 8 x *Gel dividers* (séparateurs de gel)
- 8.1.3 3 x *Human C1 Inactivator NL Calibrator* (flacons de calibrateurs liquides)
- 8.1.4 1 x 7% BSA (flacon de 5mL de BSA 7%)
- 8.1.5 1 x *Human C1 Inactivator NL Control Serum* (flacon de contrôle liquide)
- 8.1.6 1 x fiche technique comprenant une table de référence IDR

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 échantillons.
- 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 plus précisément le diamètre des anneaux de précipitation (lecture à 0,1mm près).
- 8.2.5 Papier millimétré

8.3 Préparation des réactifs

8.3.1 Plaques IDR

Sortir les plaques des pochettes en aluminium et enlever leur couvercle. Les laisser à température ambiante pendant 10 à 15 minutes pour que l'eau de condensation s'évapore. Utiliser les plaques dans un environnement sans poussière pour ne pas contaminer les géloses. Noter : Si des gouttelettes de condensation sont visibles sur le couvercle, maintenir la plaque à l'envers jusqu'à l'ouverture de manière à éviter que l'eau de condensation ne retombe dans les puits. Vérifier que la plaque n'a pas subi de dommage lors de la livraison ou du stockage, par exemple des fentes dans le gel. Laisser la plaque 10 à 15 minutes à température ambiante (ou plus longtemps si

nécessaire) pour permettre à la condensation présente dans les puits et à la surface du gel de s'évaporer. Les échantillons ne doivent pas être déposés dans les puits contenant encore de l'humidité.

Section du gel : Pour un nombre de dosages inférieur à 14, il est possible de sectionner le gel à l'aide d'une ou des deux barrettes en plastique avant utilisation. 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 barrettes en place.

La section du gel est recommandée si seule une partie de la plaque est utilisée initialement ou si des échantillons suspectés d'avoir des concentrations élevées sont mesurés (diffusion sur une grande surface) résultant en une déplétion locale d'anticorps. Les plaques partiellement utilisées doivent être conservées à l'endroit dans leur emballage d'aluminium entre 2 et 8°C et utilisées dans les quatre semaines qui suivent.

8.3.2 Calibrateurs

Les calibrateurs sont pré-dilués et doivent être mélangés avant utilisation. Ils doivent être déposés purs sur les plaques. Les calibrateurs bas et moyens ne doivent être utilisés que lorsqu'une courbe de calibration est nécessaire (procédures 2 et 3).

8.3.3 Contrôle

Le contrôle liquide doit être déposé pur non dilué et doit être mélangé doucement avant utilisation.

8.3.4 Echantillons

Les échantillons ne requièrent aucune dilution. Les échantillons ayant des concentrations élevées en C1 inhibiteur doivent être dilués. Dans ce cas, un volume minimum de 20µL d'échantillon doit être ajouté au volume approprié de BSA. Pour des échantillons ayant une concentration en C1 inhibiteur inférieure à la limite de détection des plaques, il est conseillé :

- ii) de concentrer l'échantillon
- ii) de faire un double dépôt dans les puits (cf. paragraphe 8.5).

8.4 Procédure de mesure

8.4.1 Procédure 1 : Point final de diffusion, table de référence IDR

Cette méthode ne nécessite pas l'établissement d'une courbe de calibration. Les concentrations d'échantillons correspondant à chaque diamètre seront lues directement sur la table de référence fournie dans le coffret. Les diamètres des anneaux seront mesurés au point final de diffusion : 72 heures. Le calibrateur haut doit être déposé sur chaque plaque pour vérifier la validité de la manipulation.

8.4.2 Procédure 2 : Courbe de calibration au point final de diffusion

Pour cette méthode, l'utilisation des trois calibrateurs permettra d'établir une courbe de calibration linéaire. Les diamètres des anneaux seront mesurés au point final de diffusion : 72 heures. Une seule courbe de calibration est suffisante pour un même lot de plaques, mais il est nécessaire, dans ce cas là, de déposer le calibrateur haut sur chaque plaque utilisée.

8.4.3 Procédure 3 : Courbe de calibration avant le point final de diffusion

Cette méthode nécessite l'utilisation des trois calibrateurs pour établir une courbe de calibration qui ne sera pas linéaire puisque les diamètres sont mesurés avant d'atteindre le point final de diffusion. Le temps minimum de diffusion nécessaire est de 18 heures. Il est recommandé d'établir une courbe pour chaque plaque utilisée.

8.5 Dépôt des calibrateurs et des échantillons

Les calibrateurs, le contrôle et les échantillons seront homogénéisés juste avant utilisation. Déposer dans le nombre de puits requis, 5µL de calibrateur haut en utilisant une micropipette. Si les procédures 2 ou 3 sont suivies, déposer également les calibrateurs moyen et bas. Déposer ensuite 5µL d'échantillons dilués de façon appropriée et de contrôle. Durant les dépôts, ne pas laisser la plaque exposée à l'air libre trop longtemps, de manière à éviter un dessèchement excessif du gel.

Noter : Pour les échantillons nécessitant un double dépôt, la procédure est la suivante : déposer 5µL d'échantillon dans le puits, couvrir la plaque, laisser diffuser complètement l'échantillon dans le gel à température ambiante, ce qui peut prendre plus de 30 minutes. Le couvercle doit être replacé pendant cette période. Le second dépôt du même volume peut alors être fait et la plaque incubée normalement. Les résultats obtenus seront corrigés en fonction du double dépôt. La précision de la mesure sera moins bonne que pour un seul dépôt.

8.6 Incubation

Après les dépôts, la plaque est hermétiquement fermée et maintenue à plat à température ambiante (20-24°C). Pour diminuer les phénomènes d'évaporation, il est recommandé de replacer la plaque dans son emballage aluminium ou de l'incuber dans une chambre humide (une boîte plastique contenant un papier absorbant humide). Le temps minimum d'incubation pour la procédure 3 est de 18 heures et pour la diffusion complète (procédures 1 et 2), il est de 72 heures. Les diamètres des anneaux de diffusion sont dépendants de la température. La taille de l'anneau pour le calibrateur haut doit être de 9mm (+/-0,3mm) à une température d'incubation comprise entre 20 et 24°C. Les températures extrêmes doivent être évitées.

8.7 Contrôle de qualité

Le contrôle fourni sera traité de la même façon que les échantillons. Les valeurs obtenues pour le contrôle ne doivent pas s'écarter de plus de 10% de la valeur cible indiquée sur l'étiquette du flacon.

9 MESURE DES ANNEAUX ET RESULTATS

Après le temps d'incubation nécessaire, mesurer les diamètres de diffusion 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. Les bords des anneaux pourront être repérés macroscopiquement sur le fond de la plaque avec une aiguille, la lecture entre les marques se faisant alors plus facilement.

Note : pour les procédures 1 et 2, la lecture doit se faire au point final de diffusion, si un doute existe, la lecture peut être refaite après 24 heures afin de vérifier que les

diamètres n'ont pas augmenté. Le calibrateur haut doit donner un diamètre de l'anneau de 9mm +/- 0,3mm au point final de diffusion. Si le diamètre n'est pas dans cette limite, cf. paragraphe 10.3 sur les problèmes possibles.

Procédure 1

La concentration en C1 inhibiteur pour chaque échantillon peut être lue directement sur la table de référence, **si le sérum a été déposé pur comme indiqué.**

Les échantillons dont le diamètre de diffusion est supérieur à celui du calibrateur haut au point final de diffusion devront être dilués et retestés. En effet, leur diffusion peut être incomplète et, de plus, la forte concentration en protéine spécifique de ce type d'échantillon peut causer une déplétion locale en anticorps qui affecterait la taille des anneaux voisins. Les échantillons dont le diamètre de diffusion est inférieur à la limite mesurable sur la table de référence seront retestés après concentration (voir paragraphe 8.3.4). Il faudra tenir compte de toute modification de dilution dans la lecture de la concentration.

Exemple :

Échantillons	Dilution	Diamètre de l'anneau (mm)	Valeur de la table (mg/L)	Conc. réelle de l'échantillon (mg/L)
C1inhibiteur Sérum A	pur	6,4	196	196
C1inhibiteur Sérum B	pur	>11	>703	>703
C1inhibiteur Sérum B (second test)	1/2	8,6	406	812*

*calculée suivant : valeur de la table x dilution recommandée / dilution actuelle

c'est-à-dire : 406mg/L x (1) / (1/2).

Procédure 2

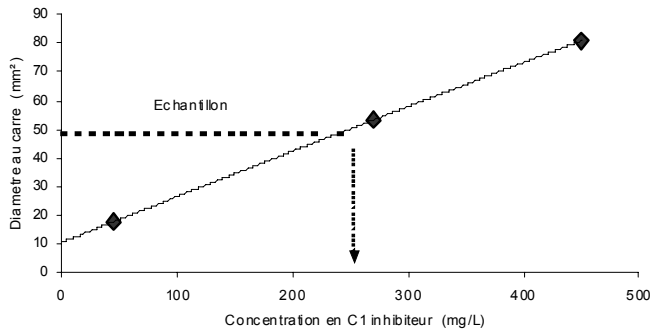
Pour tracer la courbe de calibration, reporter sur l'axe des X les concentrations en C1 inhibiteur figurant sur l'étiquette des flacons des trois calibrateurs et sur l'axe des Y les diamètres au carré des anneaux de diffusion. Tracer une droite passant par les 3 points. L'ordonnée à l'origine doit être comprise entre 10 et 12mm². La concentration en C1 inhibiteur est lue à partir de la courbe de calibration. Ne pas oublier de tenir compte des facteurs de dilution des échantillons.

Exemple :

Les calibrateurs C1 inhibiteur ont donné, au point final de diffusion, les diamètres des anneaux suivants :

Calibrateur	Concentration (mg/L)	Diamètre (D) de l'anneau (mm)	Diamètre au carré (mm ²)
Haut	450	9,0	81,0
Moyen	270	7,3	53,3
Bas	45	4,1	16,8

Une courbe de calibration a été tracée en utilisant ces résultats :



Un échantillon inconnu déposé pur comme recommandé donne un anneau d'un diamètre de 7,0mm sur cette plaque. D'après la courbe ci-dessus, cela correspond à une concentration en C1 inhibiteur de 240mg/L. Par conséquent, la concentration en C1 inhibiteur de l'échantillon non dilué est égale à 240mg/L.

Procédure 3

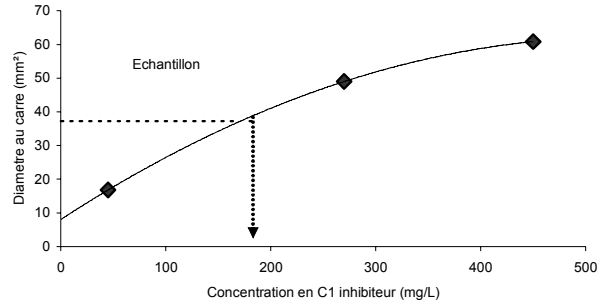
Tracer la courbe de calibration comme dans la procédure 2. La courbe de calibration obtenue ne sera pas linéaire, la pente de la droite diminuant tandis que la concentration augmente. L'intersection avec l'axe des Y obéit aux mêmes règles que la procédure 2. Les concentrations pour les échantillons inconnus seront lues à partir de la courbe en tenant compte des facteurs de dilution.

Exemple :

Les calibrateurs C1 inhibiteur donnent, après 18 heures, les diamètres des anneaux suivants :

Calibrateur	Concentration (mg/L)	Diamètre de l'anneau (mm)	Diamètre au carré (mm ²)
Haut	450	7,8	60,8
Moyen	270	7,0	49,0
Bas	45	4,1	16,8

Une courbe de calibration a été tracée en utilisant ces résultats :



Un échantillon inconnu, déposé pur comme recommandé donne un anneau d'un diamètre de 6,1mm sur cette plaque. D'après la courbe ci-dessus, cela correspond à une concentration en C1 inhibiteur de 180mg/L. Par conséquent, la concentration en C1 inhibiteur dans l'échantillon est égale à 180mg/L.

10 LIMITES DE LA PROCEDURE

10.1 Pour la procédure 1, les résultats obtenus à partir des diamètres d'anneaux supérieurs à celui du calibrateur pur (9 mm) doivent être considérés comme approximatifs. Pour les procédures 2 et 3, des résultats fiables sont obtenus pour des valeurs comprises entre le calibrateur bas et le calibrateur haut, toute extrapolation en dehors de ces points doit être considérée comme invalide. Les échantillons donnant des résultats en dehors de cette gamme doivent être dilués ou concentrés et retestés (cf. paragraphe 8.3.4).

10.2 Information FDA (USA) – cf. première page.

10.3 PROBLEMES POSSIBLES

Problèmes	Causes probables	Solutions envisagées
A. Pas de diffusion :		
1. Calibrateur	Calibrateur non déposé.	Répéter le test.
2. Echantillon	i) Echantillon non déposé.	Répéter le test.
	ii) Concentration trop haute ou trop basse.	Diluer ou concentrer et répéter le test.
3. Calibrateur et échantillon	Plaques détériorées.	a) Mauvaises conditions de conservation. Répéter test avec nouvelle plaque. b) Vérifier la date de péremption. Répéter test avec nouvelle plaque/kit.
	B. Anneaux de diffusion trop larges :	
1. Calibrateur haut non dilué (Diamètre supérieur à 9,3mm)	i) Mesure inexacte.	Mesurer à l'aide d'une loupe ou d'un lecteur.
	ii) Volume de dépôt incorrect.	Vérifier le volume de dépôt (5µL).
	iii) Volume de dépôt incorrect	a) Mauvais fonctionnement de la pipette – vérifier l'opération et répéter le test. b) Mauvaise technique – répéter le test.
	iv) Evaporation partielle du calibrateur reconstitué lors du stockage	Répéter le test en utilisant un nouveau calibrateur/kit.
	v) Détérioration de la plaque.	a) Mauvais stockage. Répéter le test en utilisant une nouvelle plaque. b) Produit périmé. Répéter le test en utilisant un nouveau kit.
	vi) Déplétion locale en anticorps due à un échantillon voisin trop concentré.	Diluer les échantillons responsables. Refaire les tests en utilisant de nouvelles plaques.
	vii) Température d'incubation trop élevée (voir section 8.6).	Répéter le test à 20-24°C.
2. Echantillons (au-dessus du domaine de mesure acceptable (voir paragraphe 10.1))	i) Concentration trop élevée.	Diluer l'échantillon et répéter le test.
	ii) Volume déposé incorrect.	Vérifier le volume de dépôt (5µL).
C. Anneaux de diffusion trop petits :		
1. Calibrateur haut non dilué (diamètre inférieur à 8,7mm)	i) Mesure inexacte de l'anneau.	} Cf. B1
	ii) Volume de dépôt incorrect.	
	iii) Volume déposé incorrect.	

Problèmes	Causes probables	Solutions envisagées
	iv) Détérioration du calibrateur.	a) Vérifier les conditions de stockage. Répéter le test avec un nouveau calibrateur. b) Produit périmé. Répéter le test en utilisant un nouveau kit.
	v) Température d'incubation trop basse (cf. paragraphe 8.6).	Répéter le test en incubant à 20-24°C.
2. Echantillons (en-dessous du domaine de mesure acceptable – cf. paragraphe 10.1)	i) Concentration trop basse.	Cf. paragraphe 8.3.4 et répéter le test.
	ii) Volume déposé incorrect.	Vérifier le volume déposé 5µL.
D. Anneaux de diffusion doubles ou multiples	i) Précipitation non spécifique autour du puits (due au PEG contenu dans le gel).	Mesurer l'anneau extérieur.
	ii) Mauvaise application de l'échantillon.	Répéter le test.
	iii) Détérioration du calibrateur.	a) Mauvais stockage. Répéter le test avec un nouveau calibrateur. b) Produit périmé. Répéter le test avec un nouveau kit.
	iv) Détérioration de l'échantillon.	Répéter le test en utilisant un échantillon fraîchement prélevé.
E. Anneaux de diffusion non circulaires	i) Mauvais dépôt de l'échantillon.	Répéter le test.
	ii) Gel desséché avant utilisation.	a) Mauvais stockage. Répéter le test avec une nouvelle plaque. b) Produit périmé. Répéter le test en utilisant une nouvelle plaque/kit.
	iii) Gel desséché durant les dépôts et l'incubation.	Refaire le test avec une nouvelle plaque en réduisant le temps d'exposition de la plaque à l'air. Incuber avec le couvercle bien fermé dans une chambre humide ou dans l'étui d'origine.
	iv) Déplétion locale en anticorps due à un échantillon voisin trop concentré.	Diluer l'échantillon en cause et répéter le test.
F. Gel trouble	i) Plaque congelée.	Répéter le test en utilisant une nouvelle plaque. Vérifier les conditions de stockage.
	ii) Gel desséché avant utilisation.	Cf. E (ii) ci-dessus.
	iii) Gel desséché durant les dépôts et l'incubation.	Cf. E (iii) ci-dessus.
G. Gel piqué, pâle	Plaque congelée.	Répéter le test en utilisant une nouvelle plaque. Vérifier les conditions de stockage.
H. Mauvaise courbe de calibration :		
1. Courbe non linéaire (procédure 2).	i) Diffusion incomplète.	Incuber 24h supplémentaires et mesurer à nouveau les anneaux.
	ii) Taille des calibrateurs en-dessous ou au-dessus de l'intervalle.	Cf. B1 et C1 ci-dessus. (Explications similaires pour les calibrateurs moyen et bas).
	iii) Courbe de calibration mal construite.	Vérifier la construction de la courbe.
2. Intersection avec l'axe des Y en dehors de l'intervalle admis (voir section 9)	i) Taille des calibrateurs en-dessous ou au-dessus de l'intervalle.	Cf. B1 et C1 ci-dessus. (Explications similaires pour les calibrateurs moyen et bas.)
	ii) Courbe de calibration mal construite.	Vérifier la construction de la courbe.

10.4 Un diagnostic ne peut être fait et un traitement ne peut être initié uniquement sur la base des mesures en C1 inhibiteur. L'histoire clinique ainsi que d'autres résultats de laboratoire doivent être pris en considération.

10.5 Si un résultat inattendu est obtenu, le test doit être répété avec un sérum frais.

Si un problème ne peut être résolu, se référer au fournisseur.

11 VALEURS ATTENDUES

Les résultats suivants ont été obtenus en utilisant ce coffret :

	Moy. (mg/l)	DS (n-1)	Médiane (mg/L)	Gamme 95 percentile (mg/L)	Nb d'échantillons
C1 inhibiteur	266	38	261	195-345	86

Les données fournies ci-dessus ont été obtenues à partir d'un nombre limité de sérums de donneurs de sang anglais. Ces données ne sont fournies qu'à titre indicatif. Des taux sériques réduits de C1 inhibiteur (souvent inférieurs à 30% des taux normaux) sont associés à des angiodèmes héréditaires (type 1). Il est fortement conseillé que chaque utilisateur établisse ses propres normes de concentrations en C1 inhibiteur d'après ses données cliniques.

12 PERFORMANCES

12.1 Précision

La précision (répétabilité) du coffret est exprimée en moyenne et en pourcentage du coefficient de variation (CV) qui a été déterminé en utilisant des préparations de sérum humain contenant des concentrations faibles, moyennes ou élevées en C1 inhibiteur. Toutes ces analyses ont été réalisées dans notre laboratoire. Chaque valeur a été obtenue à partir de 10 mesures (déterminations en double sur 5 plaques distinctes d'un même lot). Pour les procédures 1 et 2, les anneaux ont été mesurés après 72 heures. Pour la procédure 3, le diamètre des anneaux a été lu après 18 heures.

Échantillons	Procédure 1		Procédure 2		Procédure 3	
	Conc moy. (mg/L)	Cv	Conc moy. (mg/L)	Cv	Conc moy. (mg/L)	Cv
C1 inhibiteur						
Haut	387	2,0%	411	2,2%	402	2,6%
Moyen	231	2,6%	244	3,5%	250	3,1%
Bas	82	6,1%	80	6,8%	91	5,8%

12.2 Variations intra-plaque et inter-lot

La variation intra-plaque est exprimée par la moyenne +/- la déviation standard du CV fait en utilisant 3 plaques de lots différents. Six mesures ont été réalisées par plaque, en utilisant un pool de sérum humain comme échantillon.

La variation inter-lot est exprimée par le CV des valeurs moyennes du diamètre. Le diamètre moyen de chaque lot a été calculé en utilisant le diamètre de l'anneau au point final de diffusion pour un pool de sérum humain comme échantillon, déposé sur 3 plaques de chaque lot (6 mesures d'anneaux par plaque).

C1 inhibiteur	Variation inter-plaque		Variation inter-lot	
	Moyenne du CV en % ± DS		CV en (%)	
C1 inhibiteur	0,92 +/- 0,09 (N=3)		0,82 (N=3)	

13 BIBLIOGRAPHIE

- Protein Reference Unit Handbook of Clinical Immuno Chemistry (1990) Ed. A Milford Ward, Publ. PRU Publications, Sheffield, 161-162.
- Sjoholm, AG. (1990). Inherited complement deficiency states: implications for immunity and immunological disease. *APMIS* **98**, 861-874.
- Cooper, NR (1985). The Classical complement pathway; Activation and regulations of the first complement component. *Adv, immunol.* **37**, 151-216.
- Fahey, JL & McKelvey, EM (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), Amsterdam, Elsevier Publishing Co., P370.
- Mancini, G, Carbonara, A O et al (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem*, **2**, 235-254.

14 RESUME DE LA PROCEDURE

- Choisir la procédure 1, 2 ou 3. La procédure 3 doit être utilisée si des résultats sont requis rapidement.
- Préparer les dilutions des échantillons; ceci est requis uniquement pour les échantillons ayant des concentrations connues élevées en C1 inhibiteur.
- Laisser la condensation s'évaporer des plaques.
- Déposer les calibrateurs, contrôles et échantillons en volumes de 5µL par puits.
- Remplacer le couvercle et incuber à température ambiante (approximativement 20-24°C) pour une période fixée (minimum 18 heures) (procédure 3) ou jusqu'à diffusion complète (minimum 72 heures) (procédures 1 et 2).
- Mesurer le diamètre des anneaux.
- Lire les résultats sur la table de référence (procédure 1) ou tracer une courbe de calibration et lire les résultats (procédures 2 et 3).

Table de référence IDR pour C1 inhibiteur humain
Concentration en mg/L

Diamètre de l'anneau (mm)	Conc.
4.0	38.0
4.1	43.2
4.2	48.4
4.3	53.8
4.4	59.3
4.5	65.0
4.6	70.7
4.7	76.6
4.8	82.6
4.9	88.8
5.0	95.0
5.1	102
5.2	108
5.3	115
5.4	121
5.5	128
5.6	135
5.7	142
5.8	149
5.9	157
6.0	164
6.1	173
6.2	181
6.3	189
6.4	196
6.5	205
6.6	213
6.7	221
6.8	230
6.9	238
7.0	247
7.1	256
7.2	265
7.3	274
7.4	284
7.5	294
7.6	303
7.7	313
7.8	322
7.9	332
8.0	342
8.1	352
8.2	363
8.3	373
8.4	383
8.5	395
8.6	406
8.7	417
8.8	428
8.9	439
9.0	450
9.1	461
9.2	473
9.3	484
9.4	496
9.5	508
9.6	521
9.7	533
9.8	545
9.9	558
10.0	570
10.1	583
10.2	596
10.3	609
10.4	623
10.5	636
10.6	649
10.7	662
10.8	676
10.9	690
11.0	703

Note : Les valeurs ci-dessus sont valables pour des échantillons purs déposés en volumes de 5µL. Le calibre haut doit donner un diamètre de $9,0 \pm 0,3$ mm à diffusion complète à 20-24°C.

1	Propósito
2	Resumen y explicación
3	Principio del ensayo
4	Reactivos
5	Advertencias
6	Almacenamiento y estabilidad
7	Recolección y preparación de las muestras
8	Metodología
9	Medición del aro y resultados
10	Limitaciones
11	Resultados esperados
12	Características
13	Bibliografía
14	Resumen del protocolo
15	Tabla de referencia IDR

KIT IMMUNODIFUSIÓN RADIAL BINDARID™ C1 INACTIVADOR HUMANO

Spanish

Sólo para el diagnóstico *in vitro*

Código de producto: RN019.3

BINDARID™ es una marca de The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK

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 4º 3ª, 08006 Barcelona
Teléfono 902027750
Fax: 902027752
e-mail: info@bindingsite.es
web: www.bindingsite.es



1 PROPÓSITO

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

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El inactivador C1 es un miembro de la familia de serpinas inhibidoras de la serín proteasa. Ésta fija covalentemente a los componentes C1r y C1s activados liberando un complejo C1r:C1s:inactivador C1, reduciendo la división de C4 y C2. Asimismo el inactivador C1 regula algunas proteínas del proceso de coagulación de la vía fibrinolítica.

La deficiencia de inactivador C1 es el defecto de complemento más común y es la causa del angiodema hereditario (incremento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos resultando hinchazón de los tejidos). Existen dos tipos: en el tipo I, la cantidad de inactivador C1 funcionalmente activo está reducida. En el tipo II, la concentración del inactivador C1 funcionalmente inactivo es normal o incluso elevado. Una deficiencia del inactivador C1 adquirida es muy escasa y todos los casos conocidos hasta ahora fueron causados por linfomas o mielomas (refs 1-3).

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. 4) y de Mancini *et al* (refs 5 & 6).

3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

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 correspondiente. Bajo unas condiciones adecuadas se formarán complejos anticuerpo-antígeno formando un aro de precipitación. El tamaño del aro irá creciendo hasta alcanzar un equilibrio entre la formación y la desaparición de estos complejos. Alcanzado este punto, existe una relación lineal entre el cuadrado del diámetro del aro y la concentración de antígeno. Midiendo los diámetros de aro en un número determinado de muestras de concentración conocida, puede hacerse una curva de calibración. La concentración de antígeno en una muestra desconocida, se determina midiendo el diámetro del aro y comparando con la curva de calibración.

Hay tres formas diferentes de proceder con estos kits (ver Sección 8.4). Los procedimientos UNO y DOS requieren la medición de los aros a punto final. Para el procedimiento DOS existe una curva de calibración, mientras que para el UNO existe una tabla de referencias (basada en la curva de calibración lineal ideal), las cuales convierten los diámetros de los aros directamente en concentración de proteínas. Utilizando el procedimiento TRES, los diámetros de los aros se miden antes del punto final. La curva de calibración no es lineal.

4 REACTIVOS

- 4.1 Placas RID (envasadas en sobres herméticos): Estas contienen anticuerpos monoespecíficos contra C1r humano en gel de agarosa. Pueden realizarse hasta catorce (14) muestras en una pasada (incluyendo calibradores). Conservantes: azida sódica 0,099%, ácido E-amino-n-caproico (EACA) 0,1%, benzamidina 0,01%.
- 4.2 Calibradores. Estos se suministran en forma líquida estable con tres concentraciones: alta, media y baja del C1 inactivador. Las concentraciones de inactivador C1 declaradas en la etiqueta de los viales se han obtenido por comparación con un kit estándar disponible en el mercado; sin embargo por falta de acuerdo internacional no se puede garantizar la precisión de este kit estándar. Conservantes: azida sódica 0,099%, EACA 0,1%, benzamidina 0,01%.
- 4.3 Suero de albúmina bovina 7% (BSA) - solución. Se suministra en forma líquida estable para el uso como diluyente. Conservantes: azida sódica 0,099%, EACA 0,1%, benzamidina 0,01%.
- 4.4 Suero control. Se suministra en forma líquida. La concentración del C1 inactivador esperado se indica en la etiqueta del vial. Conservantes: azida sódica 0,099%, EACA 0,1%, benzamidina 0,01%.

5 ADVERTENCIAS

Las muestras han sido examinadas y 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 solo el personal adecuadamente instruido deberá efectuar el test.

Las placas, los calibradores, el control y el BSA contienen 0,099% de azida sódica como conservante y deben tratarse según las medidas de seguridad correspondientes. Debe evitarse tanto la ingestión 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 mezclar reactivos con diferentes números de lote ni utilizar conjuntamente. 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 RID deben guardarse entre 2 y 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 calibradores y controles no abiertos se deben guardar entre 2 y 8°C. Una vez reconstituidos son estables durante al menos una semana a una temperatura entre 2 y 8°C. Para un almacenamiento más largo, deberán ser alicuotados y congelados. Todos los demás reactivos deben almacenarse entre 2 y 8°C.

7 RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para este análisis se pueden usar muestras de suero fresco o congelado a -20°C o a temperaturas inferiores. No utilizar muestras contaminadas microbiológicamente, ni hemolizadas ni muy lipémicas, ni tampoco aquellas muestras que contengan partículas en suspensión. Las muestras de sangre se obtendrán por punción en vena, dejando coagular de forma natural y separando el suero cuanto antes para prevenir la hemólisis. El suero puede almacenarse a 2-8°C durante 48 horas antes de analizarlo. Para almacenar por más tiempo se puede alicuotar y conservar a -20°C o menos. Deben evitarse repetidas congelaciones y descongelaciones.

El BSA incluido en el kit puede utilizarse como diluyente en caso de necesidad; de este modo se mantiene la viscosidad del material. Por tanto los resultados serán comparables a los de los calibradores que tienen una viscosidad parecida al plasma normal.

8 METODOLOGÍA

(Hay un resumen del procedimiento completo al final de las instrucciones.)

8.1 Contenido

- 8.1.1 3 x *Human C1 Inactivator NL Bindarid* (Inactivador C1 humano Bindarid, inmunodifusión radial embolsadas en un envoltorio de aluminio)
- 8.1.2 8 x *Gel dividers* (Partidores de gel)
- 8.1.3 3 x *Human C1 Inactivator NL Calibrator* (Calibradores líquidos)
- 8.1.4 1 x 5mL 7% BSA (Solución BSA 7%)
- 8.1.5 1 x *Human C1 Inactivator NL Control Serum* (Suero control, líquido)
- 8.1.6 1 x folleto de instrucciones, incluye tabla de referencia RID

8.2 Materiales necesarios 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 dilución de las muestras y 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 un digital RID plate reader (lector digital de microplacas RID, Artículo AD400) para un aumento y medición exacta del diámetro del aro precipitado, hasta 0,1mm.
- 8.2.5 Papel milimetrado.

8.3 Preparación de los reactivos

8.3.4 Placas 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. 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 o el transporte (p.ej. grietas en el gel). Abrir la tapa y dejar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos (o, si necesario, más tiempo) para permitir la evaporación de la condensación en los pocillos o sobre el gel. ¡No pipetear 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 una parte de la placa o para la medición de muestras con sospecha de una concentración elevada. Estas muestras podrían difundirse ampliamente, resultando en una reducción de anticuerpos en otras partes de la placa. 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 y utilizar dentro de las siguientes 4 semanas.

8.3.5 Calibradores

Los calibradores están prediluidos y deben mezclarse con cuidado antes de usar. Deben ser aplicados directamente. Los calibradores medio y bajo solo deberán usarse cuando se requiera una curva de calibración – método DOS Y TRES.

8.3.6 Control

El suero control líquido se debe aplicar en las placas sin diluir, mezclar con cuidado antes del uso.

8.3.4 Muestras

Las muestras normalmente no requieren dilución. Sin embargo algunas pueden contener niveles muy elevados C1 inactivador y puede que sea necesaria una dilución antes de dispensar las muestras. En estos casos, se recomienda utilizar un volumen de muestra de 20µL y mezclarlo con el volumen necesario de BSA. Para muestras que contengan concentraciones de C1 inactivador por debajo del nivel de detección de la placa, se recomienda lo siguiente:

- Concentrar la muestra
- Realizar un doble llenado del pocillo (ver Sección 8.5)

8.4 Procedimientos

8.4.4 Procedimiento UNO: Tabla de referencias RID

Este método no requiere la construcción de una curva de calibración. Las concentraciones correspondientes a cada diámetro de aro se leen directamente en la Tabla de referencias RID. Se deja desarrollar el aro a conclusión, lo cual requiere un tiempo mínimo de 72 horas. Para comprobar el correcto funcionamiento, se dispensa el calibrador sin diluir en cada placa.

8.4.5 Procedimiento DOS: Curva de calibración a conclusión

En este método se usan los tres calibradores para confeccionar una curva lineal de calibración. Los aros deben dejarse desarrollar a conclusión, lo cual requerirá un tiempo mínimo de difusión de 72 horas. Para ahorrar pocillos, la curva estándar se puede emplear para varias placas de un mismo lote utilizadas simultáneamente. En este caso el calibrador sin diluir debería determinarse en cada placa para comprobar el correcto funcionamiento.

8.4.6 Procedimiento TRES: Curva de calibración previa a punto final

En este método se utilizan los tres calibradores para confeccionar una curva de calibración que es no-lineal, al medirse los aros antes de la conclusión. El tiempo mínimo de difusión se recomienda que sea 18 horas. Debe realizarse una curva de calibración para cada placa utilizada.

8.5 Aplicación de los calibradores y de las muestras

Los calibradores, el control y las muestras deberán mezclarse delicadamente antes de la aplicación. Llenar el número de pocillos necesario con 5µL de calibrador sin diluir usando una micropipeta. Si va a seguirse el Procedimiento DOS o TRES, llenar también con los calibradores medio y bajo. Los pocillos restantes se llenarán con 5µL de muestras diluidas adecuadamente y de control. No deben dejarse las placas abiertas por largos periodos durante la aplicación de calibradores y muestras, ya que podría provocar que el gel se seque.

Nota: Si se espera de una muestra una concentración baja de C1 inactivador, se puede rellenar dos veces el pocillo. Se rellena el pocillo primero con 5µL de muestra y se deja difundir totalmente en el gel, lo que puede durar unos 30 minutos. Se recomienda dejar la tapa en su sitio durante este proceso. Entonces se puede realizar una segunda carga (otra vez usando 5µL) e incubar la placa como habitualmente. Los resultados obtenidos deberán corregirse para el doble volumen y serán menos precisos que los obtenidos por el proceso de carga simple.

8.6 Incubación

Tras la aplicación de las muestras se debe cerrar la tapa e incubar la placa en una superficie plana 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 cerrada con toallitas húmedas). El tiempo de incubación mínimo para el Procedimiento TRES es de 18 horas y para la difusión completa (Procedimientos UNO y DOS) es de 72 horas. El diámetro final del aro puede verse afectado por la temperatura. El tamaño esperado para el calibrador sin diluir es de 9,0mm (±0,3mm) cuando se incuba a 20-24°C. Se deben evitar temperaturas extremas.

8.7 Control de calidad

El control debería tratarse igual que las muestras. Los valores obtenidos para el control deben estar entre ±10% de la concentración indicada en la etiqueta del vial.

9 MEDICIÓN DEL ARO Y RESULTADOS

Tras el tiempo de difusión requerido, los diámetros de aro deben medirse con una precisión de 0,1mm, mediante una lupa de joyero o un lector RID. Cuando se utilice la lupa de joyero usar una luz brillante lateral y fondo oscuro. En caso de tener dificultades, ver la placa macroscópicamente y marcar los bordes del aro detrás de la placa con una aguja. De esta forma se puede medir más fácilmente la distancia entre estas marcas.

Nota: Para los procedimientos UNO y DOS se deben desarrollar los aros a conclusión. Si existe cualquier duda, deberían medirse de nuevo los diámetros al cabo de 24 horas y asegurarse de que no hayan aumentado. El calibrador sin diluir debe dar un diámetro de aro de 9,0mm ± 0,3mm a conclusión. Si el diámetro del aro está fuera de este rango, ver RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS (Sección 10.3). No se recomienda medir los aros a más de una semana tras la conclusión.

Procedimiento UNO

Leer la concentración de C1 inactivador en las muestras directamente de la tabla de referencia RID, **siempre que se hayan aplicado sin diluir, según lo recomendado.**

Las concentraciones de las muestras cuyo diámetro de aro sea mayor que el del calibrador sin diluir, deberán considerarse tan sólo como aproximadas, ya que existe la posibilidad de que no hayan difundido a la totalidad. Tales muestras también pueden inducir una reducción local de anticuerpos, afectando al tamaño de los aros adyacentes. Estas muestras se deberían diluir y volver a testar. Las muestras cuyo diámetro de aro sea inferior al límite más bajo de la tabla de referencia RID se deberían volver a testar más concentradas (ver Sección 8.3.4). Cualquier variación en la dilución recomendada de la muestra (sin diluir) se deberá tener en cuenta para calcular el resultado.

Ejemplo:

Muestra	Dilución	Diámetro de aro (mm)	Valor tabla (mg/L)	Concentración original muestra (mg/L)
Inactivador C1 Suero A	Sin diluir	6,4	196	196
Inactivador C1 Suero B	Sin diluir	>11	>703	>703
Inactivador C1 Suero B (Repetir)	1/2	8,6	406	812*

* Calculado como sigue: Valor tabla x Dilución recomendada/Dilución actual.
P.ej: 406mg/L x 1/(1/2).

Procedimiento DOS

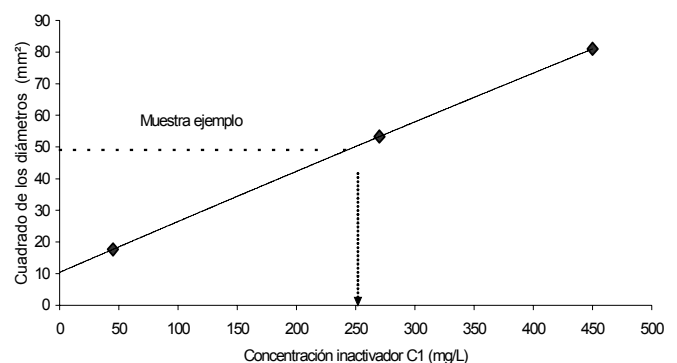
Representar gráficamente el cuadrado del diámetro de los aros de precipitación formados por las tres concentraciones de los calibradores, contra las concentraciones de inactivador C1 correspondientes (indicadas en la etiqueta del vial). Las concentraciones de inactivador C1 se trazan en el eje horizontal (x) y los cuadrados de los diámetros de aro en el eje vertical (y). Como curva se escoge la mejor conexión posible de estos tres puntos. El punto de intersección con el eje "y" deberá ser de 10-12mm². La concentración de inactivador C1 se determina por la curva de calibración; recordar posibles diluciones empleadas y ajustar correspondientemente.

Cálculo de la muestra:

Los tres calibradores de inactivador C1 dan los siguientes diámetros de aro en un test de inactivador C1 a conclusión:

Calibrador	Conc. (mg/L)	Diámetro (D) del aro (mm)	D cuadrado (mm ²)
Alto	450	9,0	81,0
Medio	270	7,3	53,3
Bajo	45	4,1	16,8

La curva de calibración se dibujó utilizando estos resultados:



Una muestra desconocida, dispensada sin diluir como se recomienda, da un aro de 7,0mm en esta placa. A partir de la curva arriba, esto corresponde a una concentración de inactivador C1 de 240mg/L. Por lo tanto, la concentración de inactivador C1 en la muestra sin diluir = 240mg/L.

Procedimiento TRES

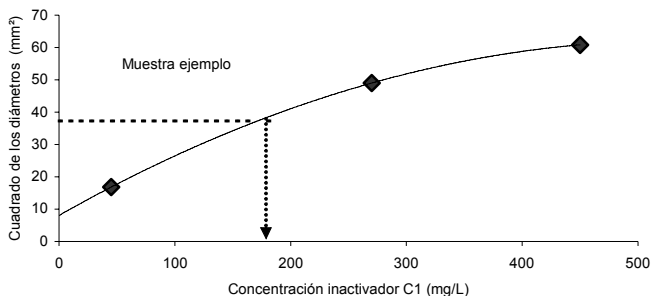
Trazar la curva de calibración según el método DOS. No se obtiene una línea recta pero si una curva, el gradiente de la cual decrece según aumenta la concentración de proteínas. El punto de intersección del eje "y" debe ser como el del método DOS. Las concentraciones se leen de la curva de calibración; recordar posibles diluciones empleadas y ajustar correspondientemente.

Cálculo de la muestra:

Los tres calibradores de inactivador C1 dan los siguientes diámetros de aro en una placa para inactivador C1 después de 18 horas de difusión:

Calibrador	Concn. (mg/L)	Diámetro (D) del aro (mm)	D cuadrado (mm ²)
Alto	450	7,8	60,8
Medio	270	7,0	49,0
Bajo	45	4,1	16,8

La curva de calibración se dibujó utilizando estos resultados:



Una muestra desconocida, dispensada sin diluir como se recomienda, da un aro de 6,1mm en esta placa. A partir de la curva, esto corresponde a una concentración de inactivador C1 de 180mg/L. Por lo tanto, la concentración de inactivador C1 en la muestra sin diluir = 180mg/L.

10 LIMITACIONES

10.1 Para el método UNO, los resultados obtenidos con diámetros de aro mayores que los del calibrador sin diluir (9mm) son sólo aproximados (ver Sección 9). Los resultados para los métodos DOS y TRES están limitados por el trazado correcto de la curva estándar (entre el calibrador sin diluir y el bajo). Una extrapolación fuera de estos puntos no es válida. Muestras con resultados fuera de estos rangos deben ser testadas de nuevo con una dilución o concentración adecuada (ver Sección 8.3.4).

10.2 **FDA (USA) Advertencia:** ver la primera página de la metódica en inglés.

10.3 RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible(s) causa(s)	Sugerencia(s)
A. No hay aro para:		
1. Calibrador(es)	Omisión del calibrador.	Repetir la prueba.
2. Muestra	i) Omisión de la muestra.	Repetir la prueba.
	ii) Concentración demasiado alta/baja.	Diluir / concentrar y repetir la prueba.
3. Calibrador(es) y muestras	Deterioro placa.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir la prueba con placa nueva.
		b) Producto caducado. Repetir la prueba con nueva placa o kit.
B. Aros demasiado grandes para:		
1. Calibrador sin diluir (más de 9,3mm)	i) Medición inexacta del aro.	Medir de nuevo con lupa o con el lector RID.
	ii) Aplicación de volumen incorrecto.	Verificar si se ha aplicado el volumen de 5µL.
	iii) Aplicación de volumen inexacto.	a) Malfuncionamiento de la micropipeta – verificar funcionamiento y repetir la prueba. b) Error de procedimiento – Repetir la prueba.
	iv) Evaporación parcial del calibrador durante el almacenamiento.	Repetir prueba con nuevo calibrador/kit.
	v) Deterioro placa.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir prueba con placa nueva.
		b) Producto caducado. Repetir con un kit nuevo.
	vi) Reducción local de anticuerpos por concentración demasiado alta en muestras adyacentes.	Diluir las muestras "problemáticas" y repetir usando una nueva placa.
vii) Temperatura de incubación demasiado elevada (ver Sección 8.6).	Repetir prueba incubando a 20-24°C.	

Problema	Posible(s) causa(s)	Sugerencia(s)
2. Resultados de muestras por encima del rango aceptable (ver Sección 10.1)	i) Concentración demasiado alta.	Diluir y repetir la prueba.
	ii) Aplicación de volúmenes incorrectos.	Verificar si se ha aplicado el volumen de 5µL.
C. Aros demasiado pequeños para:		
1. Calibrador sin diluir (menos de 8,7mm)	i) Medición inexacta del aro.	} Ver B1
	ii) Volumen aplicado incorrecto.	
	iii) Volumen aplicado inexacto.	
	iv) Deterioro del calibrador/control.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir con calibrador/control nuevo.
	v) Temperatura de incubación demasiado baja (ver Sección 8.6).	b) Producto caducado. Repetir con un kit nuevo. Repetir prueba incubando a 20-24°C.
2. Muestras (por debajo del rango aceptable – ver sección 10.1)	i) Concentración demasiado baja.	Ver Sección 8.3.4 y repetir la prueba.
	ii) Aplicación de volumen incorrecto.	Verificar si se ha aplicado el volumen de 5µL.
D. Aros dobles / múltiples	i) Precipitación no específica cerca del pocillo (motivo: PEG en el gel).	Leer aro exterior.
	ii) Error en el procedimiento.	Repetir prueba.
	iii) Deterioro calibrador.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir prueba con calibrador nuevo.
		b) Producto caducado. Repetir prueba con nuevo kit.
iv) Deterioro muestra.	Repetir prueba con muestra reciente.	
E. Aros no circulares	i) Error en el procedimiento.	Repetir prueba.
	ii) Gel se ha secado antes del empleo.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir prueba con placa nueva.
		b) Producto caducado. Repetir prueba con nueva placa/kit.
	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 de aluminio.
	iv) Reducción de anticuerpos locales por concentración demasiado alta en la muestra.	Diluir muestras y repetir prueba.
F. Gel turbio	i) La placa ha sido congelada.	Repetir prueba con placas correctamente almacenadas.
	ii) Gel se ha secado antes del uso.	Ver E(ii).
	iii) Gel se ha secado durante la aplicación de la muestra o durante la incubación.	Ver E(iii).
G. Gel quebradizo y no nivelado	La placa ha sido congelada.	Repetir prueba con placas correctamente almacenadas.
H. Curva de calibración deficiente:		
1. Curva no lineal (método DOS)	i) Difusión incompleta.	Incubar durante otras 24 horas y volver a medir los aros.
	ii) Aros del calibrador demasiado pequeños/grandes.	Ver B1 o C1. (Explicaciones similares para calibradores medio y bajo.)
	iii) Curva de calibración mal trazada.	Verificar trazado curva de calibración.
2. Intersección del eje y fuera de rango (Sección 9)	i) Aros del calibrador demasiado pequeños/grandes.	Ver B1 o C1. (Explicaciones similares para calibradores medio y bajo.)
	ii) Curva de calibración mal trazada.	Verificar trazado curva de calibración.

10.4 El diagnóstico y el tratamiento no deben basarse sólo en la cuantificación de C1 inactivador. Se deben tener en cuenta el historial así como otras pruebas clínicas.

10.5 En caso de obtener unos resultados inesperados, se deberá repetir la prueba con una muestra nueva.

Si el problema persiste, por favor dirijase al proveedor.

11 RESULTADOS ESPERADOS

Utilizando este kit se han obtenido las siguientes concentraciones plasmáticas de fibrinógeno:

	Media (mg/L)	SD (n-1)	Valor medio (mg/L)	Rango 95 percentil (mg/L)	No de muestras
C1 Inactivador	266	38	261	195-345	86

Los resultados antes indicados se obtuvieron de un colectivo normal de donantes y del Reino Unido solo son orientativos. Niveles bajos de inactivador C1 está asociado con angiodema hereditario (tipo 1) bajando muchas veces a menos del 30%. Se recomienda encarecidamente se determinen, a ser posible, rangos normales locales.

12 CARACTERISTICAS

12.1 Precisión

La precisión (repetitividad) de este kit se expresa como la media y el valor de coeficiente de variación (CV). El Coeficiente de variación se determina por medición de Pool de sueros que contienen concentraciones altas, medias y bajas de concentraciones de inactivador C1. Todos los análisis se realizaron en el laboratorio de Binding Site Limited, Birmingham (GB). A no ser que se indique lo contrario, se determinaron los valores mediante 10 mediciones (determinaciones dobles sobre 5 placas RID diferentes de un mismo lote normal). Para los métodos UNO y DOS se midieron los diámetros de aro tras 72 horas y para el método TRES, tras 18 horas.

Pool de muestras	Procedimiento UNO		Procedimiento DOS		Procedimiento TRES	
	Conc. media (mg/L)	CV	Conc. media (mg/L)	CV	Conc. media (mg/L)	CV
Inact. C1						
Sin diluir	387	2,0%	411	2,2%	402	2,6%
Medio	231	2,6%	244	3,5%	250	3,1%
Bajo	82	6,1%	80	6,8%	91	5,8%

12.2 Variación intra-placa e inter-lote

La variación dentro de la placa se expresa como la media ± de la desviación estándar (SD) de determinaciones de CV usando 3 placas de lotes diferentes. Se realizaron 6 mediciones por cada placa utilizando suero humano de un pool de plasma humano como muestra.

La variación inter-serie se expresa como el CV de la media de los diámetros obtenidos de un pool de plasma humano como muestra utilizando placas de lotes recientes. La concentración media de cada serie (6 mediciones de aro por placa).

Inactivador C1	Variación intra-placa	Variación inter-lote
	Mean CV % ± SD	CV %
	0,92 ± 0,09 (N=3)	0,82 (N=3)

13 BIBLIOGRAFÍA

13.1 Protein Reference Unit Handbook of Clinical Immuno Chemistry (1990) Ed. A Milford Ward, Publ. PRU Publications, Sheffield, 161-162.
 13.2 Sjöholm, AG. (1990). Inherited complement deficiency states: implications for immunity and immunological disease. *APMIS* **98**, 861-874.
 13.3 Cooper, NR (1985). The Classical complement pathway; Activation and regulations of the first complement component. *Adv. immunol.* **37**, 151-216.
 13.4 Fahey, JL & McKelvey, EM (1965). Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.* **94**, 84-90.
 13.5 Mancini, G, Vaerman, J P et al. (1964). Protides of the biological fluids (XI colloquium). Peters H. (ed), Amsterdam, Elsevier Publishing Co., P370.
 13.6 Mancini, G, Carbonara, A O et al (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem*, **2**, 235-254.

14 RESUMEN DEL PROTOCOLO

- 14.1 Seleccionar el procedimiento UNO, DOS o TRES. El procedimiento TRES se debe usar si se necesitan resultados urgentes.
- 14.2 Preparar las diluciones de las muestras (necesarias sólo si se conoce que la concentración de inactivador C1 en la muestra es muy elevada).
- 14.3 Dejar que la condensación de las placas RID evapore.
- 14.4 Dispensar calibrador(es), control y muestras en las placas RID. El volumen a dispensar es de 5µL.
- 14.5 Tapar de nuevo la placa e incubar a temperatura ambiente (aproximadamente 20-24°C) por un tiempo determinado (mínimo 18 horas) (Procedimiento TRES) o hasta que los aros se hayan completado (mínimo 72 horas) (Procedimiento UNO y DOS).
- 14.6 Medir el diámetro de los aros.
- 14.7 Leer los resultados en la tabla de referencia RID (Procedimiento UNO) o dibujar la curva de calibración y leer los resultados (Procedimientos DOS y TRES).

Tabla de referencias RID para inactivador C1 humano
Concentraciones en mg/L

Diámetro de aro (mm)	Conc.
4.0	38.0
4.1	43.2
4.2	48.4
4.3	53.8
4.4	59.3
4.5	65.0
4.6	70.7
4.7	76.6
4.8	82.6
4.9	88.8
5.0	95.0
5.1	102
5.2	108
5.3	115
5.4	121
5.5	128
5.6	135
5.7	142
5.8	149
5.9	157
6.0	164
6.1	173
6.2	181
6.3	189
6.4	196
6.5	205
6.6	213
6.7	221
6.8	230
6.9	238
7.0	247
7.1	256
7.2	265
7.3	274
7.4	284
7.5	294
7.6	303
7.7	313
7.8	322
7.9	332
8.0	342
8.1	352
8.2	363
8.3	373
8.4	383
8.5	395
8.6	406
8.7	417
8.8	428
8.9	439
9.0	450
9.1	461
9.2	473
9.3	484
9.4	496
9.5	508
9.6	521
9.7	533
9.8	545
9.9	558
10.0	570
10.1	583
10.2	596
10.3	609
10.4	623
10.5	636
10.6	649
10.7	662
10.8	676
10.9	690
11.0	703

Nota: Los valores antes citados corresponden a muestras sin diluir con un volumen de 5µL. El diámetro de aro del calibrador sin diluir debe dar un diámetro de aro a punto final de 9,0 ± 0,3mm con una temperatura de incubación de 20-24°C.