

KIT DE INMUNODIFUSIÓN RADIAL 'NL' BINDARID™ DE COMPLEMENTO C3 & C4 HUMANO

Para uso diagnóstico *in vitro*

Código Producto: RN023.3, RN025.3

Fabricado por:

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

The Binding Site Group Limited Sucursal en España

Bruc 72 2ª planta, 08009 Barcelona, España

Teléfono 902027750

Fax: 902027752

e-mail: info@bindingsite.es

web: www.bindingsite.es

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



1 UTILIZACIÓN

Este kit sirve para medir C3 ó C4 humanos en suero y otros fluidos biológicos.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Complemento C3

C3 es una beta-2 proteína de 180kD que es cortada por la convertasa C3, para dar el fragmento C3a farmacológicamente activo y el fragmento mayor C3b. C3b reacciona con Factor B para producir más C3 convertasa y activar C5 (ref.1). Al envejecer, C3 en suero y plasma se rápidamente cortado enzimáticamente a C3c inactivo (el cual no es susceptible de una degradación posterior), además de otros fragmentos menores. Niveles elevados de C3 en suero son asociados con reacciones inflamatorias agudas; niveles reducidos en suero, son asociados con deficiencia de Factor 1, infecciones recurrentes, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis y otras numerosas condiciones (ref. 2).

Complemento C4

C4 es una beta-1 proteína de 210kD que es cortada por C1s activado, para producir C4a y C4b. C4b interacciona con C2b para formar la vía clásica C3 convertasa (ref.1). Los niveles reducidos en suero son asociados con lupus eritematoso sistémico, agioedema hereditario, glomerulonefritis e infecciones repetidas (ref.2).

El método de la inmunodifusión radial (IDR) es un método usado rutinariamente en la medida de la concentración de varios antígenos solubles en fluidos biológicos. Este método está basado principalmente en los trabajos de Fahey & McKelvey (ref. 3) y de Mancini *et al* (ref. 4 & 5).

3 PRINCIPIO

Las muestras se aplican a placas IDR permitiendo una difusión radial de un pocillo cilíndrico por medio de gel de agarosa conteniendo un anticuerpo mono-específico correspondiente. Bajo unas condiciones adecuadas se formarán complejos anticuerpo-antígeno formando un anillo de precipitación. El tamaño del anillo 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 anillo y la concentración de antígeno. Midiendo los diámetros de anillo 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 anillo 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 anillos 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 anillos se miden antes del punto final. La curva de calibración no es lineal.

4 REACTIVOS

- Placas IDR** (envasadas en sobres herméticos). Estas placas contienen anticuerpo mono-específico contra C3 y C4 en gel de agarosa. Pueden realizarse hasta 14 muestras en una pasada (incluyendo calibradores). Conservantes: 0,099% azida sódica, 0,1% ácido E-amino-n-caproico (EACA), 0,01%, benzamidaína.
- Calibradores**. Se suministran en forma líquida estabilizada como un set conteniendo concentraciones de C3 y C4 alta, media y baja. Estas concentraciones indicadas en las etiquetas de los viales han sido obtenidas por comparación con el Material de Referencia Internacional DA470k. Conservantes: 0,099%, azida sódica, 0,1% EACA, 0,01% benzamidaína.
- Solución Albúmina de Suero Bovino (BSA) 7%**: Para el empleo en las diluciones. Se suministra de forma líquida estabilizado. Conservantes: 0,09% azida sódica, 0,1% EACA, 0,01% benzamidaína.
- Suero Control**: Se suministra en forma líquida estabilizada. La concentración esperada de C3 y C4 está indicada en la etiqueta del vial. Conservantes: 0,099% azida sódica, 0,1% EACA, 0,1% Benzamidaína.

5 PRECAUCIONES

Los sueros humanos suministrados en el kit han sido sometidos a screening para donantes, resultando negativos a la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B y a la presencia de los anticuerpos de la ante los virus HIV1, HIV2 y HCV. Las técnicas usadas están aprobadas por la FDA (USA) o para el diagnóstico *in vitro* por la UE (Directiva 98/79/EC, Anexo II). Sin embargo los sobredichos ensayos no garantizan la ausencia de agentes infecciosos. **Por lo tanto, deben tratarse los reactivos como potencialmente infecciosos. Tanto la manipulación como los métodos de eliminación de desechos deberán realizarse conforme a la normativa de materiales infecciosos** y solo personal adecuadamente instruido deberá efectuar el test.

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

El presente producto debe ser utilizado por personal especializado. Se recomienda observar estrictamente el procedimiento indicado.

Los reactivos de diferentes lotes **NO** son intercambiables. En caso de realizar un número elevado de tests, averigüe que todos los reactivos sean del mismo lote.

6 CONSERVACIÓN

El kit sin estrenar es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase almacenándolo entre 2 y 8°C. ¡NO CONGELAR! Las placas IDR deben guardarse entre 2 y 8°C. ¡A mayor o inferior temperatura se deterioran! Una congelación destruirá el gel, por lo que deberán estar alejados de los elementos congeladores del frigorífico. Asimismo deberán evitarse temperaturas elevadas, dado que el gel perdería humedad, afectando a su función. Las placas no estrenadas deberán almacenarse planas y con la cara superior hacia abajo (la etiqueta está en la cara superior), con el fin de prevenir en los pocillos una acumulación de condensación. Tratar las placas con cuidado para evitar deteriorar el gel.

Los calibradores y controles no abiertos deben guardarse entre 2 y 8°C. Una vez abiertos son estables durante una semana a una temperatura entre 2 y 8°C. Para un almacenamiento más largo, deberán ser divididos en alícuotas y congelados (-20°C o más bajo). Todos los demás reactivos deben almacenarse entre 2 y 8°C.

7 TOMA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Para este test deben utilizarse muestras suero frescas o congeladas (-20°C). No deben emplearse suero contaminado microbiológicamente, hemolizado o muy lipémico así como aquellas muestras que contengan partículas. Las muestras de suero se deben recolectar mediante extracción intravenosa y separar rápidamente el suero del coágulo con el fin de evitar hemólisis. Las muestras pueden almacenarse entre 2-8°C hasta 48 horas antes del análisis. Para una conservación más prolongada se recomienda dividir en alícuotas y congelar a -20°C las muestras. Evitar repetidas congelaciones y descongelaciones.

Las placas IDR C3 contienen anticuerpos anti-C3c, los cuales reaccionarán con C3 y con el producto de degradación C3c. Por lo tanto, medirán la concentración combinada de C3 y C3c, la cual es satisfactoria para la mayoría de las propuestas. Si se debe medir C3 intacto solamente, entonces deben recolectarse muestras de plasma (**no suero**) en tubos de EDTA-Futano que previenen la degradación de C3. C3 puede también ser convertido completamente en C3c antes de su medición, mediante tratamiento con inulina (3g/L durante una hora a 37°C). Una situación análoga existe también para C4, pero éste es menos susceptible a la degradación que C3, por lo que se encuentran niveles significativos de C4c solamente en muestras viejas.

Para diluciones (muestras, controles) se deberá utilizar exclusivamente la albúmina de suero bovino (BSA) incluida en este kit con el fin de mantener la viscosidad. De todas formas, se pueden comparar los resultados con los obtenidos con los calibradores que tienen una viscosidad similar al suero humano.

8 METODOLOGÍA

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

8.1 Contenido

- 3 x *Human Complement C3* o *C4 NL Bindarid* (placas de inmunodifusión radial embaladas en sobres herméticos).
- 8 x *Gel Dividers* (Partidores de gel)
- 1 x *Human Complement C3* o *C4 NL Calibrator* (Calibrador, líquido)
- 1 x 5mL *7% BSA Solution* (Solución BSA 7%)
- 1 x *Human Complement C3* and *C4 Control Serum* (Control, líquido)
- 1 x manual instrucciones y tabla de referencias IDR

8.2 Materiales necesarios y no suministrados

- Equipamiento para la colección y preparación de las muestras, p.ej. tubos de muestras, centrifuga, etc.
- Pipetas para una adecuada dilución de las muestras y controles.
- Micropipetas para la aplicación de las muestras. Estas deberán dispensar 5µL exactos. Recomendamos las Binding Site Micropipettes (Artículo AD041) o jeringuillas 'Hamilton'.
- Lupa de joyero (Artículo AD040) o Digital RID Plate Reader (lector digital de microplacas IDR, Artículo AD400) para un aumento y medición exacta del diámetro del aro precipitado hasta 0,1mm.
- Papel milimetrado.

8.3 Preparación de los reactivos

8.3.1 Placas IDR

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

Partición de la placa: Las placas pueden dividirse antes de su empleo hasta en cuatro secciones, utilizando para ello los divisores de gel. Colocar cada divisor con cuidado y con la arista afilada hacia abajo. El brazo estabilizador deberá descansar sobre la etiqueta de plástico central. Presionar firmemente sobre el brazo para cortar el gel y dejarlo en posición. La división de las placas solamente se recomienda cuando solo se vaya a emplear una parte de los 14 pocillos o para la medición de muestras con sospecha de una elevada concentración de antígeno. En estas muestras se puede llegar a una amplia difusión del antígeno, por lo que en zonas apartadas de la placa se reduce la concentración de anticuerpos. Tras el uso parcial, las placas deberán guardarse en su sobre hermético bien cerrado entre 2 y 8°C con los separadores puestos. Guardar las placas divididas boca arriba y utilizar dentro de las siguientes 4 semanas.

8.3.2 Calibradores

Los calibradores están prediluidos y deben ser mezclados cuidadosamente antes de su uso. Deben ser aplicados netos a las placas (sin dilución). Los calibradores medio y alto deben usarse solamente cuando se requiera una curva de calibración, como en los procedimientos DOS y TRES (ver más adelante).

8.3.3 Control

El control de forma líquida debe aplicarse sin diluir, mezclándolo con cuidado inmediatamente antes del empleo.

8.3.4 Muestras

Las muestras normalmente no necesitan ser diluidas. Sin embargo, muestras que contengan niveles altos de C3 o C4 pueden necesitar dilución antes de ser aplicadas. En estos casos se recomienda para obtener una precisión adecuada mezclar un volumen mínimo de 25µL de muestra con el volumen adecuado de BSA. Para muestras cuyas concentraciones de C3 / C4 estén por debajo de los límites de detección de las placas, se recomienda.

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

8.4 Procedimientos

8.4.1 Procedimiento UNO: Tabla de referencia IDR

Este método **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 IDR. Para garantizar de que se haya alcanzado el tamaño del aro completo la duración de difusión debe ser de cómo mínimo 48 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 método se emplean los tres calibradores para confeccionar una curva de calibración lineal. Para alcanzar el tamaño del aro total la duración de difusión deberá ser de cómo mínimo 48 horas. La curva estándar se puede emplear para varias placas de un mismo lote. En este caso, el calibrador alto deberá ser aplicado en cada placa usada para asegurar que todo reacciona correctamente.

8.4.3 Procedimiento TRES: Curva de calibración previa a punto final

En este método se emplean los tres calibradores para confeccionar una curva estándar que 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 calibradores y muestras

Antes de usar, agitar con cuidado el calibrador, el control y las muestras. Aplicar 5µL del calibrador alto en los pocillos requeridos, usando una micropipeta. En caso de seguir el método DOS o TRES, aplicar también los calibradores medio y bajo en pocillos correspondientes. El resto de los pocillos deben ser llenados con 5µL de muestras y control 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 proteína específica baja, se puede aplicar una cantidad doble. Primeramente, se aplican 5µL de la muestra y se deja difundir totalmente en el gel, lo que puede durar hasta 30 minutos. Durante este tiempo tapan la placa. Después, aplicar otros 5µL 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 aplicación.

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 método TRES es de 18 horas y para la difusión completa (métodos UNO y DOS) es de 48 horas. La temperatura influye en el diámetro del aro final, incubando a una temperatura de 20-24°C el diámetro para el calibrador alto es de 8,0mm (±0,3mm). Se deben evitar temperaturas extremas.

8.7 Control de calidad

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

9 MEDICIÓN ANILLO Y ELABORACIÓN DE RESULTADOS

Tras el tiempo de difusión requerido, los diámetros de aro deben medirse mediante una lupa de joyero o un lector digital de microplacas IDR, con una precisión de 0,1mm. Cuando se utilice la Lupa de joyero usar luz brillante lateral y fondo oscuro. Si resulta difícil, ver la placa macroscópicamente y marcar los límites de los aros usando una aguja, la distancia entre estas marcas es más fácilmente medible.

Nota: para los procedimientos UNO y DOS se deben desarrollar los aros a conclusión. Si existe cualquier duda, deberán medirse de nuevo los diámetros al cabo de 24 horas y asegurarse de que no han aumentado. El calibrador alto debe dar un diámetro de aro de 8,0mm ± 0,3mm a conclusión. Si el diámetro del aro está fuera de este rango, ver Resolución de Problemas (Sección 10.3).

Procedimiento UNO

La concentración de C3/C4 en cada muestra ensayada puede ser leída directamente de la tabla de referencia IDR, **siempre que se haya aplicado sin diluir como se recomienda.**

Las muestras cuyos diámetros de anillo sean mayores que el del calibrador alto, 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 anillo adyacentes. Estas muestras deberán ser testadas de nuevo, empleando una dilución adecuada. Muestras cuyos diámetros de anillo sean inferiores a los límites inferiores de la tabla de referencia IDR, 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 anillo (mm)	Valor en tabla (mg/L)	Concentración muestra original (mg/L)
C3 Suero A	Sin diluir	6,4	888	888
C3 Suero B	Sin diluir	>10,0	>2590	>2590
C3 Suero B	1/2	7,8	1460	2920*

*Cálculo como sigue: Valor de la tabla x dil. recomendada / dil. real. p.ej. 1460mg/L x (1)/(1/2).

Procedimiento DOS

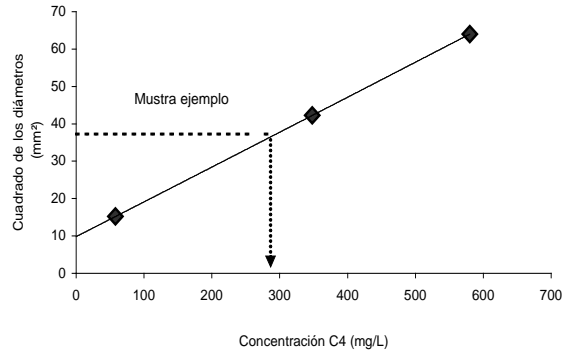
Trazar el cuadrado de los diámetros de los anillos precipitados formados por los tres calibradores contra sus concentraciones C3/C4 (indicadas en las etiquetas de los calibradores). Las concentraciones de C3 / C4 se trazan en el eje horizontal (x) y los cuadrados de los diámetros de anillo en el eje vertical (y). Como curva se escoge la mejor conexión posible de estos tres puntos. El punto de intersección con el eje "y" deberá ser de 10 a 12mm². La concentración de C3 / C4 se determina por la curva de calibración. Importante: recordar posibles diluciones empleadas y ajustar correspondientemente.

Cálculo de la muestra:

Los calibradores C4 dan los siguientes diámetros en la placa C4 a punto final:

Calibrador	Conc. (mg/L)	Dámetro (D) de anillo (mm)	D cuadrado (mm ²)
Alto	580	8,0	64,0
Medio	348	6,5	42,3
Bajo	58	3,9	15,2

La curva de calibración se dibuja siguiendo estos resultados:



Una muestra desconocida, aplicada sin diluir como se recomienda, ha dado un anillo de 6,1mm de diámetro en esta placa. De acuerdo a la curva anterior, esto corresponde a una concentración de C4 de 278mg/L.

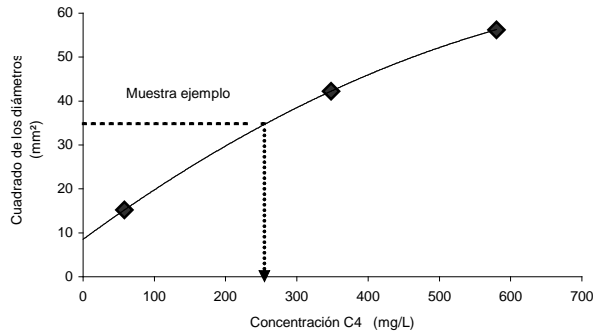
Procedimiento TRES

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

Los calibradores de C4 dan los siguientes diámetros en la placa de C4 después de 18 horas:

Calibrador	Conc. (mg/L)	Diámetro (D) de anillo (mm)	D cuadrado (mm ²)
Alto	580	7,5	56,3
Medio	348	6,5	42,3
Bajo	58	3,9	15,2

La curva de calibración se dibuja siguiendo estos resultados:



Una muestra desconocida, aplicada sin diluir como se recomienda, ha dado un anillo de 5,9mm en esta placa. De acuerdo con la curva anterior, esto corresponde a una concentración de C4 de 251mg/L.

10 LIMITACIONES

10.1 En el procedimiento UNO, los resultados generados de anillos con diámetros mayores que el diámetro del anillo del calibrador alto (p.ej. 8,0mm) deben ser considerados como aproximados (ver sección 9). Los resultados exactos para los procedimientos DOS y TRES, están limitados por el trazado de la curva de calibración entre los valores de los calibradores alto y bajo – la extrapolación más allá de estos puntos no es válida. Muestras con resultados fuera de estos rangos deben ser testadas de nuevo con una dilución o concentración adecuados (ver sección 8.3.4).

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

10.3 RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Causa(s) posible(s)	Recomendación(es)
A. No hay anillo para:		
1. Calibrador(es)	Omisión del calibrador.	Repetir el ensayo.
2. Muestra	i) Omisión de la muestra.	Repetir el ensayo.
	ii) Concentración demasiado alta / baja.	Diluir / concentrar y repetir el ensayo.
3. Calibrador(es) y muestras	Deterioro placa.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir el ensayo con placa nueva.
		b) Producto caducado. Repetir el ensayo con nueva placa o kit.
B. Anillos demasiado grandes para		
1. Calibrador sin diluir (más de 8,3mm)	i) Medición inexacta del anillo.	Medir de nuevo con lupa o con el lector IDR.
	ii) Aplicación de volumen incorrecto.	Verificar si se ha aplicado el volumen de 5µL.
	iii) Aplicación de volumen inexacto.	a) Malfuncionamiento de la micropipeta – verificar funcionamiento y repetir el ensayo.
		b) Error de procedimiento – Repetir el ensayo.
	iv) Evaporación parcial del calibrador durante el almacenamiento.	Repetir el ensayo con nuevo calibrador / kit.
	v) Deterioro placa.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir el ensayo con placa nueva.
		b) Producto caducado. Repetir el ensayo con nuevo kit.
vi) Reducción de anticuerpos locales por concentración demasiado alta en la muestra.	Diluir las correspondientes muestras y repetir la el ensayo con una placa nueva.	
2. Muestras (por encima del rango aceptable – ver sección 10.1)	ii) Aplicación de volúmenes incorrectos.	Verificar si se ha aplicado el volumen de 5µL.
	i) Concentración demasiado alta.	Diluir y repetir el ensayo.
C. Anillos demasiado pequeños		
1. Calibrador sin diluir (menos de 7,7mm)	i) Medición inexacta del anillo.	} Ver B1
	ii) Aplicación de volumen incorrecto.	
	iii) Aplicación de volumen inexacto.	
	iv) Deterioro calibrador.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir el ensayo con calibrador nuevo.
	v) Temperatura de incubación demasiado baja (ver sección 8.6).	Repetir el ensayo incubando a 20-24°C.
2. Muestras (por debajo del rango aceptable – ver sección 10.1).	i) Concentración demasiado baja.	Ver sección 8.3.4. y repetir el ensayo.
	ii) Aplicación de volumen incorrecto.	Verificar si se ha aplicado el volumen de 5µL.
D. Anillos dobles / múltiples	i) precipitación no específica cerca del pocillo (motivo: PEG en el gel).	Leer anillo exterior.
	ii) Aplicación defectuosa de la muestra.	Repetir el ensayo.
	iii) Deterioro calibrador.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir el ensayo con calibrador nuevo.
		b) Producto caducado. Repetir el ensayo con nuevo kit.
iv) Deterioro muestra.	Repetir el ensayo con muestra reciente.	
E. Anillos no-circulares		
i) Error en el procedimiento	ii) Gel se ha secado antes del empleo.	Repetir el ensayo.
	iii) Gel se ha secado durante la aplicación de la muestra o durante la incubación.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir el ensayo con placa nueva
		b) Producto caducado. Repetir el ensayo con nueva placa / kit.
	iv) Reducción de anticuerpos locales por concentración demasiado alta en la muestra.	Diluir muestras y repetir el ensayo.
F. Gel turbio		
i) La placa ha sido congelada.	ii) Gel se ha secado antes del uso.	Repetir el ensayo con placas correctamente almacenadas.
	iii) Gel se ha secado durante la aplicación de la muestra o durante la incubación.	Ver E(ii).
		Ver E(iii).

Problema	Causa(s) posible(s)	Recomendación(es)
G. Gel quebradizo y no nivelado	La placa ha sido congelada.	Repetir el ensayo con placas correctamente almacenadas.
H. Curva de calibración deficiente		
1. Curva no lineal (método DOS)	i) Difusión incompleta.	Incubar durante otras 24 horas y volver a medir los aros.
	ii) Anillos del calibrador demasiado pequeños / grandes.	Ver B1 o C1 (valido también para el calibrador medio y bajo).
	iii) Curva de calibración mal trazada.	Verificar trazado curva de calibración.
2. Punto de intersección con el eje "y" fuera de rango (Sección 9)	i) Diámetro de los anillos de los calibradores demasiado grandes o pequeños.	Ver B1 y C1 (Válido también para el calibrador medio y bajo).
	ii) Curva de calibración mal trazada.	Verificar trazado curva de calibración.

10.1 El diagnostico y el inicio del tratamiento no debe basarse solamente en la medición de C3 / C4. Se deben tener en cuenta el historial clínico así como otras pruebas de laboratorio.

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

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

11 RESULTADOS ESPERADOS

Concentraciones en suero adulto normal (determinadas utilizando estos kits):

C3	Nº de muestras	Media (mg/L)	Mediana (mg/L)	SD (n-1)	Rango percentil 95 (mg/L)
Hombre normal	55	1239	1232	164	970-1576
Mujer normal	45	1216	1191	139	1032-1495

C4	Nº de muestras	Media (mg/L)	Mediana (mg/L)	SD (n-1)	Rango percentil 95 (mg/L)
Hombre normal	50	289	282	75	162-445
Mujer normal	52	268	267	59	167-385

Concentraciones altas y bajas son asociadas numerosas condiciones diferentes (ver Sección 2).

Los datos suministrados han sido generados de un número limitado de donantes normales de sangre británicos y sólo son orientativos. Se recomienda encarecidamente que cada usuario debería generar sus propios rangos de concentración C3 / C4 en condiciones clínicas apropiadas.

12 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

12.1 Precisión

La precisión (repetitividad) de este kit se expresa como la media y el porcentaje de coeficiente de variación (CV), que se ha determinado utilizando preparaciones de suero conteniendo concentraciones alta, media y baja de C3 y C4. Todos los análisis se realizaron en el laboratorio de Binding Site, Birmingham (RU). A no ser que se indique lo contrario, se determinaron los valores mediante 10 mediciones (determinaciones dobles sobre 5 placas IDR diferentes de un mismo lote normal). Para los procedimientos UNO y DOS se midieron los diámetros de anillo tras 48 horas y para el método TRES, tras 18 horas.

Pool de muestras		Procedimiento 1		Procedimiento 2		Procedimiento 3	
		Conc media (mg/L)	CV	Conc media (mg/L)	CV	Conc media (mg/L)	CV
C3	Alto	1401	1,7%	1443	2,1%	1367	3,2%
	Medio	857	3,6%	857	3,8%	862	1,7%
	Bajo	325	5,3%	281	8,6%	270	4,9%
C4	Alto	520	2,4%	553	2,5%	556	4,3%
	Medio	353	2,6%	369	2,8%	353	3,1%
	Bajo	130	4,4%	128	4,8%	123	5,0%

12.2 Variación intra-placa y variación inter-lote:

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

La variación inter-lote se expresa como el CV de la media de los diámetros obtenidos de placas de lotes recientes. El diámetro medio de cada lote se calculó utilizando el diámetro del anillo a punto final, obtenido con un pool de suero humano como muestra, aplicado a dos (o más) placas de cada lote (6 mediciones por placa).

	Variación intra-placa	Variación inter-lote
	Media CV ± SD(%)	CV(%)
C3	0,79 ± 0,50 (N=3)	1,19% (N=3)
C4	0,93 ± 0,13 (N=3)	0,26% (N=3)

13 BIBLIOGRAFIA

13.1 Roitt, I M, Brostoff, J & Male, D K (1985). Immunology, Publ. Churchill Livingstone, Gower Medical Publishing, New York, London. pp 7.1-7.14.

13.2 Protein Reference Unit Handbook of Clinical Immunochimistry (1986), Ed. A Milford Ware, Publ. PRU Publications, Sheffield, pp 72-74.

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

13.4 Mancini, G, Vaerman, JP et al. (1964). Protides of the biological fluids. (XI Colloquium). Peters H. (ed), Elsevier Publishing Co., Amsterdam. p370.

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

13.6 Scott, B J & Burnett D (1978). The effect on the protein content of diluents on peak height in rocket electrophoresis. Clin. Chim. Acta **89**, 475-478.

14 RESUMEN DEL PROTOCOLO

- 14.1 Seleccionar procedimiento UNO, DOS o TRES. El procedimiento TRES debe ser utilizado si se requieren los resultados rápidamente.
- 14.2 Preparar diluciones de las muestras, lo cual solo se requiere en muestras con concentraciones altas conocidas de C3 / C4.
- 14.3 Permitir la evaporación de la condensación de la/s placa/s IDR.
- 14.4 Aplicar calibrador/es, control y muestras a la/s placa/s IDR en volúmenes de 5µL.
- 14.5 Colocar de nuevo la tapa e incubar a temperatura ambiente (aproximadamente 20-24°C) durante el tiempo fijado - mínimo 18 horas (Procedimiento TRES) o hasta que los anillos se hayan completado - mínimo 48 horas - (Procedimientos UNO y DOS).
- 14.6 Medir el diámetro de los anillos.
- 14.7 Leer los resultados en la tabla de referencia IDR (Procedimiento UNO) o trazar una curva de calibración y leer en ella los resultados (Procedimientos DOS y TRES).

15 TABLA DE REFERENCIA IDR

Tabla de referencia IDR para complemento C3 & C4 humano
Concentraciones en mg/L

Diámetro del anillo (mm)	C3	C4
4,0	172	64,4
4,1	195	73,1
4,2	220	82,3
4,3	244	91,4
4,4	269	101
4,5	293	110
4,6	320	120
4,7	346	131
4,8	375	140
4,9	401	150
5,0	430	161
5,1	458	171
5,2	489	183
5,3	519	194
5,4	550	206
5,5	580	217
5,6	613	229
5,7	646	242
5,8	678	254
5,9	709	266
6,0	745	279
6,1	780	292
6,2	817	306
6,3	851	319
6,4	888	332
6,5	925	346
6,6	963	360
6,7	1000	374
6,8	1040	389
6,9	1080	404
7,0	1120	418
7,1	1160	433
7,2	1200	449
7,3	1240	465
7,4	1280	480
7,5	1330	496
7,6	1370	513
7,7	1410	529
7,8	1460	546
7,9	1500	562
8,0	1550	580
8,1	1590	597
8,2	1640	614
8,3	1690	632
8,4	1740	650
8,5	1790	668
8,6	1840	687
8,7	1890	705
8,8	1930	724
8,9	1990	743
9,0	2040	762
9,1	2090	782
9,2	2150	802
9,3	2200	822
9,4	2250	841
9,5	2310	861
9,6	2360	882
9,7	2420	902
9,8	2470	924
9,9	2530	945
10,0	2590	966

Nota: Los valores anteriores corresponden a muestras aplicadas sin diluir en volúmenes de 5µL. El calibrador alto debería dar un anillo de 8,0± 0,3mm de diámetro a punto final, incubado a 20-24°C.