

KIT INMUNODIFUSION RADIAL COMPLEMENTO C5 HUMANO BINDARID®

Sólo para el diagnóstico *in vitro*

Código Producto: RN027.3

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 PROPÓSITO

Este kit está diseñado para la cuantificación de C5 humano en suero como una ayuda al diagnóstico y el tratamiento de las patologías inmunológicas asociadas al déficit de C5, como el Lupus Eritematoso Sistémico.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El C5 es una beta-1-glicoproteína sérica de 200kD que forma parte de la vía clásica del complemento. Se corta con una C5 convertasa en C5a (una potente anafilatoxina y chemotaxina) y C5b; la secreción de C5b da lugar a la formación del citolítico C5b6789 que es un complejo de ataque a la membrana. La deficiencia de C5 está asociada con una tendencia a infecciones recurrentes por *Neisseria*, especialmente por *N.meningitidis* y *N.gonorrhoeae*. Esto es resultado de la falta de capacidad de generar actividad chemotáctica o de "destruir" las bacterias sensibles al suero. La deficiencia de C5 también está asociada al lupus eritematoso sistémico y se conocen algunas deficiencias hereditarias (refs 1, 2).

La inmunodifusión radial (RID) es una técnica que se utiliza rutinariamente para medir la concentración de diferentes antígenos solubles en fluidos biológicos. Está basada en los trabajos de Fahey & McKelvey (ref. 3) y Mancini *et al.* (refs 4 y 5).

3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

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

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

4 REACTIVOS

1. **Placas RID** (envasadas en sobres herméticos). Éstas contienen en el gel de agarosa, un anticuerpo monoespecífico contra C5. Se pueden medir hasta 14 muestras por placa (incluyendo los calibradores). Conservantes: 0,099% azida sódica, 0,1% ácido E-amino-n-caproico (EACA) y 0,01% benzamida.
2. **Calibradores**. Se suministran liofilizados como un set de 3 conteniendo concentraciones alta, media y baja de C5. La concentración de C5 está detallada en la etiqueta del vial. Conservantes 0,099% azida sódica, 0,1% EACA, 0,01% benzamida.
3. **Solución albúmina sérica bovina (BSA) al 7%**. Se suministra en forma líquida estabilizada. Conservantes: 0,099% azida sódica, 0,1% EACA, 0,01% benzamida.
4. **Control**. Se suministra liofilizado. La concentración esperada de C5 viene indicada en el vial. Conservantes: 0,099% azida sódica, 0,1% EACA, 0,01% benzamida.
5. **Agua destilada**. Para reconstituir los calibradores y el control liofilizado. Conservante: 0,099% azida sódica.

5 ADVERTENCIAS

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.**

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 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

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

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

7 TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

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

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

8 METODOLOGÍA

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

8.1 Contenido

- 8.1.1 3 x *Human Complement C5 NL Bindarid* (Complemento C5 humano NL Bindarid, placas de inmunodifusión radial embolsadas)
- 8.1.2 8 x *Gel dividers* (Partidores de gel)
- 8.1.3 3 x *Human C5 NL Calibrator(s)* (Calibradores C5 NL humano, liofilizados)
- 8.1.4 1 x 5ml 7% *BSA Solution* (Solución 7% BSA)
- 8.1.5 1 x *Human C5 NL Control Serum* (Suero control C5 NL humano, liofilizado)
- 8.1.6 1 x 5ml *Distilled water* (Agua destilada)
- 8.1.7 1 x manual instrucciones, incluye tabla referencia RID

8.2 Materiales necesarios no suministrados

- 8.2.1 Equipamiento para la colección y preparación de las muestras, p.ej. tubos de muestras, 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 5µL 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 Placas RID

Para evitar una contaminación del gel, se deberán utilizar las placas en un ambiente libre de polvo. Sacar la placa de su embalaje y abrir la tapa. **Nota:** En caso de verse en la tapa de la placa condensación, colocar la placa boca abajo hasta haber quitado la tapa, evitando así que caigan gotas dentro del gel. Asegurarse de que la placa no tenga daños durante el almacenamiento (p.ej. Grietas en el gel). Abrir la tapa y dejar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos (si 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 liofilizados se deben reconstituir con el volumen de agua indicada en la etiqueta del vial (se debe utilizar el agua destilada que incluye el kit). Antes de usarlos, todo el material de los viales debe estar completamente disuelto (por inmersión) durante un mínimo de 30 minutos. Se deben mezclar bien antes de su uso. El calibrador medio y bajo solo se usaran cuando sea necesaria una curva de calibración (Procedimientos DOS y TRES).

8.3.3 Control

El control liofilizado se reconstituirá con el volumen de agua indicado en el vial. Se debe mezclar generosamente por inmersión hasta que todo el contenido esté bien disuelto. Se dispensará en la placa sin diluir.

8.3.4 Muestras

Las muestras, normalmente no requieren dilución. En sueros con elevados niveles de C5 puede que sea necesaria una dilución antes de dispensar las muestras. En estos casos, se recomienda utilizar un volumen de muestra de 20µL y mezclarlo con el volumen necesario de BSA. Para muestras que contengan concentraciones de C5 por debajo del nivel de detección de la placa, se recomienda lo siguiente:

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

8.4 Procedimientos

8.4.1 Procedimiento UNO: Tabla de referencia RID

Este método no requiere la construcción de una curva de calibración – concentraciones de muestra correspondientes a cada diámetro de aro se leen directamente en la tabla de referencia RID. Se deja desarrollar el aro a conclusión lo cual requiere un tiempo mínimo de 72 horas. Para comprobar el correcto funcionamiento se dispensa el calibrador alto en cada placa.

8.4.2 Procedimiento DOS: Curva de calibración a conclusión

En este método se usan los tres calibradores para confeccionar una curva lineal de calibración. Los Aros deben dejarse desarrollar a conclusión lo cual requerirá un tiempo mínimo de difusión de 72 horas. Se recomienda realizar una curva de calibración para cada placa. Para comprobar el correcto funcionamiento se dispensa el calibrador alto en cada placa.

8.4.3 Procedimiento TRES: Curva de calibración antes de conclusión

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

8.5 Aplicación del calibrador y las muestras

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

Nota: Para aquellas muestras sospechosas de contener concentraciones bajas se puede rellenar dos veces los pocillos. Se rellena el pocillo primero con 5µL de muestra y se deja difundir completamente en el gel, puede durar unos 30 minutos. Se recomienda dejar la tapa en su sitio durante este proceso. Entonces se puede realizar una segunda carga (otra vez usando 5µL) e incubar la placa como habitualmente. Los resultados obtenidos deberán corregirse para el doble volumen y serán menos precisos que los obtenidos por el proceso de carga simple.

8.6 Incubación

Tras la aplicación de las muestras se debe cerrar la tapa e incubar la placa en una superficie plana a temperatura ambiente (20-24°C). ¡Bajo ninguna circunstancia se puede secar el gel durante la incubación! Por ello se deben incubar las placas dentro de los sobres herméticos bien cerrados o bien dentro de una cámara húmeda (caja de plástico con tapa y toallitas húmedas). El tiempo de incubación mínimo para el Procedimiento TRES es de 18 horas y para difusión completa (Procedimientos UNO y DOS) es de 72 horas. El diámetro final del anillo puede verse afectado por la temperatura, el tamaño esperado para el calibrador alto es de 8,0mm (±0,3mm) cuando se incuba a 20-24°C. Se deben evitar temperaturas extremas.

8.7 Control de calidad

El control debería tratarse igual que una muestra tras su reconstitución. Se recomienda aplicar un control a cada placa utilizada. Los valores obtenidos para el control deben estar entre ±10% de la concentración indicada en el etiqueta del vial.

9 MEDICIÓN DEL ARO Y RESULTADOS

Tras el tiempo de difusión requerido, los diámetros de aro deben medirse con una precisión de 0,1mm, mediante una lupa de joyero o un lector RID. 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: para los procedimientos UNO y DOS se deben desarrollar los aros a conclusión. Si existe cualquier duda, deberían medirse de nuevo los diámetros al cabo de 24 horas y asegurarse de que no han aumentado. El calibrador alto debe dar un diámetro de aro de 8,0mm ± 0,3mm a conclusión. Si el diámetro del aro está fuera de este rango, ver RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS (Sección 10.3).

Procedimiento UNO

Leer las concentraciones de la muestra directamente de la tabla de referencia de RID. Las concentraciones de las muestras que tengan aros superiores en diámetro al del calibrador alto deberán considerarse tan sólo aproximadas ya que ha podido haber una difusión incompleta, estas muestras pueden afectar a los anillos de muestras situadas en pocillos muy cercanos. Estas muestras se deberían diluir y volver a testar. Las muestras con diámetros de anillos inferiores al del calibrador bajo, estarían en el límite de la tabla de referencia RID y se deberían volver a testar más concentradas (ver sección 8.3.4). **Cualquier variación en la dilución recomendada de la muestra (sin diluir) se deberá tener en cuenta para calcular el resultado.**

Ejemplo:

Muestras	Dilución	Diámetro (D) del aro (mm)	Valor tabla (mg/L)	Conc. muestra original (mg/L)
C5 Suero A	Sin diluir	6,4	115	115
C5 Suero B	Sin diluir	>11	> 410	> 410
C5 Suero B	1/3	7,1	149	447*

* Calculado como sigue: Valor tabla x dil. recomendada / dil. actual, p.ej. 149mg/L x (1)/(1/3).

Procedimiento DOS

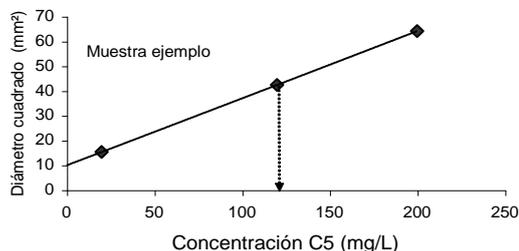
Representar gráficamente el cuadrado de los diámetros de los Aros de precipitación formados por los tres calibradores contra las concentraciones de C5 correspondientes (indicados en la etiqueta del calibrador). Las concentraciones de C5 se trazan en el eje horizontal (x) y los cuadrados de los diámetros de aro en el eje vertical (y). Como curva se escoge la mejor conexión posible de estos tres puntos. El punto de intersección con el eje "y" deberá ser de 10-12mm². La concentración de C5 se determina por la curva de calibración. Importante: recordar posibles diluciones empleadas y ajustar correspondientemente.

Cálculo de la muestra:

Los calibradores C5 dan los siguientes diámetros en un test de C5 a conclusión:

Calibrador	Conc. (mg/L)	Diámetro (D) del aro (mm)	D cuadrado (mm ²)
Alto	200	8,0	64,0
Medio	120	6,5	42,3
Bajo	20	3,9	15,2

La curva de calibración se dibujó utilizando estos resultados:



Una muestra desconocida, dispensada sin diluir como se recomienda, da un aro de 6,5mm diámetro en esta placa. A partir de la curva, esto corresponde a una concentración C5 de 120mg/L. Por lo tanto, la concentración de IC5 en la muestra sin diluir = 120mg/L.

Procedimiento TRES

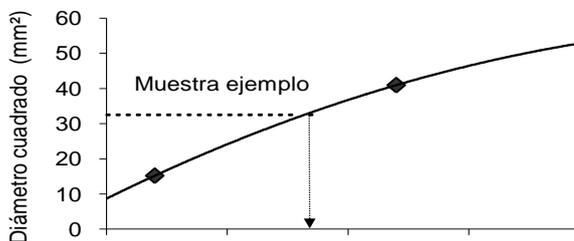
Trazar la curva de calibración según el método DOS. No se obtiene una línea recta pero si una curva, decreciente según aumenta la concentración de proteínas. El punto de intersección del eje "y" debe ser como el del método DOS. La lectura de las concentraciones se leen de la curva de calibración. Importante: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

Cálculo de la muestra:

Los calibradores C5 dieron los siguientes diámetros de aro en una placa C5 después de 18 horas de difusión:

Calibrador	Conc. (mg/L)	Diámetro (D) del aro (mm)	D cuadrado (mm ²)
Alto	200	7,3	53,3
Medio	120	6,4	41,0
Bajo	20	3,9	15,2

La curva de calibración se dibujó utilizando estos resultados:



Una muestra desconocida, dispensada sin diluir como se recomienda, da un aro de 5,7mm en esta placa. A partir de la curva, esto corresponde a una concentración de C5 de 84mg/L. Por lo tanto, la concentración de C5 en la muestra = 84mg/L.

10 LIMITACIONES

10.1 El método UNO facilita resultados exactos solo para el rango indicado en la tabla de referencias RID. Se debe tener en cuenta, que diámetros de aro mayores que los del calibrador sin diluir (8,0mm) son sólo aproximados (ver Sección 9). Los resultados para los métodos DOS y TRES están limitados por el trazado correcto de la curva de calibración estándar. No se recomienda efectuar una extrapolación de los valores obtenidos. Muestras con resultados fuera de estos rangos deben ser testadas de nuevo con una dilución o concentración adecuada (ver Sección 8.3.4).

10.2 FDA (USA) Advertencia: ver la primera página de la metódica en inglés.
10.3 RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible(s) causa(s)	Sugerencia(s)
A. No hay aro para		
1. Calibrador(es)	Omisión del calibrador	Repetir prueba
2. Muestra	i) Omisión de la muestra	Repetir prueba
	ii) Concentración demasiado alta/baja	Diluir / concentrar y repetir prueba
3. Calibrador(es) y muestras	Deterioro placa	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir prueba con placa nueva
		b) Producto caducado. Repetir prueba con nueva placa o kit
B. Aros demasiado grandes para		
1. Calibrador alto (más de 8,3mm)	i) Medición inexacta del aro	Medir de nuevo con lupa o con el lector RID
	ii) Aplicación de volumen incorrecto	Verificar si se ha aplicado el volumen de 5µL

Problema	Posible(s) causa(s)	Sugerencia(s)
	iii) Aplicación de volumen inexacto	a) Mal funcionamiento de la micropipeta – verificar funcionamiento y repetir prueba b) Error de procedimiento – Repetir prueba
	iv) Reconstitución errónea del calibrador	a) Mal funcionamiento de la pipeta. Revisar y calibrar. Usar un nuevo calibrador b) Error de procedimiento. Repetir prueba con un nuevo calibrador
	v) Evaporación parcial del calibrador durante el almacenamiento	Repetir prueba utilizando calibrador nuevo
	vi) Deterioro placa	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir con placa nueva b) Producto caducado. Repetir con un kit nuevo
	vii) Reducción de anticuerpos locales por concentración demasiado alta en la muestra.	Diluir las muestras y repetir usando una nueva placa
	viii) Temperatura de incubación demasiado elevada (ver punto 8.6)	Repetir prueba incubando a 20-24°C
	2. resultados de muestras por encima del rango aceptado - ver sección 10.1)	i) Concentración demasiado alta ii) Aplicación incorrecta de volúmenes
C. Aros demasiado pequeños para		
1. Calibrador alto (menos de 7,7mm)	i) Medición inexacta del aro	} Ver B1
	ii) volumen incorrecto	
	iii) Mala dispensación	
	iv) Reconstitución del calibrador incorrecto	
	v) Deterioro del calibrador	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir con placa nueva b) Producto caducado. Repetir con un kit nuevo
	vi) Temperatura de incubación demasiado baja (ver punto 8.6)	Repetir prueba incubando a 20-24°C
2. Muestras (por debajo del rango aceptable – ver punto 10.1)	i) Concentración demasiado baja	Ver punto 8.3.4 y repetir prueba
	ii) Aplicación de volumen incorrecto	Verificar si se ha aplicado el volumen de 5µL
D. Aros dobles/múltiples	i) Precipitación no específica cerca del pocillo (motivo: PEG en el gel)	Leer aro exterior
	ii) Mala aplicación de la muestra	Repetir prueba
	iii) Deterioro del Calibrador	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir prueba con calibrador nuevo b) Producto caducado. Repetir prueba con nuevo kit
	iv) Muestra deteriorada	Repetir el ensayo usando una nueva muestra
E. Aros no circulares	i) Mala aplicación de la muestra	Repetir el ensayo
	ii) Gel se ha secado antes de su empleo	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir con placa nueva b) Producto caducado. Repetir prueba con kit/placa nueva
	iii) Gel se ha secado durante la aplicación de la muestra o durante la incubación	Repetir prueba reduciendo el tiempo de apertura de la placa. Incubar en una cámara húmeda cerrada
	iv) Reducción de anticuerpos locales por concentración demasiado alta en la muestra	Diluir muestras y repetir prueba
F. Gel turbio	i) La placa ha sido congelada	Repetir prueba con placa correctamente almacenada. Verificar almacenado
	ii) Gel se ha secado antes del uso	Ver E(ii)
	iii) Gel se ha secado durante la aplicación de la muestra o durante la incubación	Ver E(iii)
G. Gel quebradizo y no nivelado	La placa ha sido congelada	Repetir prueba con placa correctamente almacenada. Verificar almacenado
H. Curva de calibración deficiente	1. Curva no lineal (método DOS)	
	i) Difusión incompleta	Incubar durante otras 24 horas y volver a medir los aros
	ii) Aros del calibrador demasiado pequeños / grandes	Ver B1 o C1 (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 sección 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

10.4 El diagnóstico y tratamiento no debe basarse solo en la cuantificación de C5. Se deben tener en cuenta el historial así como otras pruebas clínicas.

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

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

11 RESULTADOS ESPERADOS

Los siguientes resultados se han obtenido con este kit usando sueros de donantes de sangre sanos (las concentraciones de C5 están en mg/L):

	Media (mg/L)	SD (n-1)	Mediana (mg/L)	Rango percentil 95 (mg/L)	No de muestras
Hombres sanos	132,3	23,4	137	90-172	53
Mujeres sanas	132,5	17,5	135	100,8-169	57

Los datos suministrados se han obtenido de un número limitado de donantes británicos y sólo deben ser usados como guía. Recomendamos que cada usuario establezca su propio rango de concentraciones de C5 en función de las condiciones clínicas a estudiar.

12 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

12.1 Precisión

La precisión (reproducibilidad) de este kit se expresa como la mediana y el porcentaje del coeficiente de variación (CV) que se ha determinado usando preparaciones de sueros humanos conteniendo concentraciones altas, medias y bajas de C5. Todas las determinaciones se han realizado en nuestro laboratorio. Cada valor se ha calculado a partir de 10 determinaciones (determinaciones en duplicado en cinco placas distintas de un lote típico) si no se especifica lo contrario. Para los procedimientos UNO y DOS, los aros se leyeron después de 72 horas. Para el procedimiento TRES los aros se leyeron después de 18 horas.

Pool de muestras	Procedimiento UNO		Procedimiento DOS		Procedimiento TRES	
	Conc. media (mg/L)	CV %	Conc. media (mg/L)	CV %	Conc. media (mg/L)	CV %
C5						
Alto	176,8	2,2	175,8	2,1	174,6	5,1
Medio	114,8	1,9	112,0	2,1	106,0	4,8
Bajo	42,5	3,7	38,6	5,4	32,9	6,2

12.2 Variación intra-placa e inter-lote

La variación intra-placa se expresa como la media ± desviación standard de las determinaciones del CV usando 3 placas de lotes distintos. Se realizaron seis determinaciones de una misma preparación por placa usando tres pools de sueros humanos distintos como muestra.

La variación inter-lote se expresa como el CV de la media de los valores de concentración obtenidos de placas de lotes recientes. Tres pools de sueros humanos se usaron como muestra en placas de cada lote (se midieron tres aros por placa).

	Variación intra-placa		Variación inter-lote	
	Media	CV (%)	Media	CV (%)
Alto	2,85 ± 0,85 (N=4)		1,99 (N=4)	
Medio	2,86 ± 2,12 (N=4)		1,41 (N=4)	
Bajo	5,44 ± 0,04 (N=4)		7,14 (N=4)	

La concentración media para cada pool para cada lote se calculó usando los diámetros determinados a conclusión (Procedimiento DOS).

13 BIBLIOGRAFIA

- 13.1 Holme, ER & Whaley, K (1989). Complement and related clinical disorders. Blood Rev. 3, 120 – 129.
- 13.2 Ross, SC & Densen, P (1984). Complement deficiency states and infection: Epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. Medicine 63, 243-273.
- 13.3 Fahey, JL & McKelvey, EM (1965). Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. J. Immunol. 94, 84-90.
- 13.4 Mancini, G, Vaerman, J P et al (1964). Protides of the biological fluids (XI colloquium). Peters H. (ed), Publ. Elsevier Publishing Co., Amsterdam p370.
- 13.5 Mancini, G, Carbonara, A O et al (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochem, 2, 235-254.

14 RESUMEN DEL PROTOCOLO

- 14.1 Seleccionar el procedimiento UNO, DOS o TRES. El procedimiento TRES se debe usar si se necesitan resultados urgentes.
- 14.2 Reconstituir los calibradores y el control con el agua destilada suministrada con el kit.
- 14.3 Preparar las diluciones de las muestras si es necesario (para muestras con concentraciones elevadas de C5).
- 14.4 Dejar que la condensación de las placas de RID desaparezca.
- 14.5 Dispensar los calibradores, controles y muestras en las placas de RID. El volumen a dispensar es de 5µL.
- 14.6 Tapar de nuevo la placa e incubar a temperatura (aproximadamente 20-24°C) por un tiempo determinado (mínimo 18 horas) (Procedimiento TRES) o hasta que los anillos se hayan completado (mínimo 72 horas) (Procedimiento UNO y DOS).
- 14.7 Medir el diámetro de los aros.
- 14.8 Leer los resultados en la tabla de referencia RID (Procedimiento UNO) o dibujar la curva de calibración y leer los resultados (Procedimientos DOS y TRES).

Tabla referencia RID para C5 humano
Concentraciones en mg/L

Diámetro del aro (mm)	Conc.
4,0	22,2
4,1	25,2
4,2	28,3
4,3	31,5
4,4	34,6
4,5	37,8
4,6	41,3
4,7	44,7
4,8	48,4
4,9	51,8
5,0	55,4
5,1	59,1
5,2	63,1
5,3	67,0
5,4	70,9
5,5	74,9
5,6	79,1
5,7	83,3
5,8	87,5
5,9	91,5
6,0	96,2
6,1	101
6,2	105
6,3	110
6,4	115
6,5	119
6,6	124
6,7	129
6,8	134
6,9	139
7,0	144
7,1	149
7,2	155
7,3	160
7,4	166
7,5	171
7,6	177
7,7	182
7,8	188
7,9	194
8,0	200
8,1	206
8,2	212
8,3	218
8,4	224
8,5	231
8,6	237
8,7	243
8,8	250
8,9	256
9,0	263
9,1	270
9,2	276
9,3	283
9,4	290
9,5	297
9,6	304
9,7	311
9,8	318
9,9	326
10,0	334
10,1	342
10,2	348
10,3	355
10,4	363
10,5	371
10,6	378
10,7	386
10,8	394
10,9	402
11,0	410

Nota: Estos valores son válidos tan solo si se han dispensado 5 μ L de las muestras sin diluir.
El calibrador sin diluir debe dar un diámetro de aro de 8,0 \pm 0,3mm a conclusión cuando se incubaba a 20-24°C.