

HUMAN COMPLEMENT C2 NL BINDARID™ RADIAL IMMUNODIFFUSION KIT

For *in vitro* diagnostic use only

Product Code: RN022.3

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

Product manufactured by:

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

Telephone: +44 (0) 121 436 1000

Fax: +44 (0) 121 430 7061

e-mail: info@bindingsite.co.uk



1 INTENDED USE

This kit is intended for quantifying human C2 in serum as an aid in the diagnosis of complement deficiencies.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

C2 is a β 1-glycoprotein which forms part of the classical complement pathway. It is cleaved by activated C1s into two fragments, C2a and C2b. C2a, a serine protease, then combines with C4b to produce C3 or C5 convertase. Reduced C2 serum concentrations result from classical complement pathway activation, i.e. from immune complex mediated activation. C2 deficiency is the most common inherited complement component deficiency, and is associated with systemic lupus erythematosus, glomerulonephritis and vasculitis (ref. 1).

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. 2) and Mancini *et al.* (refs. 3 & 4).

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

- RID plates** (supplied in foil pouches). These contain monospecific antibody to C2 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% benzamideine.
- Calibrator**. This is supplied lyophilised. The concentration of C2 is given on the vial label. Preservatives: 0.099% sodium azide, 0.1% EACA, 0.01% benzamideine.
- 7% Bovine Serum Albumin (BSA) solution**. This is supplied in stabilised liquid form and is included for use as a diluent. Preservatives: 0.099% sodium azide, 0.1% EACA, 0.01% benzamideine.
- Control**. This is supplied lyophilised. The expected C2 concentration is marked on the vial label. Preservatives: 0.099% sodium azide, 0.1% EACA, 0.01% benzamideine.
- Distilled water**. For reconstituting the lyophilised calibrator and control. Preservative: 0.099% sodium azide.

5 CAUTION

All donors of human plasma 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 and other kit components contain 0.099% sodium azide as a preservative. Handle with caution - do not ingest or allow contact with skin and mucous membranes. If contact does occur wash with a large volume of water and seek medical advice. Explosive metal azides may be formed with the lead and copper plumbing; on disposal of reagent flush with large volumes of water to prevent azide build up.

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

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

6 STORAGE AND STABILITY

The unopened kits should be stored at 2-8°C and can be used until the expiry date given on the kit box label. DO NOT FREEZE. The expiry dates of individual components are given on the component labels. RID plates should be stored at 2-8°C and are damaged by temperature extremes. Freezing will destroy the gel; therefore RID plates should be kept away from cooling elements in refrigerators. High temperatures should also be avoided as this will result in moisture loss from the gel, affecting performance. Unopened plates should be stored flat and upside down (pouch label uppermost) to prevent condensation accumulating in the wells. Handle plates with care to prevent gel damage.

Unopened calibrators and controls should be stored at 2-8°C. Once 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) (do not store in self-defrosting freezer). 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:

- 3 x *Human Complement C2 NL Bindarid* (radial immunodiffusion plates in foil pouches)
- 8 x *Gel Dividers*
- 1 x *Human C2 NL Calibrator* (lyophilised)
- 1 x 5mL 7% *BSA Solution*
- 1 x *Human C2 Control Serum* (lyophilised)
- 1 x 5mL *Distilled water*
- 1 x instruction leaflet, including RID reference table

8.2 Materials required but not provided:

- Equipment for collection and preparation of test samples, e.g. sample tubes, centrifuge etc.
- Pipettes for accurate reconstitution of calibrators and control and dilution of samples.
- Micropipettes for sample application. These should be capable of accurately delivering 10 μ L volumes. Binding Site Micropipettes (code AD041) or 'Hamilton' syringes are recommended.
- Jeweller's Eyepiece (code AD040) or Digital RID Plate Reader (AD400) for magnifying and accurately measuring the precipitin ring diameters to 0.1mm.
- 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 calibrator 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 calibrator is pre-diluted and should be applied to the plates neat, mixing gently immediately before use. Dilutions of the calibrator must be made if a calibration curve is required (as for Procedures TWO and THREE). These dilutions should normally be a medium dilution (60%, i.e. 6 parts in 10) and a low dilution (20%, i.e. 2 parts in 10). It is recommended that 120 μ L of calibrator is mixed with 80 μ L of the diluent provided (7%BSA) for a 60% dilution and 40 μ L calibrator is mixed with 160 μ L of the diluent for a 20% dilution.

8.3.3 Control

The C2 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) neat.

8.3.4 Sample

Samples should be applied neat to the plates. Mix gently before use. If samples containing high levels of C2 concentrations are to be measured, a dilution will be necessary. In such cases it is suggested that to obtain adequate accuracy a minimum volume of 10 μ L of test sample is mixed with the appropriate volume of BSA. For samples having C2 concentrations below the detection limit of the plates one of the following is recommended:

- Concentrate the sample
- 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 120 hours. The neat 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, the neat calibrator plus the two dilutions are used to produce a linear calibration curve. Rings must be allowed to develop to completion which will require a minimum diffusion time of 120 hours. To conserve wells, one calibration curve can be used concurrently for several plates of the same batch. In such cases, the neat 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, the neat calibrator plus the two dilutions are used to produce a calibration curve which is non-linear, as the rings are measured before completion. The minimum recommended diffusion time is 18 hours. It is advisable that a separate calibration curve is constructed for each plate used.

8.5 Application of calibrators and samples

The calibrator (including the two dilutions if required), 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 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 C2, 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 18 hours and for complete diffusion (Procedures ONE and TWO) is 120 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. 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 digital 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 neat 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 10.2).

A faint outer precipitin ring may be visible with some samples; this does not adversely affect the quantification of C2 which should be determined by measurement of the inner, stronger ring.

Procedure ONE

The concentration of the C2 in each test sample can be read directly from the RID reference table.

Concentrations obtained for samples giving ring diameters greater than the neat 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).

Example:

Test sample	Dilution	Ring diameter (mm)	Table value (mg/L)	Original sample conc. (mg/L)
C2 Serum A	Neat	6.4	17.9	17.9
C2 Serum B	Neat	>10	>64.2	>64.2
C2 Serum B (Repeat)	1/2	7.7	32.3	64.6*

*Calculated as follows: Table value x Recommended diln/Actual diln, i.e. 32.3mg/L x (1)/(1/2).

Procedure TWO

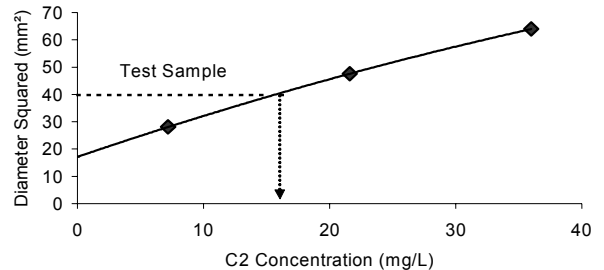
Plot the square of the diameters of the precipitin rings formed by the neat calibrator plus the two dilutions, versus their C2 concentrations (given on the calibrator vial label). C2 concentrations should be along the horizontal (x) axis, ring diameters squared along the vertical (y) axis. A line of best fit is drawn through the three points; the y-intercept should be in range 17-22mm². The C2 concentration is determined from the calibration curve; remember to adjust the sample concentration obtained by any dilution factor used.

Sample calculation:

C2 calibrators (i.e. the neat calibrator plus the two dilutions) gave the following ring diameters on a C2 test plate at completion:

Calibrator	Conc. (mg/L)	Diameter (D) of ring (mm)	D squared (mm ²)
Neat	36	8.0	64.00
60%	21.6	6.9	47.61
20%	7.2	5.3	28.09

A calibration curve was plotted using these results:



An unknown sample, applied neat as recommended, gave a 6.3mm diameter ring on this plate. From the above curve, this corresponds to a C2 concentration of 16.1mg/L.

Procedure THREE

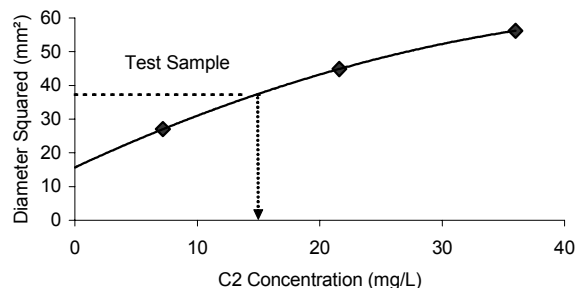
Plot the calibration curve as for procedure TWO. The graph will not be a straight line but a curve, the gradient of which decreases with increasing protein concentration. The y-intercept should be as indicated for Procedure TWO. Test sample protein concentrations are read off the calibration curve.

Sample calculation:

C2 calibrators F (i.e. neat calibrator plus the two dilutions) gave the following ring diameters on a C2 plate after 18 hours:

Calibrator	Conc. (mg/L)	Diameter (D) of ring (mm)	D squared (mm ²)
Neat	36	7.5	56.3
60%	21.6	6.7	44.9
20%	7.2	5.2	27.0

A calibration curve was plotted using these results:



An unknown sample, applied neat as recommended, gave a 6.1mm ring on this plate. From the above curve, this corresponds to a C2 concentration of 14.9mg/L.

10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

10.1 For Procedure ONE, results generated from ring diameters greater than the neat 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 TROUBLE SHOOTING

Problem	Possible Causes(s)	Suggested Action(s)
A. No ring for:		
1. Calibrator(s)	Calibrator omitted.	Repeat assay.
2. Test sample	i) Sample omitted.	Repeat assay.
	ii) Concentration too high/low	Dilute/concentrate and reassay.
3. Calibrator(s) and test samples	Plate deterioration.	a) Storage damage. Repeat assay using new plate. b) Product expired. Repeat assay using new plate/kit.
	B. Oversize rings for:	
1. Neat calibrator (more than 8.3mm)	i) Inaccurate ring measurement.	Remeasure using eyepiece or digital 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.

Problem	Possible Causes(s)	Suggested Action(s)
2. Test samples (above acceptable range - see section 10.1)	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 (below 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. Neat 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.
	v) Faint outer ring.	Read inner stronger ring. See Section 9.
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.

10.3 Diagnosis cannot be made and treatment must not be initiated on the basis of C2 measurements alone. Clinical history and other laboratory findings must be taken into account.

10.4 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 C2 serum concentrations results were obtained using this kit using individual blood donors.

	Mean (mg/L)	SD (n-1)	Median (m)	95 Percentile range	No of samples
C2	19.61	3.33	19.2	14 - 25	80

The data provided above has been obtained from limited numbers of British blood donors and is intended for guidance purposes only. It is strongly recommended that each user should generate his/her own C2 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 C2. 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 120 hours. For Procedure THREE, rings were read after 18 hours.

SAMPLE POOL C2	Procedure 1		Procedure 2		Procedure 3	
	Mean conc. mg/L	CV	Mean conc. mg/L	CV	Mean conc. mg/L	CV
High	34.47	2.14	35.06	2.72	30.98	5.43
Medium	24.3	3.71	23.48	4.42	21.1	4.69
Low	14.6	4.57	12.48	6.68	13.16	5.59

12.2 Within-plate and inter-batch variation:

The within-plate variation is expressed as the mean \pm standard deviation of determinations of CV made using 5 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 for a human serum pool sample using 5 recent batches of plates. The mean diameter for each batch was determined from six ring measurements per plate, one plate per batch.

C2	Within-plate variation	Inter-batch variation
	Mean CV% \pm SD	CV (%)
	0.86 \pm 0.41 (N=5)	1.37 (N=5)

13 BIBLIOGRAPHY

- PRU Handbook (1999), 6th Ed, Milford Ward, A *et al* (ed), PRU Publications, Sheffield, UK.
- Fahey, J.L. & McKelvey, E.M. (1965). Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.* **94**, 84-90.
- Mancini, G, Vaerman, J P *et al.* (1964). Protides of the biological fluids (XI Colloquium). Peters H. (ed), 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 SUMMARY OF PROCEDURE

- Select Procedure ONE, TWO or THREE. Procedure THREE must be used if results are required quickly.
- Reconstitute calibrator and control with the distilled water provided.
- Prepare calibrator dilutions (required for Procedures TWO and THREE).
- Allow condensation to evaporate from RID plate(s).
- Apply calibrator(s), control and samples to RID plate(s) in 10µL volumes.
- Replace lid and incubate at room temperature (approximately 20-24°C) for fixed time period (minimum 18 hours) (Procedure THREE) or until rings are complete (minimum 120 hours) (Procedure ONE and TWO).
- Measure the ring diameters.
- Read results off RID Reference Table (Procedure ONE) or plot calibration curve and read off results (Procedures TWO and THREE).

RID reference table for Human C2
Concentrations in mg/L

Diameter of ring (mm)	Conc.
4.5	1.72
4.6	2.43
4.7	3.16
4.8	3.91
4.9	4.67
5.0	5.44
5.1	6.23
5.2	7.04
5.3	7.86
5.4	8.70
5.5	9.55
5.6	10.4
5.7	11.3
5.8	12.2
5.9	13.1
6.0	14.1
6.1	15.0
6.2	16.0
6.3	17.0
6.4	17.9
6.5	19.0
6.6	20.0
6.7	21.0
6.8	22.1
6.9	23.2
7.0	24.2
7.1	25.4
7.2	26.5
7.3	27.6
7.4	28.8
7.5	29.9
7.6	31.1
7.7	32.3
7.8	33.5
7.9	34.7
8.0	36.0
8.1	37.3
8.2	38.5
8.3	39.8
8.4	41.1
8.5	42.5
8.6	43.8
8.7	45.2
8.8	46.5
8.9	47.9
9.0	49.3
9.1	50.7
9.2	52.2
9.3	53.6
9.4	55.1
9.5	56.6
9.6	58.1
9.7	59.6
9.8	61.1
9.9	62.6
10.0	64.2

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

KOMPLEMENT C2 (HUMAN) BINDARID™ KIT FÜR DIE RADIALE IMMUNDIFFUSION

Nur zur *in vitro* Diagnostik

Bestell-Nr.: RN022.3

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

In England hergestellt von:

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

Vertrieb in Deutschland und Österreich durch:

The Binding Site GmbH, Robert-Bosch-Straße 2A
D-68723 Schwetzingen, Deutschland.

Telefonnummer: +49 (0) 6202 92 62 0

Fax: +49 (0) 6202 92 62 222

e-mail: office@bindingsite.de



1 VERWENDUNGSZWECK

Zur quantitativen Bestimmung von humanem C2 im Serum. Der Kit unterstützt die Diagnose von Komplementdefekten.

2 EINFÜHRUNG

C2, ein Beta-1-Glykoprotein, ist ein Bestandteil des klassischen Komplementweges. Es wird durch aktiviertes C1s in zwei Fragmente gespalten: C2a und C2b. C2a, eine Serin-Protease, bildet zusammen mit C4b die C3- oder C5-Konvertase. Erniedrigte C2-Serumkonzentrationen werden durch die Aktivierung des klassischen Komplementweges verursacht, z.B. durch eine Immunkomplex-vermittelte Aktivierung. Die C2-Defizienz ist der häufigste, erbliche Komplementdefekt und ist mit systemischem Lupus erythematodes, Glomerulonephritis und Vaskulitis assoziiert (Ref. 1).

Die Methode der Radialen Immundiffusion (RID) basiert prinzipiell auf den Arbeiten von Fahey & McKelvey (Ref. 2) und Mancini *et al.* (Ref. 3, 4) und ist für die routinemäßige, quantitative Bestimmung von löslichen Antigenen (Proteine) aus Körperflüssigkeiten geeignet.

3 PRINZIP

Lösliche Proteine werden in kreisförmige Vertiefungen eines Agarosegels aufgetragen. Das Antigen diffundiert dann radial in das Gel, in dem der korrespondierende, monospezifische Antikörper gleichmäßig verteilt ist. Es werden Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet, die unter den richtigen Bedingungen Präzipitationsringe bilden. Die Ringgröße nimmt so lange zu, bis sich ein Gleichgewicht zwischen der Bildung und dem Abbau dieser Komplexe einstellt. Dies wird als Diffusionsendpunkt bezeichnet und hier besteht eine lineare Beziehung zwischen den Quadraten der Ringdurchmesser und der Antigenkonzentration. Eine Standardkurve kann erstellt werden, indem die quadrierten Ringdurchmesser der Standards gegen ihre Konzentration aufgetragen werden. Die Antigenkonzentration einer unbekannt Probe 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 Referenztabelle, die auf einer idealen linearen Standardkurve basiert, abgelesen. Bei Methode 3 werden die Ringdurchmesser vor dem Erreichen des Diffusionsendpunktes abgelesen und die Standardkurve ist nicht linear.

4 REAGENZIEN

- 4.1 Immundiffusionsplatten (in Folienbeutel eingeschweißt): enthalten monospezifisches Antiserum gegen C2 in einem Agarosegel. Auf jeder Platte können 14 Bestimmungen (inklusive Kalibratoren und Kontrollen) durchgeführt werden. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA (E-Amino-n-Capronsäure) und 0,01% Benzamidin.
- 4.2 Der Kalibrator: liegt lyophilisiert vor und die Konzentration ist auf dem Flaschenetikett angegeben. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin.
- 4.3 Die 7 %ige Rinderserum-Albumin-(BSA)-Lösung: liegt in flüssiger, stabilisierter Form vor und ist für Verdünnungen zu verwenden. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin.
- 4.4 Die Kontrolle: liegt lyophilisiert vor. Der Sollwert ist auf dem Flaschenetikett angegeben. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin.
- 4.5 Destilliertes Wasser: Zur Rekonstitution des lyophilisierten Kalibrators und der 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 und andere Kit-Komponenten enthalten 0,099% Natriumazid als Konservierungsmittel und müssen mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen behandelt werden. Verschlucken oder Berühren mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Nach Kontakt die Hautstelle mit viel Wasser abspülen und ärztlichen Rat einholen. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohren explosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung mit ausreichender Menge Wasser nachspülen um Azidablagerungen zu vermeiden.

Es wird empfohlen den Test gemäß der vorliegenden Arbeitsanleitung durchzuführen. Die Richtigkeit der Ergebnisse, die mit einer abgeänderten Vorschrift erhalten wurden, kann nicht garantiert werden.

Reagenzien unterschiedlicher Chargen dürfen NICHT untereinander gemischt oder gemeinsam verwendet werden. Bei großem Testdurchsatz muss darauf geachtet werden, dass alle Reagenzien der GLEICHEN Charge entstammen.

6 LAGERUNG UND STABILITÄT

Den ungeöffneten Kit bei 2-8°C lagern. Er 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. Nach der Rekonstitution sind sie mindestens eine Woche bei 2-8°C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten sie aliquotiert und bei mindestens -20°C eingefroren werden. Alle anderen Kitkomponenten bei 2-8°C lagern.

7 PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

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

Für die Verdünnungen ausschließlich das im Kit enthaltene 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 C2 NL Bindarid (C2-Immendifusionsplatten, in Folie eingeschweißt)
- 8.1.2 8 x Gel Dividers (Gel-Trennplatten)
- 8.1.3 1 x Human C2 Calibrator (C2-Kalibrator, lyophilisiert)
- 8.1.4 1 x 5mL 7% BSA Solution (7% Rinder Serum-Albumin)
- 8.1.5 1 x Human C2 Control Serum (C2-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 Laborausrüstung zum Sammeln und Vorbereiten der Proben (z. B. Probenröhrchen, Zentrifuge etc.).
- 8.2.2 Pipetten zur exakten Rekonstitution von Kalibrator und Kontrolle und zur Verdünnung der Proben (falls notwendig).
- 8.2.3 Mikropipetten zum Auftragen der Proben. Diese sollten 10µL exakt pipettieren können. Wir empfehlen Mikropipetten von The 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 nicht in Vertiefungen pipettieren, die noch Kondenswasser enthalten.

Unterteilung der Platte: die Platten können vor Gebrauch mit den beiliegenden Gel-Trennplatten in bis zu vier Teile unterteilt werden. Dazu die Gel-Trennplatten vorsichtig, mit der scharfen Kante nach unten, auf dem Gel in Position bringen. Dabei muss der Stabilisierungsarm auf dem zentralen Plastiketikett aufliegen. Dann die Trennplatte fest ins Gel drücken und dort belassen.

Die Unterteilung der Platte wird empfohlen, wenn nur ein Teil der 14 Vertiefungen benutzt werden soll, oder wenn Proben gemessen werden, bei denen man eine sehr hohe 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

Den lyophilisierten Kalibrator mit dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Volumen destillierten Wassers (im Kit enthalten) 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. Vor Gebrauch mindestens 30 Minuten stehenlassen und vor dem Auftragen nochmals schütteln. Für die Erstellung einer Standardkurve (Methode 2 und 3) muss der Kalibrator entsprechend verdünnt werden. Dazu wird der Kalibrator auf 60% (Verhältnis 6/10) bzw. 20% (Verhältnis 2/10) verdünnt (60%: 120µL Kalibrator + 80µL BSA mischen; 20%: 40µL Kalibrator + 160µL BSA mischen).

8.3.3 Kontrolle

Die lyophilisierte Kontrolle mit dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Volumen destillierten Wassers (im Kit enthalten) 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. Die rekonstituierte Kontrolle unverdünnt auftragen.

8.3.4 Proben

In der Regel ist keine Verdünnung der Proben notwendig. Nur Proben, die eine hohe C2-Konzentration enthalten, müssen verdünnt werden. In solchen Fällen wird empfohlen mindestens 10µL der Probe (um eine hohe Präzision zu gewährleisten) mit einem geeigneten Volumen BSA (im Kit enthalten) zu mischen. Für Proben mit einem sehr geringen Antigengehalt, der unterhalb des Messbereichs liegt, wird folgendes empfohlen:

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

8.4 Methoden

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

8.4.1 Methode 1: RID-Referenztablelle

Hierbei ist es **nicht** nötig, eine eigene Standardkurve zu erstellen. Die Ringdurchmesser werden am Diffusionsendpunkt gemessen und die resultierenden Proteinkonzentrationen können direkt aus der beiliegenden RID-Referenztablelle (befindet sich am Ende der Arbeitsanleitung) abgelesen werden. Um sicherzustellen, dass die volle Ringgröße erreicht wird, sollte die Diffusionsdauer mindestens 120 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 120 Stunden dauern. Eine Standardkurve kann für mehrere Platten aus einer Charge verwendet werden. In diesem Fall sollte aber der unverdünnte Kalibrator zur Kontrolle auf jede Platte aufgetragen werden.

8.4.3 Methode 3: Standardkurve vor dem Diffusionsendpunkt

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

8.5 Auftragen von Kalibrator und Proben

Kalibrator(en), Kontrolle und 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 je 10µL des mittleren und niedrigen Kalibrators in je eine Vertiefung pipettieren. In die restlichen Vertiefungen je 10µL der Testproben (eventuell verdünnt) und Kontrolle pipettieren. Während des Auftragens sollte die Platte nicht unnötig lange offen stehen, damit das Gel nicht austrocknet.

Wichtig: Erwartet man bei einer Probe sehr niedrige C2-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 18 Stunden, für Methode 1 und 2 (Diffusionsendpunkt-Bestimmung) 120 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 nach der Rekonstitution immer wie eine Patientenprobe behandeln und sollte auf jede Platte aufgetragen werden. 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 eines RID-Readers bestimmen. Bei Verwendung einer Lupe ist helles Seitenlicht und ein dunkler Hintergrund sinnvoll. Sollen 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 unverdünnte Kalibrator hat am Diffusionsendpunkt einen Ringdurchmesser von 8,0mm ± 0,3mm. Liegt der Ringdurchmesser nicht in diesem Bereich, siehe "TROUBLE SHOOTING" (Abschnitt 10.2). Bei einigen Proben kann ein schwacher äußerer Präzipitationsring auftreten; der sich aber nicht nachteilig auf die Quantifizierung von C2 auswirkt. In solchen Fällen den Ringdurchmesser des inneren, stärkeren Rings bestimmen.

Methode 1: RID-Referenztablelle

Die C2-Konzentration einer Patientenprobe kann direkt aus der RID-Referenztablelle abgelesen werden.

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

Beispiel:

Probe	Verdünnung	Ringdurchmesser (mm)	Tabellenwert (mg/L)	Originalprobe Konz. (mg/L)
C2 Serum A	Unverdünnt	6,4	17,9	17,9
C2 Serum B	Unverdünnt	>10	>64,2	>64,2
C2 Serum B Wiederholung	1/2	7,7	32,3	64,6*

*Die Konzentration wurde wie folgt berechnet:
RID-Referenztabellen-Wert x empfohlener Verdünnung / tatsächliche Verdünnung: z.B. 32,3mg/L x (1)/(1/2).

Methode 2: Standardkurve am Diffusionsendpunkt

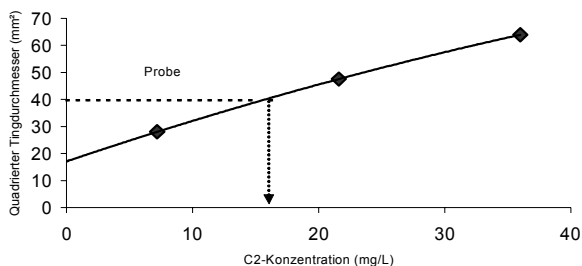
Die Ringdurchmesser der drei Kalibratoren bestimmen und die Quadrate der Ringdurchmesser gegen ihre jeweilige C2-Konzentrationen auftragen. Dabei die C2-Konzentrationen auf der Abszisse (x-Achse), die quadrierten Ringdurchmesser (mm²) und auf der Ordinate (y-Achse) auftragen. Man wählt als Linie die bestmögliche Verbindung dieser drei Punkte. Der Schnittpunkt mit der y-Achse sollte bei 17-22mm² liegen. Die C2-Konzentration der Patientenseren aus der Standardkurve ablesen. **Wichtig:** Korrektur der Probenkonzentration durch etwaige Verdünnungsfaktoren.

Berechnung der Antigenkonzentration in einem Patientenserum:

Die C2-Kalibratoren ergeben am Diffusionsendpunkt folgende Ringdurchmesser auf einer C2-RID-Platte:

Kalibrator	Konz. (mg/L)	Ringdurchmesser (mm)	Quadrierter Ringdurchmesser (mm ²)
Hoch	36	8,0	64,0
Mittel	21,6	6,9	47,61
Niedrig	7,2	5,3	28,09

Aus diesen Werten wurde die nachstehende Standardkurve erstellt:



Eine unbekannte Patientenprobe, wie empfohlen unverdünnt aufgetragen, ergibt einen Ringdurchmesser von 6,3mm auf dieser RID-Platte. Von obiger Standardkurve abgelesen entspricht dies einer C2-Konzentration von 16,1mg/L.

Methode 3: Standardkurve vor dem Diffusionsendpunkt

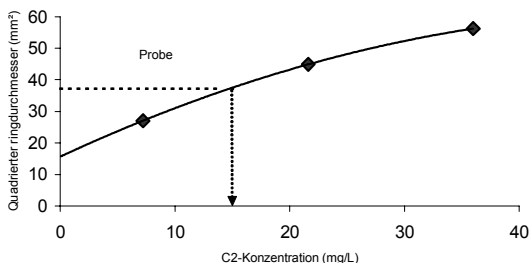
Die Standardkurve wird wie bei Methode 2 erstellt, aber man erhält keine Gerade, sondern eine Kurve. Die Kurve zeigt als Folge der unvollständigen Diffusion bei hohen Konzentrationen einen Abfall. Der Schnittpunkt mit der y-Achse sollte wie bei Methode 2 sein. **Wichtig:** Korrektur der Probenkonzentration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

Berechnung der Antigenkonzentration in einer Patientenprobe:

Die C2-Kalibratoren ergeben nach 18h folgende Ringdurchmesser auf einer C2-RID-Platte:

Kalibrator	Konz. (mg/L)	Ringdurchmesser (mm)	Quadrierter Ringdurchmesser (mm ²)
Hoch	36	7,5	56,3
Mittel	21,6	6,7	44,9
Niedrig	7,2	5,2	27,0

Aus diesen Werten wurde die nachstehende Standardkurve erstellt:



Eine unbekannte Patientenprobe, wie empfohlen unverdünnt aufgetragen, ergibt einen Ringdurchmesser von 6,1mm auf dieser RID-Platte. Von obiger Standardkurve abgelesen entspricht dies einer C2-Konzentration von 14,9mg/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 (8,0mm) sind, nur Näherungswerte sind (siehe Abschnitt 9). Bei Methode 2 und 3 wird die Richtigkeit von der erstellten Standardkurve begrenzt; eine Extrapolation über die gemessenen Werte hinaus ist nicht zulässig. Werte, die außerhalb des Standardkurvenbereichs liegen, müssen in einer entsprechend niedrigeren oder höheren Verdünnung erneut getestet werden (siehe Abschnitt 8.3.4).

10.2 TROUBLE SHOOTING

Problem	Fehlerquelle	Lösung
A. Keine Präzipitationsringe:		
1. Kalibrator(en)	Kalibrator nicht aufgetragen	Test wiederholen
2. Proben	i) Probe nicht aufgetragen ii) Konzentration zu hoch/niedrig	Test wiederholen Probe verdünnen/ ankonzentrieren
3. Kalibrator(en) und Proben	Platte unbrauchbar	a) Lagerungsschaden; Test mit neuer Platte wiederholen b) Kit abgelaufen; Test mit neuem Kit wiederholen
B. Zu große Ringe:		
1. Hoher Kalibrator (>8,3mm)	i) Ring ungenau gemessen ii) Falsches Volumen aufgetragen iii) Ungenaueres Volumen aufgetragen iv) Kalibrator während Lagerung teilweise verdunstet v) Kalibrator nicht Korrekt rekonstituiert	Erneute Messung mit Lupe oder RID-Reader Überprüfen, ob 10µL aufgetragen wurden Mikropipette defekt- Funktion überprüfen und Test wiederholen Verfahrensfehler – Test wiederholen Test mit neuem Kalibrator/Kit wiederholen a) Mikropipette defekt- Funktion überprüfen und Test wiederholen b) Verfahrensfehler – Test 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) Inkubationstemperatur zu hoch (siehe Abschnitt 8.6)	Test wiederholen: Inkubation bei 20-24°C.
2. Patientenproben (oberhalb des Wertebereichs : siehe Abschnitt 10.1)	i) Proteinkonzentration zu hoch ii) Falsches Volumen aufgetragen	Höhere Probenverdünnung – Test wiederholen. Kontrollieren, dass 10µL aufgetragen werden.
C. Zu kleine Ringe:		
1. Hoher Kalibrator (<7,7mm)	i) Ring ungenau gemessen ii) Falsches Volumen aufgetragen iii) Ungenaueres Volumen aufgetragen iv) Kalibrator nicht korrekt rekonstituiert v) Kalibrator unbrauchbar	} Siehe B1
	vi) Inkubationstemperatur zu niedrig (siehe 8.6)	
2. Patientenproben (unterhalb des Wertebereichs - siehe Abschnitt 10.1)	i) Konzentration zu niedrig ii) Falsches Volumen aufgetragen	siehe Abschnitt 8.3.4. Test wiederholen Kontrollieren, dass 10µL aufgetragen werden.
D. Doppel-/Vielfachringe:		
	i) nicht spezifische Präzipitation nahe der Vertiefung (Grund: PEG im Gel)	Außeren Ring ablesen.
	ii) Probe schlecht aufgetragen	Test wiederholen
	iii) Kalibrator unbrauchbar	a) Falsche Lagerung; Test mit neuem Kalibrator wiederholen b) Kit abgelaufen; Test mit neuem Kit wiederholen
	iv) Probe nicht brauchbar	Test mit frischem Probenmaterial wiederholen
	v) schwacher äußerer Präzipitationsring	Den Ringdurchmesser des inneren, stärkeren Rings bestimmen, siehe Abschnitt 9.
E. Ungleichmäßige Ringe		
	i) Probe nicht gleichmäßig aufgetragen	Test wiederholen
	ii) Gel vor Verwendung ausgetrocknet	a) Falsche Lagerung Test mit neuer Platte wiederholen b) Kit abgelaufen ; Test mit neuem Kit wiederholen
	iii) Gel während Probenauftrag oder Inkubation ausgetrocknet	Test mit neuer Platte wiederholen. Die Platte nur kurze Zeit offen stehenlassen. Inkubation mit festverschlossenem Deckel in in einer feuchten Kammer oder in Folie eingeschweißt.
	iv) Lokale Antikörperverminderung wegen zu hoher Antigenkonzentration	Die entsprechende Proben verdünnen und auf neuer Platte erneut testen.
F. Trübes Gel		
	i) Platte war eingefroren	Lagertemperatur überprüfen ; Test mit neuen Platten wiederholen
	ii) Gel vor Verwendung ausgetrocknet	Siehe E(ii).
	iii) Gel während Probenauftrag oder Inkubation ausgetrocknet	Siehe E(iii).
G. Brüchiges, unebenes Gel		
	Platte war eingefroren	Test mit neuer Platte wiederholen ; Lagertemperatur überprüfen

Problem	Fehlerquelle	Lösung
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.

- 10.3 Die Diagnose und die Einleitung einer Therapie darf nicht ausschließlich auf der C2-Bestimmung basieren. Das klinische Bild und andere serologische Befunde müssen ebenfalls berücksichtigt werden.
- 10.4 Zeigt eine Patientenprobe ein ungewöhnliches Ergebnis, sollte der Test wenn möglich mit einer frischen Probe wiederholt werden.

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

11 ERWARTETE WERTE

Die folgenden Werte wurden unter Verwendung Seren von individuellen Blutspendern mit diesem Kit erhalten:

	Mittelwert (mg/L)	SD (n-1)	Median (mg/L)	95 Percentile (mg/L)	Anzahl d. Proben
C2	19,61	3,33	19,2	14 - 25	80

Diese Werte wurden mit Hilfe eines britischen Blutspenderkollektivs ermittelt und dienen nur zur Orientierung. Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor eigene C2-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 C2 enthalten, bestimmt. Alle Analysen wurden im Labor von The Binding Site Limited, Birmingham durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurde jeder Wert durch 10 Messungen (Doppelbestimmungen auf 5 verschiedenen RID-Platten einer normalen Charge) bestimmt. Für Methode 1 und 2 wurden die Ringdurchmesser nach 120 Stunden, für Methode 3 nach 18 Stunden gemessen.

Proben-Pool	Methode 1 (RID-Referenztable)		Methode 2 (Standardkurve)		Methode 3 (zeitlich begrenzte Diffusion) 18h	
	Mittelwert mg/L	%VK	Mittelwert mg/L	%VK	Mittelwert mg/L	%VK
C2-Konz	34,47	2,14	35,06	2,72	30,98	5,43
Hoch	24,3	3,71	23,48	4,42	21,1	4,69
Niedrig	14,6	4,57	12,48	6,68	13,16	5,59

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 5 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 5 verschiedener Chargen gemessen wurden, ausgedrückt. Auf jede Platte der verschiedenen Chargen wurde 1 Serum-Pool aufgetragen (6 Bestimmungen pro Platte).

C2	Intra-Assay-Variation		Inter-Chargen-Variation	
	Mittlerer VK% ± SD		VK (%)	
	0,86 ± 0,41 (N=5)		1,37 (N=5)	

13 REFERENZEN

- 13.1 PRU Handbook (1999), 6th Ed, Milford Ward, A *et al* (ed), PRU Publications, Sheffield, UK.
- 13.2 Fahey, JL & McKelvey, EM (1965). Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.*, **94**, 84-90.
- 13.3 Mancini, G, Vaerman, J P *et al.* (1964). Protides of the biological fluids (XI colloquium). Peters H. (ed), Publ. Elsevier Publishing Co., Amsterdam p370.
- 13.4 Mancini, G, Carbonara, A O *et al* (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem*, **2**, 235-254.

14 KURZARBEITSANLEITUNG

- 14.1 Auswahl zwischen Methode 1, 2 oder 3. Methode 3 wird angewendet, wenn die Ergebnisse schnell benötigt werden.
- 14.2 Kalibrator und Kontrolle mit destilliertem Wasser rekonstituieren.
- 14.3 Kalibratorverdünnungen herstellen (nur für Methode 2 und 3)
- 14.4 Eventuell vorhandenes Kondenswasser verdunsten lassen (Platte 5-15 Minuten offen bei Raumtemperatur stehen lassen).
- 14.5 Kalibrator(en), Kontrolle und Proben auftragen: je 10µL.
- 14.6 Platte mit Deckel verschließen – Inkubation bei Raumtemperatur (ca. 20-24°C): mindestens 18h bei Methode 3 oder bis zum Diffusionsendpunkt (mindestens 120h bei Methode 1 und 2).
- 14.7 Messen der Ringdurchmesser.
- 14.8 Ergebnisse aus der RID-Referenztable ablesen (Methode 1) oder Kalibrationskurve erstellen und aus dieser die Ergebnisse ablesen (Methode 2 und 3).

RID-Referenz-Tabelle für C2 (Human) 'NL', Konzentrationen in mg/L

Ringdurchmesser (mm)	Konz.
4.5	1.72
4.6	2.43
4.7	3.16
4.8	3.91
4.9	4.67
5.0	5.44
5.1	6.23
5.2	7.04
5.3	7.86
5.4	8.70
5.5	9.55
5.6	10.4
5.7	11.3
5.8	12.2
5.9	13.1
6.0	14.1
6.1	15.0
6.2	16.0
6.3	17.0
6.4	17.9
6.5	19.0
6.6	20.0
6.7	21.0
6.8	22.1
6.9	23.2
7.0	24.2
7.1	25.4
7.2	26.5
7.3	27.6
7.4	28.8
7.5	29.9
7.6	31.1
7.7	32.3
7.8	33.5
7.9	34.7
8.0	36.0
8.1	37.3
8.2	38.5
8.3	39.8
8.4	41.1
8.5	42.5
8.6	43.8
8.7	45.2
8.8	46.5
8.9	47.9
9.0	49.3
9.1	50.7
9.2	52.2
9.3	53.6
9.4	55.1
9.5	56.6
9.6	58.1
9.7	59.6
9.8	61.1
9.9	62.6
10.0	64.2

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

COFFRET BINDARID™ NL DE DOSAGE DU C2 EN IMMUNODIFFUSION RADIALE

Pour un usage en diagnostic *in vitro* uniquement

Référence : RN022.3

BINDARID™ est une marque déposée de la société The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK

Produit fabriqué en Angleterre par la société :

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

Distribués en France par la société :

The Binding Site France, 14 rue des Glairaux BP226, 38522 St 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 C2 dans le sérum humain. Il apporte une aide dans le diagnostic des déficiences en complément.

2 PRESENTATION GENERALE

C2 est une B1glycoprotéine impliquée dans la voie classique du complément. Elle est clivée par le C1s en C2a et C2b. Le C2a est une protéase sérine qui combinée au C4b donne la C3 ou C5 convertase. Une diminution en C2 sérique est liée à une activation de la voie classique, c'est à dire à la présence de complexes immuns. Le déficit en C2 est le déficit non héréditaire le plus courant et est associé au lupus érythémateux disséminé, aux glomérulo-néphrites et aux vasculites (ref 1).

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. 2) et de Mancini *et al* (réfs 3 et 4).

3 PRINCIPE

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 coffret, 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 REACTIFS

- 1 **Plaques d'IDR** (fournies chacune dans un étui). Elles contiennent un anticorps monospécifique inclus dans le gel d'agarose et dirigé contre le C2. 14 échantillons (calibrateurs inclus) peuvent être mesurés sur chaque plaque. Conservateurs : azide de sodium 0,099%, acide E amino caproïque (EACA) 0,1%, benzamidine 0,01%.
- 2 **Calibrateur** : Il est fourni sous forme lyophilisée. La concentration en C2 est indiquée sur l'étiquette du flacon. Conservateurs : azide de sodium 0,099%, EACA 0,1%, benzamidine 0,01%.
- 3 **Solution d'albumine de boeuf à 7% (BSA)** : Présentée sous forme liquide stable et utilisée comme diluant. Conservateurs : azide de sodium 0,099%, EACA 0,1%, benzamidine 0,01%.
- 4 **Contrôle** : Présenté sous forme lyophilisée. La concentration en C2 est notée sur l'étiquette du flacon. Conservateurs : azide de sodium 0,099%, EACA 0,1%, benzamidine 0,01%.
- 5 **Eau distillée** : Pour la reconstitution du calibrateur et du contrôle lyophilisés. Conservateur : 0,099% d'azide de sodium.

5 PRECAUTIONS

Tous les sérums humains de ce coffret 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 coffret.

Les plaques et les autres composants du kit contiennent 0,099% d'azide de sodium comme conservateur. Ces réactifs doivent être manipulés avec précaution : ne pas avaler, éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. En cas de contact, laver à grande eau et consulter un médecin. Des azides de métaux explosifs peuvent se former avec le cuivre et le plomb. Laver à grande eau 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 STABILITE

Les coffrets fermés non ouverts 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.

Le calibrateur et le contrôle non ouverts doivent être stockés entre 2 et 8°C. Une fois ouverts et reconstitués, 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) (ne pas stocker dans un congélateur à décongélation automatique). Tous les autres réactifs sont à conserver entre 2 et 8°C.

7 PREPARATION ET COLLECTE DES ECHANTILLONS

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

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

8 MODE OPERATOIRE

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

8.1 Matériel fourni

- 1.1 3 x *Human Complement C2 NL Bindarid* (plaques d'immunodiffusion radiale fournies dans un emballage individuel)
- 1.2 8 x *Gel Dividers* (séparateurs de gel)
- 1.3 1 x *Human C2 NL Calibrator* (calibrateur liquide)
- 1.4 1 x 5mL 7% *BSA Solution* (albumine de boeuf)
- 1.5 1 x *Human C2 NL Control serum* (contrôle liquide)
- 1.6 1 x 5mL *Distilled water* (eau distillée)
- 1.7 1 x fiche technique comprenant une table de référence d'IDR

8.2 Matériel nécessaire et non fourni

- 2.1 Matériel de prélèvement et de préparation des échantillons (tubes, centrifugeuse).
- 2.2 Pipettes pour la dilution fiable des échantillons.
- 2.3 Micropipettes de précision de 10µL pour le dépôt des échantillons. Les micropipettes Binding Site (code AD041) ou les seringues «Hamilton» sont recommandées.
- 2.4 Loupe de joaillier (code AD040) ou lecteur digital de plaques d'IDR (AD400) pour mesurer plus précisément le diamètre des anneaux de précipitation (lecture à 0,1mm près).
- 2.5 Papier millimétrique.

8.3 Préparation des réactifs

8.3.1 Plaques d'IDR

Afin d'éviter la contamination des gels, les plaques doivent être utilisées dans un environnement sans poussière. Sortir la plaque de leur emballage et enlever le couvercle. Si des gouttelettes de condensation sont visibles 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: Les plaques peuvent être coupées en quatre parties en utilisant les séparateurs de gel avant utilisation. Sectionner le gel en posant délicatement le séparateur à sa surface puis appuyer fermement afin de couper le gel dans toute son épaisseur. Laisser les séparateurs en place.

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

8.3.2 Calibrateur

Le calibrateur est lyophilisé et doit être reconstitué avec le volume d'eau distillée indiqué sur le flacon. Utiliser l'eau distillée fournie dans le coffret. Avant utilisation, toute la poudre du flacon, et même celle sur le bouchon doit être complètement dissoute par renversement du flacon. Laisser 30 minutes avant utilisation. Le calibrateur est pré-dilué et doit être déposé pur sur les plaques. Mélanger avant utilisation. Des dilutions du calibrateur doivent être réalisées si une courbe de calibration est requise (Procédures 2 et 3). Ces dilutions doivent normalement être une dilution moyenne et une dilution basse. Il est recommandé que 120µL de calibrateur soit mélangé avec 80µL de diluant fourni (BSA 7%) pour la dilution à 60% et que 40µL de calibrateur soit mélangé avec 160µL de diluant pour la dilution à 20%.

8.3.3 Contrôle

Le contrôle C2 lyophilisé doit être reconstitué avec le volume d'eau distillée indiqué sur le flacon. Bien mélanger par inversion jusqu'à dilution complète de la poudre. Il doit ensuite être déposé pur.

8.3.4 Echantillons

Les échantillons ne requièrent aucune dilution. Des échantillons contenant des concentrations très élevées en C2 requièrent un facteur de dilution plus élevé. Dans ce cas, il est conseillé, pour obtenir une précision adéquate, de mélanger un volume minimum de 10µl d'échantillon avec le volume approprié de BSA. Pour des échantillons ayant une concentration en C2 inférieure à la limite de détection des plaques, il est conseillé :

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

8.4 Procédures

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 : 120 heures. Le calibrateur pur 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 du calibrateur pur et des deux dilutions du calibrateur permettra d'établir une courbe de calibration linéaire. Les diamètres des anneaux seront mesurés au point final de diffusion : 120 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 pur sur chaque plaque utilisée.

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

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

8.5 Dépôt du calibrateur, du contrôle et des échantillons

Le calibrateur (et les deux dilutions du calibrateur), le contrôle et les échantillons seront homogénéisés juste avant utilisation. Déposer dans le nombre de puits requis, 10µL de calibrateur pur en utilisant une micropipette. Si les procédures 2 ou 3 sont suivies, déposer également les deux dilutions du calibrateur. Déposer ensuite 10µL d'échantillon et de contrôle. Durant les dépôts, ne pas laisser la plaque exposée à l'air libre trop longtemps, de manière à éviter un dessèchement excessif du gel.

Note : 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. Le couvercle doit être gardé en place durant cette période. 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). Il est essentiel que le gel ne sèche pas durant cette incubation. Pour diminuer les phénomènes d'évaporation, il est recommandé de replacer la plaque dans son emballage aluminium ou de l'incuber dans une chambre humide (une boîte plastique contenant un papier absorbant humide). Le temps minimum d'incubation pour la procédure 3 est de 18 heures et pour la diffusion complète (procédures 1 et 2), il est de 120 heures. Les diamètres des anneaux de diffusion sont dépendants de la température. La taille de l'anneau pour le calibrateur haut doit être de 8mm (+/- 0,3mm) à 20-24°C. Les températures extrêmes doivent être évitées.

8.7 Contrôle de qualité

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

9 RESULTATS

Après le temps d'incubation nécessaire, mesurer les diamètres de diffusion à 0,1mm près à l'aide d'une loupe de joaillier ou d'un lecteur. La lecture à l'aide de la loupe de joaillier se fait sur un fond noir, en utilisant un éclairage latéral. Les bords des anneaux pourront être repérés macroscopiquement sur le fond de la plaque avec une aiguille, la lecture entre les marques se faisant alors plus facilement.

Note : Pour les procédures 1 et 2, la lecture doit se faire au point final de diffusion, si un doute existe, la lecture peut être refaite après 24 heures afin de vérifier que les diamètres n'ont pas augmenté. Le calibrateur pur doit donner un diamètre de l'anneau de 8,0mm +/- 0,3mm au point final de diffusion. Si le diamètre n'est pas dans cette limite, cf. section 10.2 sur les problèmes possibles.

Un léger anneau de précipitation extérieur peut apparaître sur certains échantillons ; cela n'affecte en aucune façon la quantification de C2 qui doit être déterminée par la mesure de l'anneau intérieur plus marqué.

Procédure 1 :

La concentration en C2 pour chaque échantillon peut être lue directement sur la table de référence.

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

Exemple :

Echantillons	Dilution	Diamètre de l'anneau (mm)	Valeur de la table (mg/l)	Conc. réelle de l'échantillon (mg/L)
C2 Sérum A	pur	6,4	17,9	17,9
C2 Sérum B	pur	>10	>64,2	>64,2
C2 Sérum B (second test)	1/2	7,7	32,3	64,6*

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

c'est-à-dire : 32,3mg/L x (1) / (1/2).

Procédure 2 :

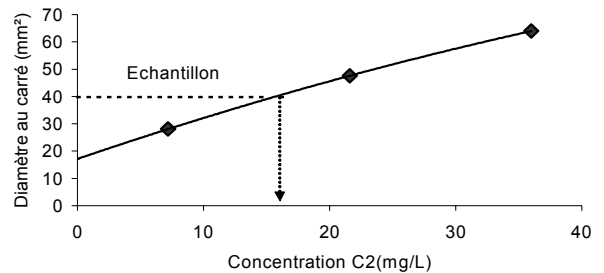
Pour tracer la courbe de calibration, reporter les diamètres au carré des anneaux de diffusion formés par les dilutions du calibrateur sur l'axe des y versus leur concentration en C2 (donnée sur l'étiquette du flacon de calibrateur) sur l'axe des x. Tracer une courbe passant par les 3 points. L'ordonnée à l'origine doit être comprise entre 17 et 22mm². La concentration en C2 est lue à partir de la courbe de calibration. Ne pas oublier de tenir compte des facteurs de dilution des échantillons.

Exemple :

Les dilutions du calibrateur C2 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)
Pur	36	8,0	64,00
60%	21,6	6,9	47,61
20%	7,2	5,3	28,09

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



Un échantillon inconnu, déposé pur comme recommandé, donne un anneau d'un diamètre de 6,3mm sur cette plaque. D'après la courbe ci-dessus, cela correspond à une concentration en C2 de 16,1mg/L.

Procédure 3 :

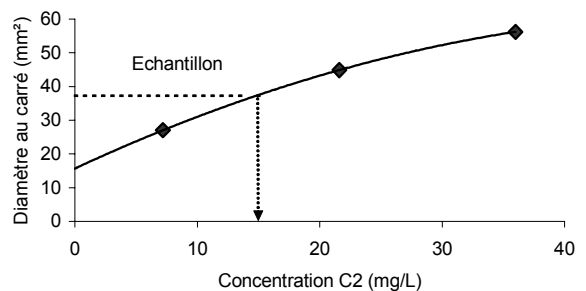
Tracer la courbe de calibration comme dans la procédure 2. La courbe de calibration obtenue ne sera pas linéaire, la pente de la droite diminuant tandis que la concentration augmente. L'intersection avec l'axe des Y obéit aux mêmes règles que la procédure 2. Les concentrations pour les échantillons inconnus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

Exemple :

Les calibrateurs C2 donnent, après 18 heures, les diamètres des anneaux suivants:

Calibrateur	Concentration (mg/l)	Diamètre de l'anneau (mm)	Diamètre au carré (mm ²)
Pur	36	7,5	56,3
60%	21,6	6,7	44,9
20%	7,2	5,2	27,0

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



Un échantillon, déposé pur comme recommandé, donne un anneau d'un diamètre de 6,1mm sur cette plaque. D'après la courbe ci-dessus, cela correspond à une concentration en C2 de 14,9mg/L.

10 LIMITES DE LA TECHNIQUE

10.1 Pour la procédure 1, les résultats obtenus à partir de diamètres d'anneaux supérieurs à celui du calibrateur pur (8mm) doivent être considérés comme approximatifs (cf. section 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. 8.3.4).

10.2 PROBLEMES POSSIBLES

Problèmes	Causes probables	Solutions envisagées
A. Pas de diffusion		
1. Calibrateur(s)	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(s) et échantillons	Plaque détériorée.	a) Mauvaises conditions de conservation. Répéter test avec nouvelle plaque.
		Vérifier la date de péremption. Répéter test avec nouvelle plaque/kit.
B. Anneaux de diffusion trop larges		
1. Calibrateur pur (Diamètre supérieur à 8,3mm)	i) Mesure inexacte.	Mesurer à l'aide d'une loupe ou d'un lecteur.
	ii) Volume de dépôt incorrect.	Vérifier le volume de dépôt (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) Déterioration 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 section 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 pur (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) Déterioration 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. 8.6).	Répéter le test en incubant à 20-24°C.	
2. Echantillons (en dessous du domaine de mesure acceptable - cf. section 10.1))	i) Concentration trop basse.	Cf. 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).	ii) Mauvaise application de l'échantillon.	Mesurer l'anneau extérieur.
		Répéter le test.
		a) Mauvais stockage. Répéter le test avec un nouveau calibrateur.
		b. Produit périmé. Répéter le test avec un nouveau kit.
		iv) Déterioration de l'échantillon.
v) Léger anneau extérieur.	Lecture de l'anneau intérieur plus marqué. Cf. section 9.	
E. Anneaux de diffusion non circulaires		
i) Mauvais dépôt de l'échantillon.	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.
F. Gel trouble		
i) Plaque congelée.	ii) Gel desséché avant utilisation.	Répéter le test en utilisant une nouvelle plaque. Vérifier les conditions de stockage.
		Cf. E(ii) ci-dessus.
		iii) Gel desséché durant les dépôts et l'incubation.

Problèmes	Causes probables	Solutions envisagées
G. Gel piqué, pâle	Plaque congelée.	Répéter le test en utilisant une nouvelle plaque. Vérifier les conditions de stockage.
H. Mauvaise courbe de calibration		
1. Courbe non linéaire (procédure 2)	i) Diffusion incomplète.	Incuber 24h supplémentaires et mesurer à nouveau les anneaux.
	ii) Taille des calibrateurs en dessous ou au-dessus de l'intervalle.	Cf. B1 et C1 ci-dessus. (Explications similaires pour les calibrateurs moyen et bas.)
	iii) Courbe de calibration mal construite.	Vérifier la construction de la courbe.
2. Intersection avec l'axe des Y en dehors de l'intervalle admis (voir section 9)	i) Taille des calibrateurs en dessous ou au-dessus de l'intervalle.	Cf. B1 et C1 ci-dessus. (Explications similaires pour les calibrateurs moyen et bas.)
	ii) Courbe de calibration mal construite.	Vérifier la construction de la courbe.

10.3 Un diagnostic ne peut être fait ni un traitement initié uniquement sur la base des dosages de C2. La clinique ainsi que d'autres tests doivent être pris en considération.

10.4 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 USUELLES

Les résultats suivants en C2 ont été obtenus en utilisant ce coffret :

	Moyenne (mg/L)	DS (n-1)	Médiane (mg/l)	95 percentile	Nombre d'échantillons
C2	19,61	3,33	19,2	14 - 25	80

Les résultats sont obtenus à partir de sérums de donneurs de sang sains anglais. Les données ne sont fournies qu'à titre indicatif. Il est fortement conseillé que chaque utilisateur établisse ses propres normes de concentrations en C2 d'après ses données cliniques.

12 PERFORMANCES

12.1 Précision

La précision (répétabilité) du coffret est exprimée en moyenne et en pourcentage du coefficient de variation (CV) qui a été déterminé en utilisant des préparations de sérum humain contenant des concentrations faibles, moyennes ou élevées en C2. 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 120 heures. Pour la procédure 3, le diamètre des anneaux a été lu après 18 heures.

Echantillons	Procédure 1		Procédure 2		Procédure 3	
	Conc. moy. (mg/L)	CV %	Conc. moy. (mg/L)	CV %	Conc. moy. (mg/L)	CV %
Haut	34,47	2,14	35,06	2,72	30,98	5,43
Moyen	24,3	3,71	23,48	4,42	21,1	4,69
Bas	14,6	4,57	12,48	6,68	13,16	5,59

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 5 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 sérum humain comme échantillon, déposé sur 5 plaques de chaque lot (6 mesures d'anneaux par plaque).

C2	Variation intra-plaque		Variation inter-lot	
	Moyenne du CV en % ± DS		CV en %	
	0,86 +/- 0,41 (N=5)		1,37 (N=5)	

13 BIBLIOGRAPHIE

- 13.1 PRU Handbook (1999), 6th Ed, Milford Ward, A *et al* (ed), PRU Publications, Sheffield, UK.
- 13.2 Fahey, JL & McKelvey, EM (1965). Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.*, **94**, 84-90.
- 13.3 Mancini, G, Vaerman, J P *et al*. (1964). Protides of the biological fluids (XI Colloquium). Peters H. (ed), Amsterdam, Elsevier Publishing Co., p 370.
- 13.4 Mancini, G, Carbonara, A O *et al* (1965). Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* **2**, 235-254.

14 RESUME DE LA PROCEDURE

- 14.1 Choisir la procédure 1, 2 ou 3. La procédure 3 est utilisée pour des résultats devant être obtenus rapidement.
- 14.2 Reconstituer le calibrateur et le contrôle avec l'eau distillée fournie.
- 14.3 Préparer les dilutions du calibrateur (procédures 2 et 3).
- 14.4 Laisser l'eau de condensation s'évaporer des plaques.
- 14.5 Déposer 10µL de calibrateur(s), de contrôle et d'échantillons dans les puits.
- 14.6 Remettre le couvercle et incuber à température ambiante (approximativement à 20-24°C) pendant le temps nécessaire : minimum de 18 heures (Procédure 3) ou jusqu'au point final de diffusion (minimum de 120 heures pour les procédures 1 et 2).
- 14.7 Mesurer les diamètres des anneaux.
- 14.8 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 IDR pour C2 humain
Concentrations en mg/L

Diamètre de l'anneau (mm)	Conc.
4.5	1.72
4.6	2.43
4.7	3.16
4.8	3.91
4.9	4.67
5.0	5.44
5.1	6.23
5.2	7.04
5.3	7.86
5.4	8.70
5.5	9.55
5.6	10.4
5.7	11.3
5.8	12.2
5.9	13.1
6.0	14.1
6.1	15.0
6.2	16.0
6.3	17.0
6.4	17.9
6.5	19.0
6.6	20.0
6.7	21.0
6.8	22.1
6.9	23.2
7.0	24.2
7.1	25.4
7.2	26.5
7.3	27.6
7.4	28.8
7.5	29.9
7.6	31.1
7.7	32.3
7.8	33.5
7.9	34.7
8.0	36.0
8.1	37.3
8.2	38.5
8.3	39.8
8.4	41.1
8.5	42.5
8.6	43.8
8.7	45.2
8.8	46.5
8.9	47.9
9.0	49.3
9.1	50.7
9.2	52.2
9.3	53.6
9.4	55.1
9.5	56.6
9.6	58.1
9.7	59.6
9.8	61.1
9.9	62.6
10.0	64.2

Note : Les valeurs ci-dessus ont été obtenues pour des échantillons purs avec un dépôt de 10µL. Le calibre pur doit donner un diamètre de 8,0±0,3mm à diffusion complète à 20-24°C.

NL BINDARID™ COMPLEMENTO C2 HUMANO KIT INMUNODIFUSIÓN RADIAL

Spanish

Sólo para el diagnóstico *in vitro*

Código de Producto: RN022.3

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

Producto 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 C2 humano en suero y como apoyo en el diagnóstico de deficiencias de complemento.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El C2 es una glicoproteína β1 que forma parte de la cascada de complemento. Por la activación del C1s se divide en dos fragmentos: C2a y C2b. El C2a, una serin-proteasa, forma junto el C4b la convertasa C3 ó C5. Bajas concentraciones de C2 son causadas por la activación de la cascada de complemento clásica, p.ej. por activación mediada por inmunocomplejos. La deficiencia de C2 es la más común de las deficiencias complementarias hereditarias y está asociada a lupus eritematoso sistémico, glomérulo nefritis y vasculitis (Ref. 1).

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

3 PRINCIPIO

Las muestras se aplican a placas RID permitiendo una difusión radial de un pocillo cilíndrico por medio de gel de agarosa conteniendo un anticuerpo monoespecífico correspondiente. Bajo unas condiciones adecuadas se formarán complejos anticuerpo-antígeno formando un aro de precipitación. El tamaño del aro irá creciendo hasta alcanzar un equilibrio entre la formación y la desaparición de estos complejos. Alcanzado este punto, existe una relación lineal entre el cuadrado del diámetro del aro y la concentración de antígeno. Midiendo los diámetros de aro en un número determinado de muestras de concentración conocida, puede hacerse una curva de calibración. La concentración de antígeno en una muestra desconocida, se determina midiendo el diámetro del aro y comparando con la curva de calibración.

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

4 REACTIVOS

1. **Placas RID** (envasadas en sobres herméticos). Éstas contienen anticuerpos monoespecíficos contra C2 en gel de agarosa. Pueden realizarse hasta catorce (14) muestras en una pasada (incluyendo calibradores). Conservantes: azida sódica 0,099%, ácido E-amino-n-caproico (EACA) 0,1%, benzamidina 0,01%.
2. **Calibrador:** liofilizado. La concentración de C2 se indica en la etiqueta del vial. Conservantes: azida sódica 0,099%, ácido E-amino-n-caproico (EACA) 0,1%, benzamidina 0,01%.
3. **Suero de Albúmina Bovina 7% (BSA) - solución.** Se suministra en forma líquida estable para el uso como diluyente. Conservantes: azida sódica 0,099%, ácido E-amino-n-caproico (EACA) 0,1%, benzamidina 0,01%.
4. **Suero control:** liofilizado. La concentración de C2 esperado se indica en la etiqueta del vial. Conservantes: azida sódica 0,099%, ácido E-amino-n-caproico (EACA) 0,1%, benzamidina 0,01%.
5. **Agua destilada.** Para reconstituir el calibrador y control liofilizados. Conservante: azida sódica 0,099%.

5 ADVERTENCIAS

El material de partida para la elaboración de los calibradores y controles proviene de sangre humana. Cada una de las muestras han sido examinadas y 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 RID y otros componentes del kit contienen azida sódica 0,099% como conservante y deben tratarse según las medidas de seguridad correspondientes. Debe evitarse tanto la ingesta como el contacto con la piel y las mucosas. En caso de contacto, aclarar con abundante agua y consultar a un médico. La azida sódica puede formar azidas metálicas explosivas 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 abrir 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 temperaturas extremas se deterioran! Una congelación destruirá el gel, por lo que deberán estar alejados de los elementos congeladores del frigorífico. Asimismo deberán evitarse temperaturas elevadas, dado que el gel perdería humedad, afectando a su función. Las placas no estrenadas deberán almacenarse planas y con la cara superior hacia abajo (la etiqueta está en la cara superior), con el fin de prevenir en los pocillos una acumulación de condensación. Tratar las placas con cuidado para evitar deteriorar el gel.

Los controles y calibradores sin estrenar deben guardarse entre 2 y 8°C. Una vez abiertos son estables durante al menos una semana a una temperatura entre 2 y 8°C. Para un almacenamiento más largo, deberán ser alicuotados y congelados (-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 test utilizar muestras de suero recientes o congeladas (-20°C). No deben emplearse plasma contaminado microbiológicamente, hemolizado o muy lipémico así como aquellas muestras que contengan partículas en suspensión. Las muestras de suero se deben recolectar mediante extracción intravenosa, dejar coagular de forma natural y separar rápidamente el suero del coágulo con el fin de evitar hemólisis. Las muestras pueden almacenarse entre 2 y 8°C hasta 48 horas antes del análisis. Para una conservación más prolongada se recomienda alicuotar y congelar a -20°C las muestras. Evitar repetidas congelaciones y descongelaciones.

El BSA incluido en el kit deberá ser utilizado como diluyente cuando se requiera mantener la viscosidad del material. Con ello se pueden comparar los resultados directamente con los valores de los calibradores.

8 METODOLOGÍA

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

8.1 Contenido del kit:

- 8.1.1 3 x *Human C2 NL Bindarid* (NL Bindarid C2 humano, placas de inmunodifusión radial en envases de aluminio)
- 8.1.2 8 x *Gel dividers* (Divisores de gel)
- 8.1.3 1 x *Human C2 NL Calibrator* (Calibrador liofilizado)
- 8.1.4 1 x 5mL 7% *BSA Solution* (7% BSA)
- 8.1.5 1 x *Human C2 NL Control Serum* (Suero control, liofilizado)
- 8.1.6 1 x 5mL *Distilled water* (Agua destilada)
- 8.1.7 1 x instrucciones incluso 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, centrifuga, 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 gráfico.

8.3 Preparación de los reactivos

8.3.1 Placa(s) RID

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

El control liofilizado debe ser reconstituido con el volumen indicado en la etiqueta de agua destilada suministrada con el kit. Antes del empleo, mezclar por inversión con cuidado hasta que todos los contenidos se hayan disuelto completamente (mínimo 30 minutos). El calibrador ya pre-diluido, debe aplicarse sin diluir. Para la confección de la curva de calibración es necesario realizar diluciones del calibrador (procedimientos DOS y TRES). Las diluciones normales son una media (del 60%) y una dilución baja (del 20%). Para una dilución del 60% se recomienda mezclar 120µL de calibrador con 80µL del diluyente suministrado (BSA 7%) y para una dilución del 20% mezclar 40µL de calibrador con 160µL de diluyente.

8.3.3 Control

El control C2 liofilizado debe ser reconstituido con el volumen indicado en la etiqueta de agua destilada. Mezclar por inversión con cuidado hasta que todos los contenidos se hayan disuelto completamente.

8.3.4 Muestras

La muestra normalmente no necesita ser diluida. Se necesitará una dilución cuando la muestra con elevada concentración de C2 deba cuantificarse. En estos casos se recomienda para obtener una precisión adecuada mezclar un volumen mínimo de 10µL de muestra con el volumen adecuado de BSA. Para muestras cuyas concentraciones estén por debajo de los límites de detección se recomienda:

- i) Emplear muestra más concentrada
- ii) Aplicar el doble de volumen (ver Sección 8.5)

8.4 Procedimientos

8.4.1 Procedimiento UNO: Tabla de referencias RID

Este procedimiento no necesita la confección de una curva de calibración – las concentraciones correspondientes a cada diámetro de aro se leen directamente de la tabla de referencias RID. Para garantizar que se haya alcanzado el tamaño del aro completo la duración de difusión debe ser de como mínimo 120 horas. Para la verificación debe incluirse en cada placa un calibrador sin diluir.

8.4.2 Procedimiento DOS: Curva de calibración a punto final

En este procedimiento se emplean el calibrador sin diluir además de dos diluciones para confeccionar una curva lineal estándar. Para alcanzar el tamaño del aro total la duración de difusión deberá ser de como mínimo 120 horas. La curva estándar se puede emplear para varias placas de un mismo lote. En este caso deberá ser aplicado en la placa un calibrador sin diluir como control.

8.4.3 Procedimiento TRES: Curva de calibración previa a punto final

En este procedimiento se emplean el calibrador sin diluir más las dos diluciones para confeccionar una curva estándar. Esta no es lineal, dado que los diámetros de aro se determinan antes del punto final. La difusión mínima recomendada es de 18 horas. Debería confeccionarse una curva de calibración para cada placa.

8.5 Aplicación de los calibradores y muestras

Antes de usar, agitar con cuidado el calibrador, el control y las muestras. Aplicar 10µL del calibrador sin diluir en un pocillo. En caso de seguir el procedimiento DOS o TRES, aplicar también los calibradores diluidos (60% y 10%) en pocillos correspondientes y en el resto de los pocillos 10µL de muestras y controles convenientemente diluidos. Para que el gel no se seque, las placas no deben estar mucho tiempo abiertas.

Nota: Si se espera de una muestra una concentración de C2 baja, se puede aplicar una cantidad doble. Primeramente, se aplican 10µL de la muestra y se deja difundir totalmente en el gel, lo que puede durar hasta 30 minutos. Durante este tiempo cerrar la placa con la tapa. Después, aplicar otros 10µL de muestra en el mismo pocillo e incubar la placa según lo habitual. Al calcular los resultados se debe tener en cuenta la mayor cantidad ya que el resultado no es tan preciso como con una sola.

8.6 Incubación

Tras la aplicación de las muestras se debe cerrar la tapa e incubar plana con la tapa hacia arriba a temperatura ambiente (20-24°C). ¡Bajo ninguna circunstancia se puede secar el gel durante la incubación! Por ello se deben incubar las placas dentro de los sobres herméticos bien cerrados o bien dentro de una cámara húmeda (caja de plástico con tapa con toallitas húmedas). La incubación mínima para el procedimiento TRES es de 18 horas para la difusión completa (procedimientos UNO y DOS) es de 120 horas. La temperatura influye en el diámetro del aro final, por lo que debe evitarse temperaturas extremas. Incubando a una temperatura de 20-24°C el diámetro del calibrador sin diluir es de 8mm (±0,3mm). Evitar temperaturas extremas.

8.7 Control de calidad

El control debe ser manipulado exactamente igual que las muestras. Los valores obtenidos de cada control no deben sobrepasar el ±10% de la concentración indicada en la etiqueta.

9 MEDICIÓN E INTERPRETACIÓN

Tras el tiempo de difusión requerido, los diámetros de aro deben medirse con una precisión de 0,1mm, mediante una lupa de joyero o un lector RID. En la lectura con lupa debe utilizarse una luz brillante de costado y un fondo oscuro. En caso de tener dificultades, ver la placa a simple vista y marcar los bordes del aro con agujas. De esta forma se puede medir más fácilmente la distancia.

Nota: Con los procedimientos UNO y DOS los diámetros deben estar completamente formados. Si hubiera alguna duda, se deberá volver a medir transcurridas 24 horas para asegurarse que los diámetros no han aumentado. El calibrador sin diluir debe dar a punto final un diámetro de aro de 8,0mm ± 0,3mm. Si el diámetro de aro estuviera fuera de este rango, ver RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS (sección 10.2). Un aro externo débil de precipitina puede ser visible con algunas muestras; esto no influye desfavorablemente la cuantificación del C2 que se debe determinar por la medida del aro interno, más fuerte.

Procedimiento UNO

La concentración de C2 de cada una de las muestras puede leerse directamente de la tabla de referencias RID.

Las muestras cuyos diámetros de aro sean mayores que el del calibrador sin diluir, deberán considerarse como de concentración aproximada, ya que existe la posibilidad de que no hayan difundido a la totalidad. Tales muestras pueden inducir a una reducción de anticuerpos locales afectando al tamaño de los diámetros de aro adyacentes. Estas muestras deberán ser testadas de nuevo, empleando una dilución adecuada. Muestras cuyos diámetros de aro sean inferiores a los límites inferiores de la tabla de referencia RID, deberán testarse de nuevo con una mayor concentración (ver sección 8.3.4). Al calcular los resultados se debe tener en cuenta cualquier cambio en la dilución recomendada.

Ejemplo:

Muestra	Dilución	Diámetro de aro (mm)	Valor tabla RID (mg/L)	Conc. Muestra original (mg/L)
C2 Muestra A	Sin diluir	6,4	17,9	17,9
C2 Muestra B	Sin diluir	>10	>64,2	>64,2
C2 Muestra B Repetición	1/2	7,7	32,3	64,6*

* Calculado según sigue: Valor de la tabla x Dil. recomendada / Dil. real. Ejemplo: 32,3mg/L x (1)/(1/2).

Procedimiento DOS

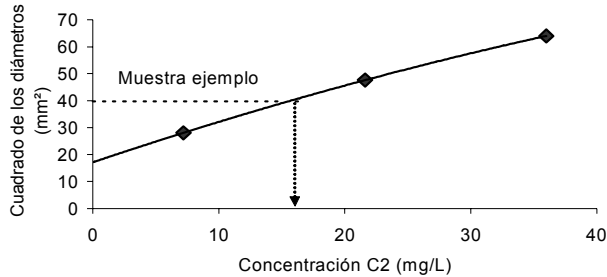
Trazar el cuadrado de los diámetros de los aros precipitados formados por los tres calibradores contra sus concentraciones correspondientes (indicados en la etiqueta del calibrador). Las concentraciones de C2 se trazan en el eje horizontal (x) y los cuadrados de los diámetros de aro en el eje vertical (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 a 22mm². La concentración de C2 se determina por la curva de calibración. **IMPORTANTE:** recordar posibles diluciones empleadas y ajustar correspondientemente.

Cálculo de la muestra:

Los calibradores de C2 dan los siguientes diámetros en la placa a punto final:

Calibrador	Conc. (mg/L)	Diámetro (D) de aro (mm)	D cuadrado (mm ²)
Sin diluir	36	8,0	64,00
60%	21,6	6,9	47,61
20%	7,2	5,3	28,09

Se ha trazado la curva de calibración usando estos resultados:



Una muestra desconocida sin diluir, da un diámetro de aro de 6,3mm en esta placa. De acuerdo con la curva anterior, esto corresponde a una concentración de C2 de 16,1mg/L.

Procedimiento TRES

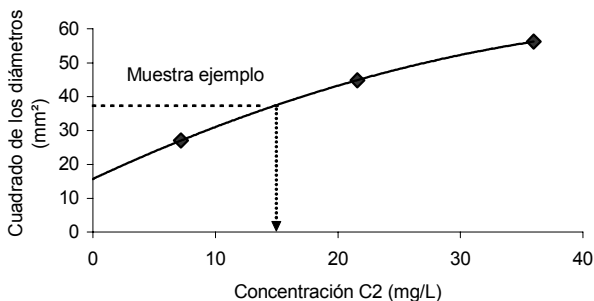
Trazar la curva de calibración según el procedimiento DOS. No se obtiene una línea recta pero si una curva, decreciente según aumenta la concentración de proteínas. El punto de intersección del eje "y" debe ser como el del procedimiento DOS. La lectura de las concentraciones se leen de la curva de calibración.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

Cálculo de la muestra:

Calibradores C2 (p.ej. calibrador sin diluir más las dos diluciones) dan un los siguientes diámetros de aro en esta placa después de 18 horas:

Calibrador	Conc. (mg/L)	Diámetro (D) de aro (mm)	D cuadrado (mm ²)
Sin diluir	36	7,5	56,3
60%	21,6	6,7	44,9
20%	7,2	5,2	27,0

Se ha trazado la curva de calibración usando estos resultados:



Una muestra desconocida sin diluir, da un diámetro de aro de 6,1mm en esta placa. De acuerdo con la curva anterior, esto corresponde a una concentración de C2 de 14,9mg/L.

10 LIMITACIONES

10.1 El procedimiento 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 procedimientos 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 adecuada (ver sección 8.3.4).

10.2 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. ii) Concentración demasiado alta/baja.	Repetir prueba. 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.

Problema	Posible(s) causa(s)	Sugerencia(s)
B. Aros demasiado grandes para:		
1 Calibrador sin diluir (más de 8,3mm)	i) Medición inexacta del aro. ii) Aplicación de volumen incorrecto. iii) Aplicación de volumen inexacto. iv) Reconstitución del calibrador incorrecto. v) Evaporación parcial del calibrador durante el almacenamiento. vi) Deterioro placa. vii) Reducción de anticuerpos locales por concentración demasiado alta en la muestra. viii) Temperatura de incubación demasiado elevada (ver punto 8.6).	Medir de nuevo con lupa o con el lector RID. Verificar si se ha aplicado el volumen de 10µL. a) Malfuncionamiento de la micropipeta – verificar funcionamiento y repetir prueba. b) Error de procedimiento – repetir prueba. a) Malfuncionamiento de la micropipeta – verificar funcionamiento y repetir prueba con nuevo calibrador. b) Error de procedimiento – Repetir prueba utilizando calibrador nuevo. Repetir prueba con nuevo calibrador/kit. a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir con placa nueva. b) Producto caducado. Repetir con un kit nuevo. Diluir las correspondientes muestras y repetir la prueba con una placa nueva. Repetir prueba incubando a 20-24°C.
2. Resultados de muestras por encima del rango aceptado - ver sección 10.1)	i) Concentración demasiado alta. ii) Aplicación incorrecta de volúmenes.	Diluir y repetir la prueba. Comprobar que se ha aplicado un volumen de 10µL.
C. Aros demasiado pequeños para:		
1. Calibrador sin diluir (menos de 7,7mm)	i) Medición inexacta del aro. ii) Aplicación de volumen incorrecto. iii) Aplicación de volumen incorrecto iv) Reconstitución del calibrador incorrecto. v) Deterioro del calibrador. vi) Temperatura de incubación demasiado elevada (ver punto 8.6).	Ver B1 a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir con placa nueva. b) Producto caducado. Repetir con un kit nuevo. Repetir prueba incubando a 20-24°C.
2. Muestras (por debajo del rango aceptable – ver punto 10.1)	i) Concentración demasiado baja. ii) Aplicación de volumen incorrecto.	Ver punto 8.3.4 y repetir prueba. Verificar si se ha aplicado el volumen de 10µL.
D. Aros dobles/múltiples	i) Precipitación no específica cerca del pocillo (motivo: PEG en el gel). ii) Error en el procedimiento. iii) Deterioro del calibrador. iv) Deterioro muestra. v) Aro externo débil.	Leer aro exterior. Repetir prueba. a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir prueba con calibrador nuevo. b) Producto caducado. Repetir prueba con nuevo kit. Repetir prueba con muestra reciente. Leer el aro más fuerte interno. Ver la sección 9.
E. Aros no circulares	i) Error en el procedimiento. ii) Gel se ha secado antes del empleo. iii) Gel se ha secado durante la aplicación de la muestra o durante la incubación. iv) Reducción de anticuerpos locales por concentración demasiado alta en la muestra.	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. Diluir muestras y repetir prueba.
F. Gel turbio	i) La placa ha sido congelada. ii) Gel se ha secado antes del uso. iii) Gel se ha secado durante la aplicación de la muestra o durante la incubación.	Repetir prueba con placa correctamente almacenada. Verificar almacenado. Ver E(ii). Ver E(iii).
G. Gel quebradizo y no nivelado	La placa ha sido congelada.	Repetir prueba con placa correctamente almacenada. Verificar almacenado.

Problema	Posible(s) causa(s)	Sugerencia(s)
H. Curva de calibración deficiente:		
1. Curva no lineal (procedimiento 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 (válido 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 (válido también para el calibrador medio y bajo).
	ii) Curva de calibración mal trazada.	Verificar trazado curva de calibración.

10.3 El diagnóstico y tratamiento no debe basarse solo en la cuantificación de C2. Se deben tener en cuenta el historial así como otras pruebas clínicas.

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

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

11 RESULTADOS

Con este kit se han obtenido los siguientes resultados:

	Media (mg/L)	SD (n-1)	Mediana (m)	Rango percentil 95	No de muestras
C2	19,61	3,33	19,2	14 - 25	80

Los resultados antes indicados se obtuvieron de un colectivo normal pero limitado número de donantes y del Reino Unido solo son orientativos. Niveles muy elevados de IgA están asociados con mieloma. Se recomienda encarecidamente se determinen, a ser posible, rangos normales locales.

12 CARACTERÍSTICAS

12.1 Precisión

La precisión (repetitividad) de este kit se expresa como la media y el valor de coeficiente de variación (CV). El Coeficiente de variación se determina por medición de Pool de sueros que contienen concentraciones altas, medias y bajas de C2. Todos los análisis se realizaron en el laboratorio de The Binding Site Limited, Birmingham (RU). A no ser que se indique lo contrario, se determinaron los valores mediante 10 mediciones (determinaciones dobles sobre 5 placas RID diferentes de un mismo lote normal). Para los procedimientos UNO y DOS se midieron los diámetros de aro tras 120 horas y para el procedimiento TRES, tras 18 horas.

POOL de muestras C2	Procedimiento 1		Procedimiento 2		Procedimiento 3	
	Media conc mg/L	CV %	Media conc. mg/L	CV %	Media conc. mg/L	CV %
Alto	34,47	2,14	35,06	2,72	30,98	5,43
Medio	24,3	3,71	23,48	4,42	21,1	4,69
Bajo	14,6	4,57	12,48	6,68	13,16	5,59

12.2 Variación dentro de la placa y variación inter-lote:

La variación dentro de la placa se expresa como la media \pm de la desviación estándar (SD) de determinaciones de CV usando 5 placas de lotes diferentes. Se realizaron 6 mediciones de por cada placa utilizando suero humano de un pool de plasma humano como muestra.

La variación inter-lote se expresa como el CV de la media de los diámetros obtenidos de un pool de plasma humano como muestra utilizando placas de lotes recientes. El diámetro de aro a punto final obtenido utilizado una preparación de suero como muestra y aplicada a dos (o más) placas de cada lote (6 mediciones de aro por placa).

C2	Variación dentro de la placa	Variación inter-lote
	Media CV% \pm SD	CV %
	0,86 \pm 0,41 (N=5)	1,37 (N=5)

13 BIBLIOGRAFÍA

- PRU Handbook (1999), 6th Ed, Milford Ward, A *et al* (ed), PRU Publications, Sheffield, UK.
- 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 PROCEDIMIENTO

- Seleccionar procedimiento UNO, DOS o TRES. Si se necesitan resultados rápidamente, seleccionar procedimiento TRES.
- Reconstituir calibrador(es) y control(es) con el agua destilada del kit.
- Preparar diluciones de las muestras (necesario para procedimiento DOS y TRES).
- Permitir la evaporación de la condensación de la(s) placa(s) RID.
- Aplicar calibrador(es), control y muestras a la placa(s) RID en volúmenes de 10 μ L.
- Colocar tapa e incubar a temperatura ambiente (aproximadamente 20-24°C) durante el tiempo fijado (mínimo 18 horas) (Procedimiento TRES) o hasta que los aros se hayan completado (mínimo 120 horas) (Procedimiento UNO y DOS).
- Medir los diámetros de los aros.
- Leer los resultados de la tabla de referencias RID (procedimiento UNO) o trazar la curva de calibración y leer de ésta los resultados (procedimientos DOS y TRES).

Tabla de referencias RID para C2 humano
Concentraciones en mg/L

Diámetro de aro (mm)	Conc.
4.5	1.72
4.6	2.43
4.7	3.16
4.8	3.91
4.9	4.67
5.0	5.44
5.1	6.23
5.2	7.04
5.3	7.86
5.4	8.70
5.5	9.55
5.6	10.4
5.7	11.3
5.8	12.2
5.9	13.1
6.0	14.1
6.1	15.0
6.2	16.0
6.3	17.0
6.4	17.9
6.5	19.0
6.6	20.0
6.7	21.0
6.8	22.1
6.9	23.2
7.0	24.2
7.1	25.4
7.2	26.5
7.3	27.6
7.4	28.8
7.5	29.9
7.6	31.1
7.7	32.3
7.8	33.5
7.9	34.7
8.0	36.0
8.1	37.3
8.2	38.5
8.3	39.8
8.4	41.1
8.5	42.5
8.6	43.8
8.7	45.2
8.8	46.5
8.9	47.9
9.0	49.3
9.1	50.7
9.2	52.2
9.3	53.6
9.4	55.1
9.5	56.6
9.6	58.1
9.7	59.6
9.8	61.1
9.9	62.6
10.0	64.2

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