

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 COMPLEMENT C1q BINDARID™ RADIAL IMMUNODIFFUSION KIT

For *in vitro* diagnostic use only

Product code: RN020.3

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

Product manufactured by:

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

Telephone: +44 (0) 121 436 1000

Fax: +44 (0) 121 430 7061

e-mail: info@bindingsite.co.uk

FDA (USA) Information

Analyte ID Code: 1064

Test System ID Code: 61073

Complexity Cat: High



1 INTENDED USE

This kit is intended for measuring human C1q in serum as an aid in the diagnosis and treatment of systemic lupus erythematosus (SLE).

2 SUMMARY AND EXPLANATION

C1q is a 400kD hexameric gamma-2 protein that is a subunit of C1, the first component of complement. The binding of two or more of C1q's six globular domains initiates the classical pathway of complement activation. C1q binds readily to the CH2 domains of aggregated IgG molecules in an immune complex or the CH3 domains of a single IgM molecule whose conformation has been altered following antigen binding. It can also bind directly to certain micro-organisms and mycoplasmas. The multivalent binding of C1q is believed to lead to a conformational change in the C1q complex, activating C1r then C1s and thereby initiating the classical complement pathway. The collagen-like tail domain of C1q (which is only exposed once C1 inactivator dissociates C1r₂ and C1s₂ from the C1q-activator complex) increases the phagocytosis of particles by monocytes and macrophages. Serum levels of C1q are reduced in immune complex disease, SLE and meningitis. Hereditary deficiency is also known (refs 1-4).

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. 5) and Mancini *et al* (refs. 6 & 7).

3 PRINCIPLE OF THE ASSAY

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 C1q 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% thiomersal (sodium ethylmercurithiosalicylate), 0.01% benzamidine.
- 4.2 Calibrators. These are supplied lyophilised as a set of three containing high, medium and low concentrations of C1q. The concentrations of C1q 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. Preservative: 0.099% sodium azide, 0.1% EACA, 0.01% benzamidine.
- 4.4 Control. This is supplied lyophilised. The expected C1q concentration is marked on the bottle label. Preservatives: 0.099% sodium azide, 0.1% EACA, 0.01% benzamidine.
- 4.5 Distilled water. For reconstituting the lyophilised calibrators and control. Preservative: 0.099% sodium azide.

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 and/or 0.01% thiomersal as a preservative. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. If contact does occur wash with a large volume of water and seek medical advice. On disposal of reagent flush with a large volume of water, to prevent azide build up.

Adherence to the given procedure is recommended. The validity of results obtained using methods other than those stated cannot be guaranteed.

Reagents from different batch numbers of kits are NOT interchangeable. If large numbers of tests are performed, care should be taken to ensure that all reagents are from the same batch.

6 STORAGE AND STABILITY

The unopened kits should be stored at 2-8°C and can be used until the expiry date given on the kit box label. DO NOT FREEZE. The 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 reconstituted they are stable for at least one week at 2-8°C, but for longer storage they should be aliquoted and frozen (-20°C or below). 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 Contents:

- 8.1.1 3 x Human Complement C1q NL Bindarid (radial immunodiffusion plates in foil pouches)
- 8.1.2 8 x Gel Dividers
- 8.1.3 3 x Human C1q NL Calibrator (lyophilised)
- 8.1.4 1 x 5mL 7% BSA Solution
- 8.1.5 1 x Human C1q Control Serum (lyophilised)
- 8.1.6 1 x 5mL Distilled water
- 8.1.7 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, e.g. sample tubes, centrifuge etc.
- 8.2.2 Pipettes for accurate reconstitution of calibrators and control and dilution of samples.
- 8.2.3 Micropipettes for sample application. These should be capable of accurately delivering 10µL volumes. Binding Site Micropipettes (code AD041) or 'Hamilton' syringes are recommended.
- 8.2.4 Jeweller's eyepiece (code AD040) or digital RID plate reader (code 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 dividers 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 Calibrator

The lyophilised calibrators should be reconstituted with the volume of the distilled water indicated on the vial labels – use the distilled water provided in the kit. Before use, all material in the bottle, including any adhering to the bung must be completely dissolved (by inversion) over a minimum period of thirty minutes. The diluted calibrators should be applied to the plates, mixing gently immediately before use. 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 lyophilised control serum should be reconstituted with the volume of distilled water indicated on the vial label. It should be mixed gently by inversion until the contents are completely dissolved. It should then be applied to the plate(s) diluted 1/2 (i.e. 1 part in 2); for this it is recommended that 25µL of control serum is mixed with 25µL of the diluent 7% BSA.

8.3.4 Sample

Samples should be diluted 1/2 (i.e. 1 part in 2) prior to assay. To obtain adequate accuracy it is recommended that 25µL of test sample is mixed with 25µL of the diluent (7% BSA). Samples containing very high levels of C1q may require a higher dilution factor. In such cases

it is suggested that a minimum volume of 25µL of test sample is mixed with the appropriate volume of BSA. For samples having C1q concentrations below the detection limit of the plates, the following is recommended:

- i) Apply the sample undiluted
- ii) Concentrate the sample
- iii) 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 96 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 96 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 42 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 mixed gently immediately before use. Fill the required number of wells with 10µL 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 10µL 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 C1q, a 'double fill' of the well may be made. The well is initially filled with 10µL 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 10µL) 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 42 hours and for complete diffusion (Procedures ONE and TWO) is 96 hours. Final ring diameters may be affected by temperature; the expected ring size for the high calibrator is 8mm (±0.3mm) when incubated at 20-24°C. Extremes of temperature should be avoided.

8.7 Quality control

The control serum should be treated exactly like a test sample, i.e. diluted 1/2. 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 jewellers' 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 8.0mm ±0.3mm at completion. If the ring diameter is outside this range, see Trouble Shooting (Section 10.3).

Procedure ONE

Read the sample concentrations directly from the RID reference table. Concentrations obtained for samples giving ring diameters greater than the high calibrator should be regarded as approximate, due to the possibility of incomplete diffusion; they may also cause local antibody depletion thereby affecting adjacent ring sizes. Such samples 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). **Use of the RID reference table assumes that test samples have been applied diluted 1/2 as recommended; any change from this 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)
C1q serum A	1/2	6.4	115	115
C1q serum B	1/2	>10	>410	>410
C1q serum B (repeat)	1/4	8.0	230	460*

* Calculated as follows: Table value x Recommended Diln./Actual Diln., ie 230mg/L x (1/2)/(1/4). Note: The calibrators provided are prediluted and applied to the plate neat, not diluted 1/2. Therefore a C1q high calibrator (115mg/L) giving an 8.0mm ring is equivalent to an original sample concentration of 115 x 2 = 230mg/L, the RID reference table value.

Procedure TWO

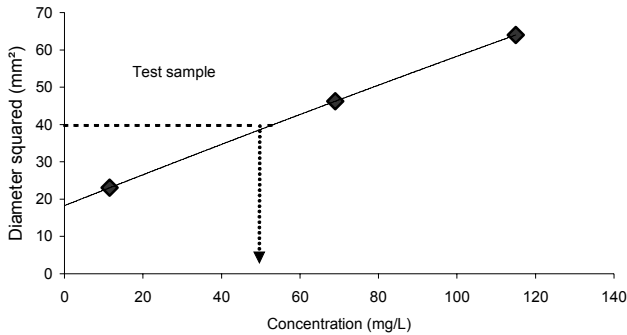
Plot the square of the diameters of the precipitin rings formed by three calibrators versus their C1q concentrations (given on the calibrator vial label). C1q concentrations should be along the horizontal (x) axis, ring diameters squared along the vertical (y) axis. A line of best fit is drawn through the three points; the y-intercept should be in range 17-23mm². The C1q concentration is determined from the calibration curve; remember to adjust the sample concentration obtained by any dilution factor used.

Sample calculation:

C1q calibrators gave the following ring diameters on a C1q test plate at completion:

Calibrator	Conc. (mg/L)	Diameter (D) of ring (mm)	D squared (mm ²)
High	115	8.0	64.0
Medium	69	6.8	46.2
Low	11.5	4.8	23.0

A calibration curve was plotted using these results:



An unknown sample, diluted 1/2 as recommended, gave a 6.3mm diameter ring on this plate. From the above curve, this corresponds to a C1q concentration of 52mg/L. Therefore the C1q concentration in the undiluted sample = 52 x 2 = 104mg/L.

Procedure THREE

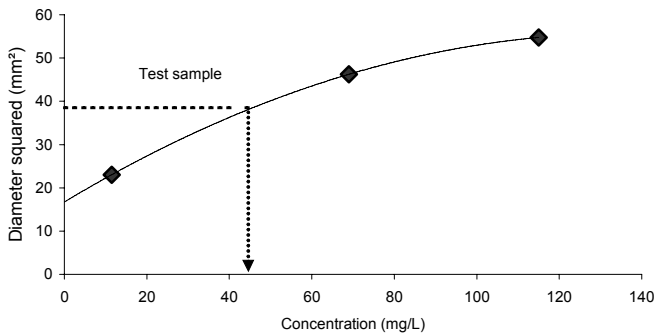
Plot the calibration curve as for procedure TWO. The graph will not be a straight line but a curve, the gradient of which decreases with increasing protein concentration. The y-intercept should be as indicated for Procedure TWO. Test sample protein concentrations are read off the calibration curve; remember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

Sample calculation:

C1q calibrators gave the following ring diameters on a C1q plate after 42 hours:

Calibrator	Conc. (mg/L)	Diameter (D) of ring (mm)	D squared (mm ²)
High	115	7.4	54.8
Medium	69	6.8	46.2
Low	11.5	4.8	23.0

A calibration curve was plotted using these results:



An unknown sample, diluted 1/2 as recommended, gave a 6.2mm ring on this plate. From the above curve, this corresponds to a C1q concentration of 44mg/L. Therefore the C1q concentration in the undiluted sample = 44 x 2 = 88mg/L.

10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

10.1 For Procedure ONE, results generated from ring diameters greater than the high calibrator ring diameter (i.e. 8mm) 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.

Problem	Possible causes(s)	Suggested action(s)
B. Oversize rings for:		
1. High calibrator (more than 8.3mm)	i) Inaccurate ring measurement.	Remeasure using eyepiece or a RID plate reader.
	ii) Incorrect volume applied.	Check 10µL volume applied.
	iii) Inaccurate volume applied.	a) Micropipette malfunction – check operation and repeat assay. b) Poor technique – repeat assay.
	iv) Inaccurate calibrator reconstitution.	a) Pipette malfunction – check operation and calibration, then repeat assay using new calibrator. b) Poor technique – repeat assay using new calibrator.
	v) Partial evaporation of reconstituted calibrator on storage.	Repeat assay using new calibrator/kit.
	vi) Plate deterioration.	a) Storage damage. Repeat assay using new plate. b) Product expired. Repeat assay using new kit.
	vii) Local antibody depletion due to adjacent high concentration test samples.	Dilute the sample(s) responsible and repeat assay using new plate.
	viii) 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 10µL volume applied.
C. Undersized rings for:		
1. High calibrator (less than 7.7mm)	i) Inaccurate ring measurement.	As for B1 above
	ii) Incorrect volume applied.	
	iii) Inaccurate volume applied.	
	iv) Inaccurate calibrator reconstitution	
	v) Calibrator deterioration.	a) Storage damage. Repeat assay using new calibrator. b) Product expired. Repeat assay using new kit.
	vi) 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 10µL 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.
	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 C1q 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 VALUES

The following results were obtained using this kit using individual blood donors.

	No of samples	Mean (mg/L)	Median (mg/L)	Standard deviation	95 percentile Range
Normal males	62	163	155	35	118-238
Normal females	60	158	151	33	118-244
Active SLE	14	117	122	52	33-209
Inactive SLE	17	128	126	28	93-183

The data provided above has been obtained from limited numbers of British blood donors and clinical patients and is intended for guidance purposes only. It is strongly recommended that each user should generate his/her own C1q 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 C1q. 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 96 hours. For Procedure THREE, rings were read after 42 hours.

Sample pool C1q	Procedure 1		Procedure 2		Procedure 3	
	Mean conc. mg/L	CV	Mean conc. mg/L	CV	Mean conc. mg/L	CV
High	191.6	1.76%	189.0	2.23%	178.2	7.62%
Medium	125.7	4.77%	119.2	4.63%	118.0	7.85%
Low	44.96	6.90%	39.59	7.82%	42.55	8.55%

12.2 Within-plate and inter-batch variation:

The within-plate variation is expressed as the mean ± standard deviation of determinations of CV made using 3 plates from separate batches. Six measurements were made per plate, using a human serum pool as the sample.

The inter-batch 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 serum pool as the sample, applied to two plates from each batch (six ring measurements per plate).

C1q	Within-plate variation	Interbatch variation
	Mean CV% ± SD	CV (%)
	0.79 ± 0.16 (N=3)	0.23 (N=3)

15 RID REFERENCE TABLE

RID reference table for human C1q Concentrations in mg/L

Diameter of ring (mm)	Conc.
4.5	11.0
4.6	15.5
4.7	20.2
4.8	25.0
4.9	29.8
5.0	34.8
5.1	39.8
5.2	45.0
5.3	50.2
5.4	55.6
5.5	61.1
5.6	66.6
5.7	72.3
5.8	78.0
5.9	83.9
6.0	89.8
6.1	95.9
6.2	102
6.3	108
6.4	115
6.5	121
6.6	128
6.7	134
6.8	141
6.9	148
7.0	155
7.1	162
7.2	169
7.3	176
7.4	184
7.5	191
7.6	199
7.7	206
7.8	214
7.9	222
8.0	230
8.1	238
8.2	246
8.3	254
8.4	263
8.5	271
8.6	280
8.7	289
8.8	297
8.9	306
9.0	315
9.1	324
9.2	333
9.3	343
9.4	352
9.5	361
9.6	371
9.7	381
9.8	390
9.9	400
10.0	410

Note: The above values assume that test samples are applied diluted 1/2 in 10µL volumes. The high calibrator should give a ring diameter of 8.0 ± 0.3mm at completion when incubated at 20-24°C.

13 BIBLIOGRAPHY

13.1 Cooper, NR, (1985). The classical complement pathway: Activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol.* **37**, 151-216

13.2 Aritaud, GJ *et al* (1987). A functional model of the human C1 complex. *Immunol. Today*, **8**, 106-111

13.3 Ross, SC & Densen, P (1984). Complement deficiency states and infection: Epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine*, **63**, 243-273

13.4 Schifferli, J A *et al* (1986). The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *New Eng. J.* **315**, 488-495

13.5 Fahey, JL & McKelvey, EM (1965). Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.*, **94**, 84-90.

13.6 Mancini, G, Vaerman, J P *et al* (1964). Protides of the biological fluids (XI Colloquium). Peters H. (ed), Amsterdam, Elsevier Publishing Co., p 370.

13.7 Mancini, G, Carbonara, A O *et al* (1965). Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* **2**, 235-254.

14 SUMMARY OF PROCEDURE

- 14.1 Select Procedure ONE, TWO or THREE. Procedure THREE must be used if results are required quickly.
- 14.2 Reconstitute calibrator(s) and control with the distilled water provided.
- 14.3 Prepare 1/2 sample and control dilutions with diluent (7% BSA) provided.
- 14.4 Allow condensation to evaporate from RID plate(s).
- 14.5 Apply calibrator(s), control and samples to RID plate(s) in 10µL volumes.
- 14.6 Replace lid and incubate at room temperature (approximately 20-24°C) for fixed time period (minimum 42 hours) (Procedure THREE) or until rings are complete (minimum 96 hours) (Procedure ONE and TWO).
- 14.7 Measure the ring diameters.
- 14.8 Read results off RID Reference Table (Procedure ONE) or plot calibration curve and read off results (Procedures TWO and THREE).

1	Verwendungszweck
2	Einleitung
3	Testprinzip
4	Reagenzien
5	Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen
6	Lagerung und Stabilität
7	Probenentnahme 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 Referenz-Tabelle

C1q (HUMAN) BINDARID™ KIT FÜR DIE RADIALE IMMUNDIFFUSION

Nur zur *in vitro* Diagnostik

Bestell Nr.: RN020.3

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

In England hergestellt von:

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

Vertrieb in Deutschland und Österreich durch:

The Binding Site GmbH, Robert-Bosch-Straße 2A
D-68723 Schwetzingen, Deutschland
Telefon: +49 (0) 6202 92 62 0
Fax: +49 (0) 6202 92 62 222
e-mail: office@bindingsite.de



1 VERWENDUNGSZWECK

Zur quantitativen Bestimmung von humanem C1q im Serum. Der Kit unterstützt die Diagnose und Behandlung von systemischem Lupus Erythematoses (SLE).

2 EINLEITUNG

C1q ist ein hexamerer Gamma 2-Protein mit einem Molekulargewicht von 400kD und bildet eine Untereinheit von C1, die erste Komponente des Komplementsystems. Die Bindung von zwei oder mehr der 6 globulären Köpfe aktiviert das C1q-Molekül und damit den klassischen Weg der Komplementaktivierung. C1q bindet an die CH2-Domänen von aggregierten IgG-Molekülen eines Immunkomplexes oder an die CH3-Domäne eines IgM-Moleküls, dessen Konformation durch die Antigenbindung verändert wurde. C1q kann aber auch direkt an bestimmte Mikroorganismen oder Mycoplasmen binden. Durch die mehrfache Bindung des C1q wird eine Konformationsänderung in dem Komplex und eine Aktivierung von C1r und anschließend C1s herbeigeführt. Dies löst die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade aus. Die Kollagen-ähnliche filamentöse Domäne von C1q (die nur zugänglich ist, nachdem sich der C1-Inaktivator C1r2 und C1s2 von dem C1q-Aktivator-Komplex abgelöst hat) verstärkt die Phagozytose von Partikeln durch Monozyten und Makrophagen. Die C1q-Serumkonzentration ist bei Immunkomplex-Erkrankungen, systemischen Lupus Erythematoses (SLE) und Meningitis erniedrigt. Erbliche Defizienzen sind ebenfalls bekannt (Ref. 1 –4).

Die Methode der Radialen Immundiffusion (RID) basiert prinzipiell auf den Arbeiten von Fahey & McKelvey (Ref. 5) und Mancini *et al* (Ref. 6, 7) und ist für die routinemäßige, quantitative Bestimmung von löslichen Antigenen (Proteine) aus Körperflüssigkeiten geeignet.

3 TESTPRINZIP

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 bestimmt wird, 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 Referenztablette, 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

- Immundiffusionsplatten** (in Folienbeutel eingeschweißt): enthalten monospezifisches Antiserum gegen C1q 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), 0,01% Thiomersal (Natrium-Ethylmercurithiosalicylat) und 0,01% Benzamidin.
- Kalibratoren**: Ein Set bestehend aus drei lyophilisierten Kalibratoren mit hoher, mittlerer und niedriger C1q-Konzentration. Die auf dem Etikett angegebenen Konzentrationen wurden durch Vergleich mit einem kommerziell erhältlichen Standard ermittelt. Da es aber keinen anerkannten internationalen Standard gibt, kann die Genauigkeit nicht garantiert werden. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin.
- Die 7%ige Rinderserum-Albumin-Lösung (BSA)**: liegt in flüssiger, stabilisierter Form vor und ist für Verdünnungen zu verwenden. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin.
- Die Kontrolle**: liegt lyophilisiert vor. Der Sollwert ist auf dem Etikett angegeben. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin.
- Destilliertes Wasser**: Zur Rekonstitution der lyophilisierten Kalibratoren und Kontrolle. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid.

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 und /oder 0,01% Thiomersal 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. Gelöst 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 PROBENENTNAHME 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 Venenpunkturen 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 (Proben, Kontrollen) ausschließlich das im Kit enthaltene Rinder Serum-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 Complement C1q NL Bindarid (Immendifusionsplatten, in Folie eingeschweißt)
- 8.1.2 8 x Gel Dividers (Gel-Trennplatten)
- 8.1.3 3 x Human C1q NL Calibrator (Kalibratoren, lyophilisiert)
- 8.1.4 1 x 5mL 7% BSA Solution (Rinder Serum-Albumin)
- 8.1.5 1 x Human C1q Control Serum (Kontrollserum, lyophilisiert)
- 8.1.6 1 x 5mL Distilled Water (Destilliertes Wasser)
- 8.1.7 1 x Arbeitsanleitung, inklusive RID-Referenztablelle

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 Rekonstitution der Kalibratoren und Kontrolle und Verdünnung der Proben.
- 8.2.3 Mikropipetten zum Auftragen der Proben. Diese sollten 10µL 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 (RID-Reader, 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 niemals 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 Antigenkonzentration erwartet. Bei diesen Proben kann es zu einer weitläufigen 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 lyophilisierten Kalibratoren mit destilliertem Wasser (im Kit enthalten) mit dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Volumen rekonstituieren. Vor dem Gebrauch muss sichergestellt werden, dass das gesamte Material vollständig gelöst ist. Stellen Sie die

Flasche auf den Kopf um Material zu lösen, das am Stopfen anhaftet. Gelöste Kalibratoren mindestens 30 Minuten lang vor Gebrauch stehen lassen. Die Kalibratoren sind vorverdünnung und werden direkt auf die RID-Platte aufgetragen. Vor dem Auftragen nochmals vorsichtig schütteln. Der mittlere und niedrige Kalibrator werden nur für die Erstellung der Standardkurve (Methode 2 und 3) benötigt.

8.3.3 Kontrolle

Die lyophilisierte Kontrolle mit destilliertem Wasser (im Kit enthalten) mit dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Volumen rekonstituieren. Vor dem Gebrauch muss sichergestellt werden, dass das gesamte Material vollständig gelöst ist. Die Kontrolle 1/2 verdünnen (z.B. 25µL Kontrolle + 25µL BSA-Lösung) und auftragen.

8.3.4 Probenvorbereitung

Proben 1/2 verdünnen. Um eine hohe Präzision zu erhalten wird empfohlen 25µL Serum mit 25µL BSA-Lösung zu mischen. Für Seren, die eine sehr hohe C1q-Menge enthalten, muss eine höhere Verdünnung gewählt werden. Hierfür mindestens 25µL Serum mit einem entsprechenden Volumen BSA-Lösung verdünnen. Für Seren mit einem sehr geringen Antigengehalt, der unterhalb des Messbereichs liegt, wird folgendes empfohlen:

- i) Proben unverdünnt auftragen
- ii) Ankonzentrieren der Probe.
- iii) 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 96 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 96 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 Diffusionendpunkt

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 42 Stunden laufen. Für jede Platte sollte eine eigene Standardkurve erstellt werden.

8.5 Auftragen von Kalibrator und Proben

Kalibrator(en), verdünnte Kontrolle und Testproben vor dem Auftragen vorsichtig schütteln. Je 10µL des hohen Kalibrators mit einer Mikropipette oder Hamilton-Spritze in eine Vertiefung pipettieren. Bei Methode 2 oder 3 zusätzlich je 10µL des mittleren und niedrigen Kalibrators in je eine Vertiefung pipettieren. In die restlichen Vertiefungen je 10µL der Proben und Kontrolle pipettieren. Während des Auftragens sollte die Platte nicht unnötig lange offen stehen, damit das Gel nicht austrocknet.

Hinweis: Erwartet man bei einer Probe sehr niedrige C1q-Konzentrationen, kann das zweifache Probenvolumen in eine Vertiefung aufgetragen werden: zunächst 10µL 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 10µL der Probe 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 42 Stunden, für Methode 1 und 2 (Diffusionsendpunkt-Bestimmung) 96 Stunden. Der Ringdurchmesser wird durch die Temperatur beeinflusst. Bei einer Inkubationstemperatur von 20-24°C beträgt der erwartete Ringdurchmesser des hohen Kalibrators 8mm (±0,3mm). Extreme Temperaturen vermeiden.

8.7 Qualitätskontrolle

Die Kontrolle immer wie eine Patientenprobe behandeln, also auch 1/2 verdünnen. 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 Juwelierlupe oder einem digitalen RID-Platten-Lesegerät 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 8,0mm ± 0,3mm. Liegt der Ringdurchmesser nicht in diesem Bereich, siehe "Trouble Shooting" (Abschnitt 10.3).

Methode 1: RID-Referenztablelle

Die C1q-Konzentration einer Patientenprobe kann direkt aus der RID-Referenztablelle abgelesen werden. Proben, deren Ringdurchmesser größer als der des höchsten Kalibrators sind, 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-Vermindeung führen, so dass sie noch die Ringdurchmesser der nebenliegenden Proben beeinflussen können. Sie sollten mit einer geeigneten Verdünnung erneut getestet werden. Erhält man Ringdurchmesser, die kleiner als in der RID-Referenztablelle angegeben sind, dann sollten die Proben in konzentrierterer Form (siehe Abschnitt 8.3.4) aufgetragen werden. **Die Verwendung der RID-Referenztablelle setzt voraus, dass die Probe wie empfohlen, in einer 1/2-Verdünnung aufgetragen wurde. Jede Änderung bei der Probenverdünnung muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.**

Beispiel:

Probe	Verdünnung	Ringdurchmesser (mm)	Tabellenwert (mg/L)	Originalprobe (mg/L)
C1q-Serum A	1/2	6,4	115	115
C1q-Serum B	1/2	> 10	> 410	> 410
C1q-Serum B (Wiederholung)	1/4	8,0	230	460*

*Die Konzentration wurde wie folgt berechnet: RID-Referenztabellen-Wert x empfohlener Verdünnung / tatsächliche Verdünnung, d.h. $230\text{mg/L} \times (1/2)/(1/4)$. **Hinweis:** die Kalibratoren sind vorverdünnt und werden direkt auf die RID-Platte aufgetragen (nicht 1/2 verdünnen). Daher entspricht die Konzentration des hohen C1q Kalibrators (115mg/L) mit einem Ringdurchmesser von 8mm $115 \times 2 = 230\text{mg/L}$ (siehe RID – Referenz-Tabelle).

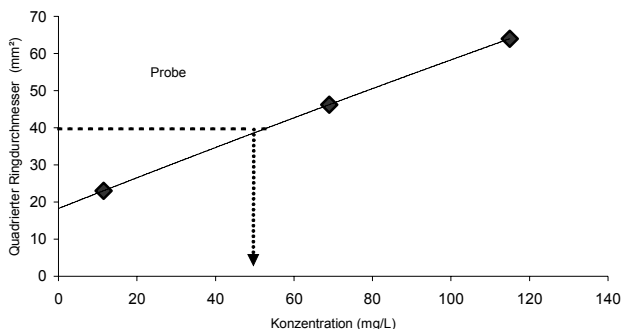
Methode 2: Standardkurve am Diffusionsendpunkt

Die Ringdurchmesser der drei Kalibratoren bestimmen und die Quadrate der Ringdurchmesser gegen ihre jeweilige C1q-Konzentration, auftragen. Dabei die C1q-Konzentrationen auf der Abszisse (x-Achse), die quadrierten Ringdurchmesser (mm^2) 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 17-23mm liegen. Die C1q-Konzentration der Patientenproben aus der Standardkurve ablesen. **Wichtig:** Korrektur der Probenkonzentration durch etwaige Verdünnungsfaktoren.

Berechnung der Antigenkonzentration in einer Patientenprobe:
Die C1q-Kalibratoren ergeben folgende Ringdurchmesser am Diffusionsendpunkt auf einer C1q-RID-Platte:

Kalibrator	Konzentration mg/L	Ringdurchmesser (mm)	Quadrat des Ringdurchmessers (mm^2)
Hoch	115	8,0	64,0
Mittel	69	6,8	46,2
Niedrig	11,5	4,8	23,0

Aus diesen Werten wurde die nachstehende Standardkurve erstellt:



Eine unbekannte Patientenprobe, wie empfohlen 1/2 verdünnt aufgetragen, ergibt einen Ringdurchmesser von 6,3mm auf dieser RID-Platte. Von obiger Standardkurve abgelesen entspricht dies einer C1q-Konzentration von 52mg/L. D.h. die C1q-Konzentration der unverdünnten Probe ist $52\text{mg/L} \times 2 = 104\text{mg/L}$.

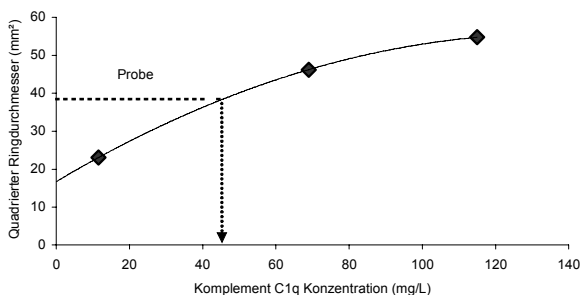
Methode 3: Standardkurve vor dem Diffusionsendpunkt.

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 C1q-Kalibratoren ergaben nach 42h Inkubation folgende Ringdurchmesser auf einer C1q-RID-Platte:

Kalibrator	Konzentration (mg/L)	Ringdurchmesser (mm)	Quadrat d. Ringdurchmessers (mm^2)
Hoch	115	7,4	54,8
Mittel	69	6,8	46,2
Niedrig	11,5	4,8	23,0

Aus diesen Werten wurde die nachstehende Standardkurve erstellt:



Eine unbekannte Patientenprobe, wie empfohlen 1/2 verdünnt aufgetragen, ergibt einen Ringdurchmesser von 6,2mm auf dieser RID-Platte. Von obiger Standardkurve abgelesen

entspricht dies einer C1q-Konzentration von 44mg/L. D.h. die C1q-Konzentration der 1/2 verdünnten Probe ist $44\text{mg/L} \times 2 = 88\text{mg/L}$.

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 (8,0 mm) sind, nur Näherungswerte darstellen (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 :			
Kalibrator(en)	Kalibrator nicht aufgetragen	Test wiederholen	
1. Proben	i) Probe nicht aufgetragen	Test wiederholen	
	ii) Konzentration zu hoch/niedrig	Probe verdünnen/ ankonzentrieren	
2. 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 (>8,3mm).	i) Ring ungenau gemessen	Erneute Messung mit Lupe oder RID-Platten-Lesegerät	
	ii) Falsches Volumen aufgetragen	Überprüfen, ob 10µL aufgetragen wurden	
	iii) Ungenaueres Volumen aufgetragen	a) Mikropipette defekt- Funktion überprüfen und Test wiederholen b) Verfahrensfehler – Test wiederholen	
	iv) Kalibrator nicht korrekt rekonstituiert	a) Mikropipette defekt- Funktion überprüfen und Test wiederholen b) Verfahrensfehler – Test wiederholen	
	v) Rekonstituierter Kalibrator während Lagerung teilweise verdunstet	Test mit neuem Kalibrator/Kit wiederholen	
	vi) Platte unbrauchbar	a) Lagerungsschaden – Test mit neuer Platte wiederholen. b) Kit abgelaufen – Test mit neuem Kit wiederholen.	
	vii) Lokale Antikörperverminderung wegen zu hoher Antigenkonzentration in der Probe	Entsprechende Proben verdünnen und auf neuer Platte testen.	
	viii) Inkubations-temperatur zu hoch (siehe Abschnitt 8.6)	Test wiederholen: Inkubation bei 20 – 24°C.	
2. Patientenproben (oberhalb des Wertebereichs : siehe Abschn. 10.1)	i) Proteinkonzentration zu hoch	Höhere Probenverdünnung – Test wiederholen	
	ii) Falsches Volumen aufgetragen	Kontrollieren, dass 10µL aufgetragen werden.	
C. Zu kleine Ringe bei			
1. Hoher Kalibrator (kleiner als 7,7mm)	i) Ring ungenau gemessen	} Siehe B1	
	ii) Falsches Volumen aufgetragen		
	iii) Ungenaueres Volumen aufgetragen		
	iv) Kalibrator nicht korrekt rekonstituiert		
	v) Kalibrator unbrauchbar		a) Falsche Lagerung; Test mit neuem Kalibrator wiederholen b) Kit abgelaufen; Test mit neuem Kit Wiederholen
	vi) Inkubations -temperatur zu niedrig (siehe 8.6)		Test wiederholen, Inkubation bei 20-24°C.
2. Patientenproben (unterhalb des Wertebereichs - siehe Abschn. 10.1)	i) Konzentration zu niedrig	siehe Abschnitt 8.3 (4). Test wiederholen	
	ii) Falsches Volumen aufgetragen	Kontrollieren, dass 10µL aufgetragen werden.	
D. Doppel-/Vielfachringe bei:			
i) nicht spezifische Präzipitation nahe der Vertiefung (Grund: PEG im Gel)	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	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 Antikörper-	Die entsprechende Proben	

Problem	Fehlerquelle	Lösung
	Verminderung wegen zu hoher Antigenkonzentration	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 ; Lager-temperatur 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	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 C1q-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:

	Anzahl d. Proben	Mittelwert (mg/L)	Median (mg/L)	Standardabweichung	95 Percentile
Normale Männer	62	163	155	35	118-238
Normale Frauen	60	158	151	33	118-244
Aktiver SLE	14	117	122	52	33-209
Inaktiver SLE	17	128	126	28	93-183

Diese Werte wurden mit Hilfe eines normalen, britischen Blutspenderkollektivs und Patienten ermittelt und dienen nur zur Orientierung. Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor eigene C1q-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 C1q enthalten, bestimmt. Alle Analysen wurden im Labor von The Binding Site Group 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 96 Stunden, für Methode 3 nach 42 Stunden gemessen.

Proben-Pool C1q	Methode 1		Methode 2		Methode 3		
	Mittelwert mg/L	%VK	Mittelwert mg/L	%VK	Mittelwert mg/L	%VK	
C1q	Hoch	191,6	1,76	189,0	2,23	178,2	7,62
	Mittel	125,7	4,77	119,2	4,63	118,0	7,85
	Niedrig	44,96	6,90	39,59	7,82	42,55	8,55

12.2 Intra-Assay- und Inter-Chargen-Variation:

Die Intra-Assay-Variation (Variation innerhalb einer Platte) wird als mittlere Standardabweichung (SD) bei der VK-Bestimmung bezeichnet. Zur Bestimmung der Variationskoeffizienten wurden 3 RID-Platten von verschiedenen Chargen verwendet und pro Platte und Probe 6 Ringdurchmesser bestimmt

Die Inter-Chargen-Variation wird als VK der Ringdurchmesser-Mittelwerte, die auf Platten verschiedener Chargen gemessen wurden, ausgedrückt. Für jede Charge (2 Platten pro Charge) werden die Ringdurchmesser (6 Bestimmungen pro Platte) am Diffusionsendpunkt gemessen und daraus der mittlere Ringdurchmesser berechnet.

C1q	Intra-Assay-Variation	Inter-Chargen-Variation
	Mittlerer % VK ± SD	% VK
	0,79 ± 0,16 (N=3)	0,23 (N=3)

13 BIBLIOGRAPHIE

- Cooper, NR, (1985). The classical complement pathway: Activation and regulation of the first complement component. Adv. Immunol. **37**, 151-216
- Arlaud, GJ *et al* (1987). A functional model of the human C1 complex. Immunol. Today, **8**, 106-111
- Ross, SC & Densen, P (1984). Complement deficiency states and infection: Epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. Medicine, **63**, 243-273
- Schifferli, J A *et al* (1986). The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. New Eng. J. **315**, 488-495
- 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., p 370

- 13.7 Mancini, G, Carbonara, A O *et al* (1965). Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochem. **2**, 235-254

14 KURZANLEITUNG

- Auswahl zwischen Methode 1, 2 oder 3. Methode 3 wird angewendet, wenn die Ergebnisse schnell benötigt werden.
- Kalibrator(en) und Kontrolle mit destilliertem Wasser rekonstituieren.
- Proben und Kontrolle 1/2 mit Diluents (7%ige BSA-Lösung) herstellen.
- Eventuell vorhandenes Kondenswasser verdunsten lassen (Platte 5 – 15 Minuten offen bei Raumtemperatur stehen lassen).
- Kalibrator(en), Kontrolle und Proben auftragen: je 10µL.
- Platte mit Deckel verschließen – Inkubation bei Raumtemperatur (ca. 20-24°C): mindestens 42h bei Methode 3 oder bis zum Diffusionsendpunkt (mindestens 96h bei Methode 1 und 2).
- Messen der Ringdurchmesser.
- 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 C1q (Human) Konzentration in mg/L

Ringdurchmesser (mm)	Konz.
4,5	11,0
4,6	15,5
4,7	20,2
4,8	25,0
4,9	29,8
5,0	34,8
5,1	39,8
5,2	45,0
5,3	50,2
5,4	55,6
5,5	61,1
5,6	66,6
5,7	72,3
5,8	78,0
5,9	83,9
6,0	89,8
6,1	95,9
6,2	102
6,3	108
6,4	115
6,5	121
6,6	128
6,7	134
6,8	141
6,9	148
7,0	155
7,1	162
7,2	169
7,3	176
7,4	184
7,5	191
7,6	199
7,7	206
7,8	214
7,9	222
8,0	230
8,1	238
8,2	246
8,3	254
8,4	263
8,5	271
8,6	280
8,7	289
8,8	297
8,9	306
9,0	315
9,1	324
9,2	333
9,3	343
9,4	352
9,5	361
9,6	371
9,7	381
9,8	390
9,9	400
10,0	410

Hinweis: Die in der Tabelle angegebenen Werte gehen davon aus, dass die Proben 1/2 verdünnt und mit einem Volumen von 10µL aufgetragen wurden. Der hohe Kalibrator sollte einen Ringdurchmesser von 8,0 ± 0,3mm am Diffusionsendpunkt und einer Inkubations-temperatur von 20-24°C aufweisen.

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

KIT DE DOSAGE DE LA PROTEINE C1Q DU COMPLEMENT EN IMMUNODIFFUSION RADIALE

Pour usage *in vitro* uniquement

Code Produit : RN020.3

BINDARID™ est une marque déposée de la société 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.

Distribués en France par la société :

The Binding Site France, 14 rue des glairaux BP226, 38522 Sr Egreve cedex

Téléphone : 04.38.02.19.19

Fax : 04.38.02.19.20

Email : info@bindingsite.fr



1 INDICATIONS

Ce coffret est utilisé pour quantifier la fraction C1q dans le sérum humain. Il apporte une aide dans le diagnostic et le traitement du lupus érythémateux systémique (LED).

2 PRÉSENTATION GÉNÉRALE

Le C1q est une protéine gamma 2 hexamérique de 400KD. C'est une sous unité de la molécule C1 : la première composante du complément. La liaison de deux ou plus des six domaines globulaires du C1q initie l'activation par la voie classique du complément. Le C1q se lie facilement aux domaines CH2 des molécules d'IgG agrégées en complexes immuns ou domaines CH3 de la molécule simple d'IgM dont la conformation a été modifiée par la liaison de l'antigène. Il peut aussi se lier directement avec certains microorganismes et mycoplasmes. La liaison multivalente du C1q induit un changement conformationnel dans le complexe C1q, activant C1r puis C1s permettant l'initialisation de la voie classique du complément. Le domaine terminal 'collagène-like' du C1q (seulement lorsque le C1 inhibiteur a dissocié le C1r₂ et le C1s₂ du complexe C1q activateur) augmente la phagocytose des particules par les monocytes et les macrophages. Les taux de C1q sériques sont réduits dans les maladies des complexes immuns, dans le LED et les méningites. Une déficience héréditaire est également connue (réfs. 1-4).

L'immunodiffusion radiale (IDR) est une technique utilisée en routine pour la quantification d'antigènes solubles dans les liquides biologiques. Elle fait référence aux travaux de Fahey et McKelvey (réf. 5) et de Mancini (réfs. 6 et 7).

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 des complexes antigènes-anticorps donnera lieu à un cercle de diffusion tout autour du puits. La taille du cercle augmentera jusqu'à l'équilibre ou diffusion complète. 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 le diamètre des anneaux obtenus à partir d'échantillons de concentration connue. La concentration en antigènes d'un échantillon inconnu sera lue directement à partir de la courbe de calibration sur laquelle on aura reporté le diamètre de l'anneau de diffusion de l'échantillon.

Trois procédures différentes de mesure peuvent être utilisées avec les réactifs du kit (cf paragraphe 8.4). Pour les procédures 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 le kit, qui est établie à partir d'une droite de calibration idéale, qui convertit le diamètre de l'anneau en concentration protéique. En utilisant la procédure 3, les anneaux sont mesurés avant le point final de diffusion, la courbe de calibration n'est pas linéaire.

4 RÉACTIFS

- 4.1 **Plaques d'IDR:** (fournies chacune dans un étui). Elles contiennent un anticorps monospécifique inclus dans le gel d'agarose et dirigé contre la protéine C1q. 14 échantillons (calibrateurs et contrôles inclus) peuvent être mesurés sur chaque plaque. Conservateurs : Azide de sodium 0,099%, acide E amino caproïque (EACA) 0,1%, thimérosal 0,01%, benzamidine 0,01%.
- 4.2 **Calibrateurs:** 3 flacons fournis sous forme lyophilisée contenant des concentrations faibles, moyennes ou élevées en C1q. La concentration en C1q indiquée sur l'étiquette du flacon a été obtenue par comparaison avec un standard disponible dans le commerce ; cependant en l'absence de standardisation internationale, la fiabilité du standard ne peut pas être garantie. Conservateurs : azide de sodium 0,099%, EACA 0,1%, benzamidine 0,01%.
- 4.3 **Solution de sérum albumine bovine (BSA) à 7%:** Présentée sous forme liquide et utilisé comme diluant. Conservateurs : azide de sodium 0,099%, EACA 0,1%, benzamidine 0,01%.
- 4.4 **Contrôle:** Présenté sous forme lyophilisée. La concentration en C1q est notée sur l'étiquette du flacon. Conservateurs : azide de sodium 0,099%, EACA 0,1%, benzamidine 0,01%.
- 4.5 **Eau distillée:** Pour reconstituer les calibrateurs et le contrôle lyophilisé. Conservateur: azide de sodium 0,099%.

5 PRÉCAUTIONS

Tous les sérums humains de ce kit ont été testés et se sont avérés négatifs pour l'antigène de surface des hépatites B (Ag Hbs) et pour les anticorps du virus de l'immunodéficience humaine (HIV1 et HIV2) et de l'hépatite C. Toutefois, ces tests ne peuvent garantir l'absence totale d'agents infectieux. Tous les échantillons doivent donc être considérés comme potentiellement infectieux. Seul un personnel qualifié est autorisé à utiliser ce kit.

Les plaques, les calibrateurs, les contrôles et la BSA contiennent 0,099% d'azide de sodium et/ou 0,01% de thimérosal comme conservateurs. Des azides de métaux explosifs peuvent se former avec le cuivre et le plomb. En cas de contact, laver à grande eau et consulter un médecin. Laver à grande eau les récipients ayant contenu ces réactifs afin d'éviter la formation des azides.

Il est recommandé de suivre scrupuleusement la procédure. La validité des résultats obtenus en utilisant des méthodes autres que celles indiquées ne peut pas être garantie.

Des réactifs provenant de différents numéros de lot ne sont PAS interchangeables. Si de grandes séries de test doivent être réalisées, s'assurer que tous les réactifs sont issus du même lot.

6 STOCKAGE ET STABILITÉ

Les kits 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 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 (-20°C ou à une température inférieure). Tous les autres réactifs sont à conserver entre 2 et 8°C.

7 COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Il est recommandé d'utiliser du sérum fraîchement prélevé ou congelé. 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 kit 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 MÉTHODOLOGIE

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

8.1 Matériel fourni

- 8.1.1 3 x *Human Complement C1q 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 flacons de *Human C1q NL Calibrator* (calibrateurs lyophilisés)
- 8.1.4 1 x flacon de 5mL *7% BSA Solution* (BSA 7%)
- 8.1.5 1 x flacon de *Human C1q Control Serum* (contrôle lyophilisé)
- 8.1.6 1 x flacon de 5mL *Distilled water* (eau distillée)
- 8.1.7 1 x fiche technique comprenant une table de référence.

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 10 µl 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 0,1 mm près).
- 8.2.5 Papier graphique.

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'ait 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 en C1q 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 lyophilisés doivent être reconstitués avec le volume d'eau distillée indiqué sur les étiquettes des flacons (utiliser l'eau distillée fournie dans ce kit). Les calibrateurs doivent être complètement dissous, ceci prend environ trente minutes. Ils doivent être déposés sans dilution. Les homogénéiser par retournement avant utilisation. Les calibrateurs bas et moyens ne doivent être utilisés que lorsqu'une calibration est nécessaire (procédures 2 et 3).

8.3.3 Contrôle

Le sérum de contrôle doit être reconstitué avec le volume d'eau distillée indiquée sur l'étiquette du flacon. Il doit être mélangé doucement par inversion jusqu'à ce que le contenu soit complètement dissous. Il doit être dilué au 1/2 avant d'être déposé sur la plaque (25µl de sérum de contrôle mélangé à 25µl de BSA 7%).

8.3.4 Echantillon

Les échantillons doivent être dilués au 1/2 avant d'être déposés. Pour obtenir un résultat fiable, 25µl d'échantillon doit être ajouté à 25µl de BSA 7%. Les échantillons ayant des concentrations élevées en C1q requiert un facteur de dilution plus important. Dans ce cas, un volume minimum de 25µl d'échantillon doit être ajouté au volume approprié de BSA. Pour des échantillons ayant une concentration en C1q inférieure à la limite de détection des plaques, il est conseillé :

- i) de déposer l'échantillon pur
- ii) de concentrer l'échantillon
- iii) de faire un double dépôt dans le puits (cf. paragraphe 8.5).

8.4 Procédure

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

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 kit. Les diamètres des anneaux seront mesurés au point final de diffusion : 96 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 : 96 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 non dilué 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 42 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, 10µl de calibrateur haut en utilisant une micropipette. Si les procédures 2 ou 3 sont suivies, déposer également les calibrateurs moyen et bas. Déposer ensuite 10µl d'échantillons et de contrôle dilués de façon appropriée. 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 10µl 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, faire un second dépôt de 10µl, incuber la plaque. Les résultats seront corrigés en fonction du double dépôt mais 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 42 heures et pour la diffusion complète (procédures 1 et 2), il est de 96 heures. Les diamètres des anneaux de diffusion sont dépendants de la température. Des variations importantes de température pendant l'incubation peuvent altérer les mesures. La température idéale d'incubation se situe entre 20 et 22°C. La taille de l'anneau pour le calibrateur haut doit être de 8 mm (+/- 0,3mm) à 22°C. Les températures extrêmes doivent être évitées.

8.7 Contrôle de qualité

Le contrôle fourni, après reconstitution, sera traité de la même façon que les échantillons, c'est-à-dire dilué au 1/2. 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 0,1 mm près à l'aide d'une loupe de bijoutier ou lecteur digital de plaques d'IDR. La lecture à l'aide de la loupe de bijoutier 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 8 mm +/- 0,3 mm 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 C1q 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 restestés. 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 restestés après concentration (voir paragraphe 8.3.4). La lecture directe de la concentration d'un échantillon sur la table de référence ne peut se faire que si l'échantillon déposé a été dilué au 1/2 comme recommandé. 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)
C1q-Sérum A	1/2	6,4	115	115
C1q-Sérum B	1/2	> 10	> 410	> 410
C1q-Sérum B (second test)	1/4	8,0	230	460*

*calculée suivant : valeur de la table x dilution recommandée dilution actuelle c'est-à-dire : 230 mg/l x (1/2) / (1/4).

Note: les calibrateurs fournis sont pré-dilués et sont déposés purs et non pas dilués au 1/2. Cependant, le calibrateur haut C1q (115 mg/L) donnant un anneau de 8 mm est équivalent à la concentration d'un échantillon de 115 x 2 = 230 mg/L, la valeur de la table de référence.

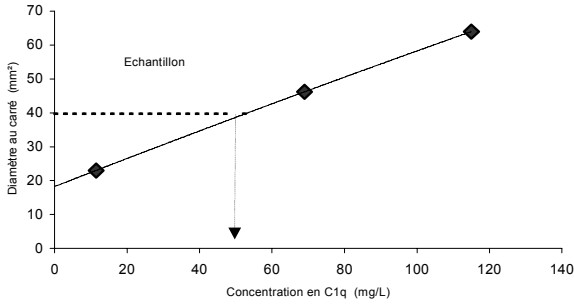
Procédure 2 :

Pour tracer la courbe de calibration, reporter sur l'axe des X les concentrations en C1q 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 ligne passant les 3 points. L'ordonnée à l'origine doit être comprise entre 17 et 23mm². La concentration en C1q est lue à partir de la courbe de calibration. Ne pas oublier de tenir compte des facteurs de dilution des échantillons.

Exemple:
Les calibrateurs C1q 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	115	8,0	64,0
Moyen	69	6,8	46,2
Bas	11,5	4,8	23,0

Une courbe de calibration a été tracée en utilisant ces résultats



Un échantillon dilué au 1/2 donne un anneau d'un diamètre de 6,3 mm sur cette plaque. D'après la courbe ci-dessus, cela correspond à une concentration en C1q de 52mg/L. Par conséquent, la concentration en C1q de l'échantillon non dilué est égale à 52 x 2 = 104mg/L.

Procédure 3 :

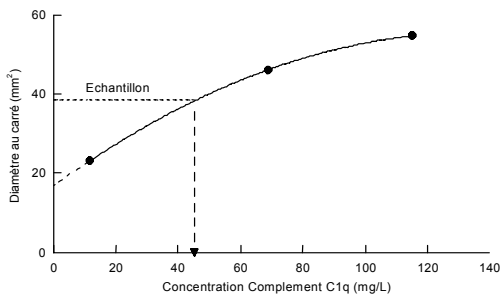
Tracer la courbe de calibration comme dans la procédure 2. La courbe de calibration obtenue ne sera pas linéaire, la pente de la droite diminuant tandis que la concentration augmente. L'intersection avec l'axe des Y obéit aux mêmes règles que la procédure 2. Les concentrations pour les échantillons inconnus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

Exemple:

Les calibrateurs C1q donnent, après 42 heures, les diamètres des anneaux suivants:

Calibrateur	Concentration (mg/l)	Diamètre de l'anneau (mm)	Diamètre au carré (mm ²)
Haut	115	7,4	54,8
Moyen	69	6,8	46,2
Bas	11,5	4,8	23,0

Une courbe de calibration a été tracée en utilisant ces résultats



Un échantillon dilué au 1/2 donne un anneau d'un diamètre de 6,2 mm sur cette plaque. D'après la courbe ci-dessus, cela correspond à une concentration en C1q de 44mg/L. Par conséquent, la concentration en C1q dans l'échantillon non dilué est égale à 44 x 2 = 88mg/L.

10 LIMITES LA PROCEDURE

10.1 Pour la procédure 1, les résultats obtenus à partir de diamètres d'anneaux supérieurs à celui du calibrateur pur (8 mm) doivent être considérés comme approximatifs (cf. Paragraphe 9). Pour les procédures 2 et 3, des résultats fiables sont obtenus pour des valeurs comprises entre le calibrateur bas et le calibrateur élevé, 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	Plaque détériorée.	a) Mauvaises conditions de conservation. Répéter test avec nouvelle plaque.
		b) Vérifier la date de péremption. Répéter test avec

Problèmes	Causes probables	Solutions envisagées
		nouvelle plaque/kit.
B. Anneaux de diffusion trop larges.		
1. Calibrateur haut non dilué (Diamètre supérieur à 8,3 mm)	i) Mesure inexacte.	Mesure à l'aide d'une loupe ou lecteur digital de plaques d'IDR
	ii) Volume de dépôt incorrect.	Vérifier le volume de dépôt (10µl)
	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) Reconstitution imprécise du calibrateur	a) Mauvais fonctionnement de la pipette – vérifier l'opération et répéter le test en utilisant un nouveau calibrateur. b) Mauvaise technique – répéter le test en utilisant un nouveau calibrateur.
	v) Evaporation partielle du calibrateur reconstitué lors du stockage	Répéter le test avec un nouveau calibrateur/kit
	vi) 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.
	vii) Déplétion locale en anticorps due à un échantillon voisin trop concentré.	Diluer les échantillons responsables. Refaire les tests en utilisant de nouvelles plaques.
	viii) 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 basse.	Diluer l'échantillon et répéter le test.
	ii) Volume déposé incorrect.	Vérifier le volume de dépôt (10µl).
C. Anneaux de diffusion trop petits.		
1. Calibrateur haut non dilué (diamètre inférieur à 7,7mm)	i) Mesure inexacte de l'anneau.	} Cf B1
	ii) Volume de dépôt incorrect.	
	iii) Volume déposé incorrect.	
	iv) Reconstitution imprécise du calibrateur	
	v) 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.
	vi) 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 10µl.
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.

Problèmes	Causes probables	Solutions envisagées
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 initialisé sur la base des mesures en fibrinogène seules. 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 de préférence avec un échantillon frais.

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

11 VALEURS ATTENDUES

Les résultats suivants ont été obtenus en utilisant ce kit avec des sérums de donneurs de sang.

	Nb d'échantillons	Moy. (mg/l)	Médiane (mg/l)	DS	Gamme 95 percentile
Hommes sains	62	163	155	35	118-238
Femmes saines	60	158	151	33	118-244
LED actif	14	117	122	52	33-209
LED inactif	17	128	126	28	93-183

Les données fournies ci-dessus ont été obtenues à partir d'un nombre limité de sérums de donneurs de sang anglais et de patients cliniques. Ses données ne sont fournies qu'à titre indicatif. Il est fortement conseillé que chaque utilisateur établisse ses propres normes de concentrations en C1q d'après ses données cliniques.

12 PERFORMANCES

12.1 Précision

La précision (répétabilité) du kit 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 C1q. 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 96 heures. Pour la procédure 3, le diamètre des anneaux a été lu après 42 heures.

Échantillons C1q	Procédure 1		Procédure 2		Procédure 3	
	Conc. Moy. (mg/L)	CV	Conc. Moy. (mg/L)	CV	Conc. Moy. (mg/L)	CV
Elevé	191,6	1,76%	189,0	2,23%	178,2	7,62%
Moyen	125,7	4,77%	119,2	4,63%	118,0	7,85%
Bas	44,96	6,90%	39,59	7,82%	42,55	8,55%

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 2 plaques de chaque lot (6 mesures d'anneaux par plaque).

C1q	Variation inter-plaque		Variation inter-lot	
	Moyenne du CV en % ± DS		CV en (%)	
	0,79 +/- 0,16 (N=3)		0,23 (N=3)	

13 BIBLIOGRAPHIE

- Cooper, NR, (1985). The classical complement pathway: Activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol.* **37**, 151-216
- Arlaud, GJ *et al* (1987). A functional model of the human C1 complex. *Immunol. Today*, **8**, 106-111
- Ross, SC & Densen, P (1984). Complement deficiency states and infection: Epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine*, **63**, 243-273
- Schifferli, J A *et al*. (1986). The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *New Eng. J.* **315**, 488-495
- 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., p 370
- Mancini, G, Carbonara, A O *et al* (1965). Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* **2**, 235-254

14 RÉSUMÉ DE LA PROCÉDURE

- Choisir la procédure 1, 2 ou 3. La procédure 3 est utilisée pour des résultats devant être obtenus rapidement.
- Reconstituer les calibrateurs et le contrôle avec l'eau distillée fournie dans le kit.
- Préparer les dilutions au 1/2 des échantillons et du contrôle avec la BSA 7% fournie dans le kit.
- Laisser l'eau de condensation s'évaporer des plaques.
- Déposer 10µl de calibrateurs, de contrôle et d'échantillons dans les puits.
- Remettre le couvercle et incuber à température ambiante (approximativement à 20-24°C) pendant le temps nécessaire : minimum de 42 heures (Procédure 3) ou jusqu'au point final de diffusion (minimum de 96 heures pour les procédures 2 et 3).
- Mesurer les diamètres des anneaux.
- Lire les résultats sur la table de référence (Procédure 1) ou établir une courbe de calibration et en déduire les résultats (Procédures 2 et 3).

Table de référence en idr pour le dosage du C1q Concentrations en mg/L

Diamètre de l'anneau (mm)	Concentration en mg/l
4,5	11,0
4,6	15,5
4,7	20,2
4,8	25,0
4,9	29,8
5,0	34,8
5,1	39,8
5,2	45,0
5,3	50,2
5,4	55,6
5,5	61,1
5,6	66,6
5,7	72,3
5,8	78,0
5,9	83,9
6,0	89,8
6,1	95,9
6,2	102
6,3	108
6,4	115
6,5	121
6,6	128
6,7	134
6,8	141
6,9	148
7,0	155
7,1	162
7,2	169
7,3	176
7,4	184
7,5	191
7,6	199
7,7	206
7,8	214
7,9	222
8,0	230
8,1	238
8,2	246
8,3	254
8,4	263
8,5	271
8,6	280
8,7	289
8,8	297
8,9	306
9,0	315
9,1	324
9,2	333
9,3	343
9,4	352
9,5	361
9,6	371
9,7	381
9,8	390
9,9	400
10,0	410

Note: Les valeurs ci-dessus sont valables pour des échantillons dilués au 1/2 (volume de dépôt : 10µL). Le calibrateur haut doit donner un diamètre d'anneau de 8mm +/- 0,3mm au point final de diffusion avec une incubation entre 20-24°C.

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

KIT BINDARID™ COMPLEMENTO HUMANO C1q INMUNODIFUSION RADIAL

Spanish

Sólo para el diagnóstico *in vitro*

Código Producto: RN020.3

BINDARID™ es una marca de la empresa The Binding Site Group Ltd., Birmingham, U.K.

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 la concentración de C1q humano en suero, como soporte al diagnóstico y tratamiento del Lupus Eritematoso Sistémico.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

C1q es una proteína hexamérica gamma-2 de unos 400kD que es una subunidad del C1 (el primer componente del complemento). La unión a dos o más de los seis dominios globulares de la C1q inicia la activación de la vía clásica del complemento. C1q se une rápidamente al dominio CH2 de las moléculas IgG agregadas en un inmunocomplejo o bien al dominio CH3 de una molécula simple de IgM que ha padecido una variación conformacional por la unión de un antígeno. También se puede unir directamente a algunos microorganismos y micoplasmas. La unión multivalente del C1q se cree que conduce a un cambio conformacional del complejo C1q, activando C1r y C1s e iniciando la vía clásica del complemento. El dominio tipo cola de colágeno del C1q (que tan sólo queda expuesto cuando el C1 inactivador se disocia en C1r₂ y C1s₂ a partir del complejo activador C1q) incrementa la fagocitosis de partículas por los monocitos y macrófagos. Los niveles séricos de C1q están disminuidos en enfermedades con inmunocomplejos, lupus eritematoso sistémico y meningitis. También se conoce una deficiencia hereditaria (ref. 1-4).

La inmunodifusión radial (RID) es una técnica que se utiliza rutinariamente para medir la concentración de diferentes antígenos solubles en fluidos biológicos. Está basada en los trabajos de Fahey & McKelvey (ref. 5) y Mancini y coll (ref. 6, 7).

3 PRINCIPIO

El método implica la difusión radial del antígeno desde un pocillo cilíndrico a través de un gel de agarosa conteniendo un anticuerpo mono-específico adecuado. Se forman los complejos Antígeno-anticuerpo los cuales, bajo condiciones correctas, formarán un aro de precipitación. El tamaño del aro crece hasta alcanzar el equilibrio entre la formación y la desaparición de tales complejos, este punto se denomina "conclusión". En este estadio existe una relación lineal entre el cuadrado del diámetro del aro y la concentración de antígeno. Midiendo los diámetros de los aros producidos por un número de muestras de concentración conocida, puede construirse una curva de calibración. La concentración de antígeno de una muestra desconocida puede determinarse midiendo el diámetro del aro producido por esa muestra y leyendo la concentración en la curva de calibración.

Existen tres procedimientos distintos que pueden usarse con este kit (ver Sección 8.4). Los procedimientos UNO y DOS requieren la medida de los aros a conclusión. Para el procedimiento DOS se construye una curva de calibración lineal, mientras para el procedimiento UNO se utiliza una tabla de referencia suministrada (basada en la curva de calibración lineal ideal), que convierte directamente diámetros de aro a concentraciones de proteína. Utilizando el procedimiento TRES, se miden los diámetros de aro antes de conclusión; la curva de calibración que se produce será no-lineal.

4 REACTIVOS

- 4.1 Placas RID (envasadas en sobres herméticos). Estas placas contienen un anticuerpo monoespecífico frente a C1q en el gel de agarosa. Se pueden medir hasta 14 muestras por placa (incluyendo los calibradores). Conservantes: 0,099% azida sódica, 0,1% ácido E-amino-n-caproico (EACA), 0,01% timerosal (etilmercuritiosalicilato de sodio) y 0,01% benzamidina.
- 4.2 Calibradores. Se suministran liofilizados, como un set de 3, conteniendo un calibrador con una concentración alta de C1q, uno con una concentración media de C1q y uno con una concentración baja de C1q. Las concentraciones declaradas de C1q en las etiquetas de los viales, se han obtenido por comparación con un standard comercial, sin embargo en ausencia de acuerdo internacional, la exactitud del standard disponible no puede ser garantizada. Conservantes: 0,099% azida sódica, 0,1% EACA, 0,01% benzamidina.
- 4.3 Solución albúmina sérica bovina (BSA) al 7%. Se suministra en forma líquida liofilizada y se incluye para utilizarla como diluyente. Conservantes: 0,099% azida sódica, 0,1% EACA y 0,01% benzamidina.
- 4.4 Control. Se suministra liofilizado. La concentración esperada de C1q viene indicada en el vial. Conservantes: azida sódica 0,099%, 0,1% EACA y 0,01% benzamidina.
- 4.5 Aqua destilada. Para reconstituir el calibrador y el control liofilizado. Conservante: 0,099% azida sódica.

5 ADVERTENCIAS

El material de partida para la elaboración de los calibradores y controles proviene de sangre humana. Cada una de las muestras han sido examinadas, resultando 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 personal adecuadamente instruido deberá efectuar el test.

Las placas IDR y otros componentes del kit contienen azida sódica 0,099% y/o 0,01% tiorosalato deben tratarse según las medidas de seguridad correspondientes. Debe evitarse tanto la ingesta como el contacto con la piel y las mucosas. En caso de contacto, aclarar con abundante agua y consultar a un médico. La azida sódica puede formar ácidos metálicos explosivos en contacto prolongado con tubos de plomo o cobre. Tras la eliminación aclarar con gran cantidad de agua con el fin de evitar depósitos de azida.

Se recomienda seguir el procedimiento descrito en estas instrucciones de empleo. De no seguir estas instrucciones, no se pueden garantizar los resultados.

No se pueden 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 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 alicuatados y congelados (-20°C o más bajo). Todos los demás reactivos deben almacenarse entre 2 y 8°C.

7 TOMA 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 o para almacenar por más tiempo se puede alicuar y conservar a -20°C o menos. Debe 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 del calibrador que tiene una viscosidad parecida al suero normal.

8 METODOLOGÍA

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

8.1 Contenido:

- 8.1.1 3 x *Human Complement C1q NL Bindard* (placas de inmunodifusión radial embolsadas)
- 8.1.2 8 x *Gel dividers* (Partidores de gel)
- 8.1.3 3 x *Human C1q NL Calibrator* (Calibradores C1q humano, liofilizado)
- 8.1.4 1 x 5mL 7% *BSA Solution* (Solución al 7% Albúmina sérica bovina)
- 8.1.5 1 x *Human C1q Control Serum* (Suero humano control C1q, liofilizado)
- 8.1.6 1 x 2mL *Distilled Water* (Agua destilada)
- 8.1.7 1 x manual instrucciones y tabla de referencias RID.

8.2 Materiales necesarios pero no suministrados:

- 8.2.1 Equipamiento para la colección y preparación de las muestras, p.ej. tubos de muestras, centrífuga, etc.
- 8.2.2 Pipetas para una adecuada dilución de las muestras y controles.
- 8.2.3 Micropipetas para la aplicación de las muestras. Estas deberán dispensar 10µL exactos. Recomendamos las Binding Site Micropipettes (Artículo AD041) o jeringuillas 'Hamilton'.
- 8.2.4 Lupa de joyero (Artículo AD040) o Digital RID Plate Reader (lector digital de microplacas RID, Artículo AD400) para un aumento y medición exacta del diámetro del aro precipitado hasta 0,1mm.
- 8.2.5 Papel milimetrado.

8.3 Preparación de los reactivos

8.3.1 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. Nota: En caso de verse en la tapa de la placa condensación, colocar la placa boca abajo hasta haber quitado la tapa, evitando así que caigan gotas dentro del gel. Asegurarse de que la placa no tenga daños durante el almacenamiento (p.ej. Grietas en el gel). Abrir la tapa y dejar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos (si fuese necesario, más tiempo) para permitir la evaporación de la condensación. ¡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 solo se vaya a emplear una parte de los 14 pocillos o para la medición de muestras con sospecha de una elevada concentración de antígeno. En estas muestras se puede llegar a una amplia difusión del antígeno, por lo que en zonas apartadas de la placa se reduce la concentración de anticuerpos. Tras el uso parcial, las placas deberán guardarse en su sobre hermético bien cerrado entre 2 y 8°C con los separadores puestos. Guardar las placas divididas boca arriba y utilizar dentro de las siguientes 4 semanas.

8.3.2 Calibrador

El calibrador liofilizado se reconstituirá con el volumen de agua destilada indicado en la etiqueta del vial – usar el agua destilada suministrada con el kit. Antes del uso, todo el material contenido en la botella debe haberse diluido completamente (invirtiendo el vial) en un tiempo mínimo de treinta minutos. Los calibradores están prediluidos y se aplican directamente a la placa. Los calibradores de rango medio y bajo tan sólo se utilizarán cuando se realice una curva de calibración, como en los procedimientos DOS y TRES.

8.3.3 Control

El control liofilizado se reconstituye con el volumen de agua destilada indicado en la etiqueta del vial. Se mezclará cuidadosamente por inversión hasta total dilución del contenido. Se aplicará directamente a la placa(s) diluidos 1/2 (1 parte en 2) (p.ej. 25µL de control se mezclarán con 25µL del diluyente albúmina sérica al 7%)

8.3.4 Muestras

Las muestras se deben diluir a 1/2 (p.ej. 1 parte en 2) antes del ensayo. Para obtener la precisión adecuada se recomienda que 25µL de la muestra a testar se mezclen con 25µL del diluyente (7% BSA). Las muestras con niveles elevados de C1q pueden requerir factores de dilución mayores. En estos casos un volumen mínimo de 25µL de la muestra a testar se mezclará con el volumen adecuado del diluyente. Para las muestras que tengan niveles de C1q por debajo del nivel de detección de las placas se recomienda lo siguiente:

- i) Aplicar las muestras sin diluir
- ii) Concentrar las muestras
- iii) Llenar dos veces el pocillo (ver sección 8.5)

8.4 Procedimientos

8.4.1 Procedimiento UNO: Tabla de referencia RID

Este método no requiere la construcción de una curva de calibración – concentraciones de muestra 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 96 horas. Para comprobar el correcto funcionamiento se dispensa el calibrador alto en cada placa.

8.4.2 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 96 horas. Se recomienda realizar una curva de calibración para cada placa. En este caso deberá ser aplicado en la placa un alto calibrador como control.

8.4.3 Procedimiento TRES: Curva de calibración antes de conclusión.

En este método se utilizan los tres calibradores para confeccionar una curva de calibración que es no-lineal, al medirse los aros antes de conclusión. El tiempo mínimo de difusión se recomienda que sea 42 horas. Debe realizarse una curva de calibración para cada placa utilizada.

8.5 Aplicación del calibrador y las muestras

Los calibradores, control y muestras deberán mezclarse bien antes de la aplicación. Llenar el número de pocillos necesario con 10µL de calibrador alto usando una micropipeta. Si va a seguirse el Procedimiento DOS o TRES, llenar también con las diluciones del calibrador medio y bajo. Los pocillos restantes se llenarán con 10µL de muestras diluidas apropiadas y control. No deben dejarse las placas abiertas por largos períodos durante la aplicación de calibradores, controles y muestras, ya que podría provocar que el gel se seque.

Nota: Para aquellas muestras sospechosas de contener concentraciones bajas de C1q, se puede rellenar dos veces los pocillos. Se rellena el pocillo primero con 10µL de muestra y se deja difundir completamente en el gel, 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 10µL) 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 con tapa y toallitas húmedas). El tiempo de incubación mínimo para el Procedimiento TRES es de 42 horas y para difusión completa (Procedimientos UNO y DOS) es de 96 horas. El diámetro final del anillo puede verse afectado por la temperatura, el tamaño esperado para el calibrador alto es de 8mm (±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 una muestra tras su reconstitución. 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 mediante una lupa de joyero o un lector digital de microplacas RID, con una precisión de 0,1mm. Cuando se utilice la Lupa de joyero usar luz brillante lateral y fondo oscuro. Si resulta difícil, ver la placa macroscópicamente y marcar los límites de los aros usando una aguja, la distancia entre estas marcas es más fácilmente medible.

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 han aumentado. El calibrador alto debe dar un diámetro de aro de 8.0mm ± 0.3mm a conclusión. Si el diámetro del aro está fuera de este rango, ver Resolución de Problemas (Sección 10.3).

Procedimiento UNO

Leer las concentraciones de la muestra directamente de la tabla de referencia de RID. Las concentraciones de las muestras que tengan aros superiores en diámetro al del calibrador alto deberán considerarse tan sólo aproximadas ya que ha podido haber una difusión incompleta, estas muestras pueden afectar a los anillos de muestras situadas en pocillos muy cercanos. Estas muestras se deberían diluir y volver a testar. Las muestras con diámetros de anillos inferiores al del calibrador bajo, estarían en el límite de la tabla de referencia RID y se deberían volver a testar más concentradas (ver sección 8.3.4) **EL uso de la tabla de referencia RID significa que las muestras se han dispensado diluidas 1/2 tal y como se recomienda en el protocolo, cualquier cambio realizado se debe tener en cuenta para realizar los cálculos de los resultados.**

Ejemplo:

Muestras	Dilución	Diámetro (D) del aro (mm)	Valor tabla (mg/L)	Conc. muestra original (mg/L)
C1q Suero A	1/2	6,4	115	115
C1q Suero B	1/2	>10	>410	>410
C1q Suero B (Repetición)	1/4	8,0	230	460*

*Calculado como sigue: Valor de la tabla x dilución recomendada/dilución actual, p.ej. 230mg/L x (1/2)/(1/4). Los calibradores están prediluidos y se aplican a la placa sin diluir (no diluidos 1/2). Por lo tanto el calibrador alto (115mg/L) da un anillo de 8.0mm equivalente a una concentración de muestra original de 115 x 2 = 230mg/L, valor de la tabla de referencia IDR.

Procedimiento DOS

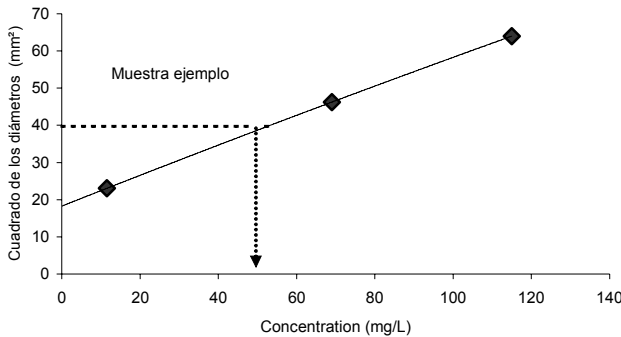
Representar gráficamente el cuadrado de los diámetros de los aros de precipitación formados por los tres calibradores contra sus concentraciones correspondientes (indicados en la etiqueta del calibrador). Las concentraciones de C1q se trazan en el eje horizontal (x) y los cuadrados de los diámetros de 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 17-23mm². La concentración de C1q se determina por la curva de calibración. Importante: recordar posibles diluciones empleadas y ajustar correspondientemente.

Cálculo de la muestra:

Los calibradores C1q dan los siguientes diámetros en un test de C1q a conclusión

Calibrador	Conc. (mg/L)	Diámetro (D) del aro (mm)	D al cuadrado (mm ²)
Alto	115	8,0	64,0
Medio	69,0	6,8	46,2
Bajo	11,5	4,8	23,0

La curva de calibración se dibuja siguiendo estos resultados:



Una muestra desconocida, diluida 1/2 como se recomienda, da 6,3mm de diámetro de anillo en esta placa. A partir de la curva, esto corresponde a una concentración C1q de 52mg/L. Por otra parte, la concentración de C1q en la muestra no diluida = 52 x 2 = 104mg/L

Procedimiento TRES

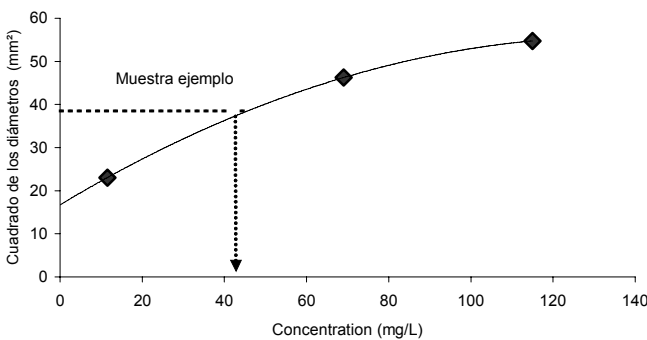
Trazar la curva de calibración según el método DOS. No se obtiene una línea recta pero si una curva, decreciente según aumenta la concentración de proteínas. El punto de intersección del eje "y" debe ser como el del método DOS. La lectura de las concentraciones se leen de la curva de calibración. Importante: recordar posibles diluciones empleadas y ajustar correspondientemente.

Cálculo de la muestra:

Los calibradores C1q dieron los siguientes anillos en una placa C1q después de 42 horas:

Calibrador	Concn. (mg/L)	Diámetro (D) del aro (mm)	D cuadrado (mm ²)
Alto	115	7,4	54,8
Medio	69	6,8	46,2
Bajo	11,5	4,8	23,0

La curva de calibración se dibuja siguiendo estos resultados:



Una muestra desconocida, diluida 1/2 como se recomienda, da un aro de 6,2mm en esta placa. En la curva correspondiente esto da lugar a una concentración de C1q de 44mg/L. Por lo tanto, la concentración de la muestra no diluida = 44 x 2 = 88mg/L

10 LIMITACIONES

10.1 El método UNO facilita resultados exactos solo para el rango indicado en la tabla de referencias RID. Se debe tener en cuenta, que diámetros de aro mayores que los del calibrador sin diluir (8,0mm) son sólo aproximados (ver Sección 9). Los resultados para los métodos DOS y TRES están limitados por el trazado correcto de la curva de calibración estándar. No se recomienda efectuar una extrapolación de los valores obtenidos. Muestras con resultados fuera de estos rangos deben ser testadas de nuevo con una dilución o concentración adecuadas (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 prueba.
2. Muestra	i) Omisión de la muestra	Repetir prueba.
	ii) Concentración demasiado alta/baja.	Diluir / concentrar y repetir prueba.
3. Calibrador(es) y muestras	Deterioro placa.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir prueba con placa nueva.
		b) Producto caducado. Repetir prueba con nueva placa o kit.
B. Aros demasiado grandes para		
1. Calibrador alto (más de 8,3mm)	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 10µL.
	iii) Aplicación de volumen inexacto.	a) Mal funcionamiento de la micropipeta – verificar funcionamiento y repetir prueba.
		b) Error de procedimiento – Repetir prueba.
	iv) Reconstitución del calibrador incorrecto.	a) Mal funcionamiento de la micropipeta – verificar funcionamiento y repetir prueba con nuevo calibrador.
	b) Error de procedimiento – Repetir prueba utilizando calibrador nuevo.	
	v) Evaporación parcial del calibrador durante el almacenamiento.	Repetir prueba con nuevo calibrador / kit.
	vi) Deterioro placa.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir con placa nueva.
b) Producto caducado. Repetir con un kit nuevo.		
vii) Reducción de anticuerpos locales por concentración demasiado alta en la muestra.	Diluir las correspondientes muestras y repetir la prueba con una placa nueva.	
viii) Temperatura de incubación demasiado elevada (ver punto 8.6).	Repetir prueba incubando a 20-24°C.	
2. Resultados de muestras por encima del rango aceptado - ver sección 10.1).	i) Concentración demasiado alta	Diluir y repetir la prueba.
	ii) Aplicación incorrecta de volúmenes	Comprobar que se ha aplicado un volumen de 10µL.
C. Aros demasiado pequeños para		
1. Calibrador alto (menos de 7,7mm)	i) Medición inexacta del aro.	} Ver B1
	ii) Aplicación de volumen incorrecto.	
	iii) Aplicación de volumen incorrecto	
	iv) Reconstitución incorrecta del calibrador.	
	v) Deterioro del calibrador	
vi) Temperatura de incubación demasiado elevada (ver punto 8.6).	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir con placa nueva.	
	b) Producto caducado. Repetir con un kit nuevo.	
2. Muestras (por debajo del rango aceptable – ver punto 10.1).	i) Concentración demasiado baja.	Ver punto 8.3.4 y repetir prueba.
	ii) Aplicación de volumen incorrecto.	Verificar si se ha aplicado el volumen de 10 µL.
D. Aros dobles/Múltiples		
i) Precipitación no específica cerca del pocillo (motivo: PEG en el gel).	ii) Error en el procedimiento.	Leer aro exterior.
		a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir prueba con calibrador nuevo.
		b) Producto caducado. Repetir prueba con nuevo kit
iii) Deterioro del calibrador.	Repetir prueba con muestra reciente.	
iv) Deterioro muestra.	i) Error en el procedimiento.	Repetir prueba.
		a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir con placa nueva.
		b) Producto caducado. Repetir prueba con kit/placa nueva.
		Repetir prueba reduciendo el tiempo de apertura de la placa. Incubar en una cámara húmeda cerrada.
iii) Gel se ha secado durante la aplicación de la muestra o durante la incubación.	ii) Gel se ha secado antes del empleo.	Diluir muestras y repetir prueba.
		Repetir prueba reduciendo el tiempo de apertura de la placa. Incubar en una cámara húmeda cerrada.
iv) Reducción de anticuerpos locales por concentración demasiado alta en la muestra.	i) La placa ha sido	Repetir prueba.
		Repetir prueba con placa

Problema	Posible(s) causa(s)	Sugerencia(s)
	congelada.	correctamente almacenada. Verificar almacenado.
	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 placa correctamente almacenada. Verificar almacenado.
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 (valido también para el calibrador medio y bajo).
	iii) Curva de calibración mal trazada.	Verificar trazado curva de calibración.
2. Punto de intersección con el eje "y" fuera de rango (ver punto 9).	i) Tamaño de los aros de los calibradores demasiado grandes o pequeños.	Ver B1 o C1 (valido también para el calibrador medio y bajo).
	ii) Curva de calibración mal trazada.	Verificar trazado curva de calibración.

10.4 El diagnóstico y tratamiento no debe basarse solo en la cuantificación de C1q. Se deben tener en cuenta el historial así como otras pruebas clínicas.

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

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

11 VALORES ESPERADOS

Los siguientes resultados se han obtenido en muestras de donantes de sangre.

	No de muestras	Media (mg/L)	Mediana (mg/L)	Desviación Standard	Rango percentil 95 (mg/L)
Hombres sanos	62	163	155	35	118-238
Mujeres sanas	60	158	151	33	118-244
Activo SLE	14	117	122	52	33-209
Inactivo SLE	17	128	126	28	93-183

Los resultados antes indicados se obtuvieron de un colectivo normal pero limitado numero de donantes del Reino Unido y también de pacientes, pero tan sólo son orientativos. Se recomienda encarecidamente se determinen, a ser posible, rangos normales locales.

12 CARACTERISTICAS

12.1 Precisión

La precisión (reproducibilidad) de este kit se expresa como el porcentaje de coeficiente de variación (CV) que ha sido determinado utilizando muestras de suero humano que contienen concentraciones elevadas, medias y bajas de C1q. Todas las pruebas se han realizado en nuestro laboratorio. Cada valor se ha calculado a partir de diez mediciones (determinaciones duplicadas en cinco placas distintas de un lote determinado) si no se especifica lo contrario. Para los procedimientos UNO y DOS los anillos se han medido después de 96 horas de difusión. Para el procedimiento TRES los anillos se han medido a las 42 horas.

Pool de muestras C1q	Procedimiento 1		Procedimiento 2		Procedimiento 3	
	Conc. media (mg/L)	CV %	Conc. media (mg/L)	CV %	Conc. media (mg/L)	CV %
Alto	191,6	1,76	189,0	2,23	178,2	7,62
Medio	125,7	4,77	119,2	4,63	118,0	7,85
Bajo	44,96	6,90	39,59	7,82	42,55	8,55

12.2 Variación intra-placa y variación inter-lote:

La variación intra-placa se expresa como la media \pm desviación standard de las determinaciones de los CV realizados usando 3 placas de lotes distintos. Se realizan seis mediciones por placa, utilizando un pool de sueros humanos como muestras.

La variación inter-lote se expresa como el CV de la media de valores de diámetro obtenidos de un pool de sueros humanos utilizando lotes recientes, La media de diámetro de cada lote se determinó por seis mediciones por placa y dos placa por lote.

C1q	Variación intra-placa	Variación inter-lote
	Media CV % \pm SD	CV (%)
	0,79 \pm 0,16 (N=3)	0,23 (N=3)

13 BIBLIOGRAFIA

- Cooper. NR. (1985). The classical complement pathway: Activation and regulation of the first complement component. Adv. Immunol. **37**, 151-216
- Arlaud, GJ *et al* (1987). A functional model of the human C1 complex. Immunol. Today, **8**, 106-111
- Ross, SC & Densen, P (1984). Complement deficiency states and infection: Epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. Medicine, **63**, 243-273
- Schifferli, J A *et al*. (1986). The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. New Eng. J. **315**, 488-495
- 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., p 370.
- Mancini, G, Carbonara, A O *et al* (1965). Immunochemical quantification 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 Reconstituir los calibradores y el control con el agua destilada incluida en el kit.
- 14.3 Preparar diluciones 1/2 de las muestras y el control con el diluyente (7% BSA) incluido en el kit
- 14.4 Dejar que la condensación de las placas de RID desaparezca.
- 14.5 Dispensar los calibradores, controles y muestras en las placas de RID. El volumen a dispensar es de 10 μ L
- 14.6 Tapar de nuevo la placa e incubar a temperatura (aproximadamente 20-24°C) por un tiempo determinado (mínimo 42 horas) (Procedimiento TRES) o hasta que los anillos se hayan completado (mínimo 96 horas) (Procedimiento UNO y DOS).
- 14.7 Medir el diámetro de los aros.
- 14.8 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).

15 TABLA REFERENCIA RID

Tabla referencia RID para C1q Humano
Concentraciones en mg/L

Diámetro del anillo (mm)	Conc.
4,5	11,0
4,6	15,5
4,7	20,2
4,8	25,0
4,9	29,8
5,0	34,8
5,1	39,8
5,2	45,0
5,3	50,2
5,4	55,6
5,5	61,1
5,6	66,6
5,7	72,3
5,8	78,0
5,9	83,9
6,0	89,8
6,1	95,9
6,2	102
6,3	108
6,4	115
6,5	121
6,6	128
6,7	134
6,8	141
6,9	148
7,0	155
7,1	162
7,2	169
7,3	176
7,4	184
7,5	191
7,6	199
7,7	206
7,8	214
7,9	222
8,0	230
8,1	238
8,2	246
8,3	254
8,4	263
8,5	271
8,6	280
8,7	289
8,8	297
8,9	306
9,0	315
9,1	324
9,2	333
9,3	343
9,4	352
9,5	361
9,6	371
9,7	381
9,8	390
9,9	400
10,0	410

Nota: Los valores antes citados corresponden a muestras diluidas 1/2 y un volumen de 10 μ L. El diámetro de aro del calibrador alto debe dar un diámetro a punto final de 8,0 \pm 0,3mm con una temperatura de incubación de 20-24 °C.