

KIT BINDARID® FACTOR B 'NL' HUMANO INMUNODIFUSIÓN RADIAL

Solo para el diagnóstico *in vitro*

Código de Producto: RN029.3

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 de la empresa The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK. El resto de marcas y nombres de productos pueden ser marcas comerciales de sus respectivos propietarios.



1 PROPÓSITO

Este kit es para cuantificar la concentración de Factor B humano en suero, como soporte al diagnóstico de deficiencias del complemento.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El Factor B es una beta globulina de 100kD, que forma un complejo con C3b y es adherida por el Factor D, produciendo el complejo activado C3b que provoca la consecuente activación del C3. Se asocian los niveles elevados en suero con infección y trauma. Se han descrito deficiencias genéticas de Factor B (ref. 1).

La inmunodifusión radial (RID) es una técnica usada en rutina para medir la concentración de varios antígenos solubles en fluidos biológicos. Se deriva principalmente de los trabajos de Fahey & McKelvey (ref.2) y Mancini *et al* (ref.3).

3 PRINCIPIO

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

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

4 REACTIVOS

1. **Placas RID** (envasados en sobres herméticos): Estas contienen anticuerpos monoespecíficos a Factor B en gel de agarosa. Se pueden medir hasta catorce muestras por placa (incluyendo calibrador). Conservantes: Azida sódica 0,099%, Ácido E-amino-n-caproico (EACA) 0,1%, Benzamidina 0,01%.
2. **Calibrador**. Se suministra liofilizado. La concentración de Factor B viene indicada en el vial. Supplied lyophilised. Conservantes: Azida sódica 0,099%, EACA 0,1%, Benzamidina 0,01%.
3. **Solución 7% Suero Albúmina Bovina (BSA)**. Se suministra en forma líquida estabilizada para diluir las muestras en caso necesario. Conservantes: Azida sódica 0,099%, EACA 0,1%, Benzamidina 0,01%.
4. **Control**. Se suministra liofilizado. La concentración esperada de Factor B viene indicada en el vial. Conservantes: Azida sódica 0,099%, EACA 0,1%, Benzamidina 0,01%.
5. **Agua destilada**. Para reconstituir el calibrador y control liofilizados. Conservante: 0,099% Azida sódica.

5 ADVERTENCIA

La suero humano 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: Este kit contiene azida sódica y debe manipularse 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.

De no seguir estas instrucciones, no se pueden garantizar los resultados. 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! 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 controles e IgG agregado por calor sin estrenar 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 alicuotados y congelados (-20°C o más bajo). Todos los demás reactivos deben almacenarse entre 2 y 8°C.

7 PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Para este análisis se pueden usar muestras de suero. 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 alicuotar 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 METODOLOGIA

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

8.1 Contenido

- 8.1.1 3 x *Human Factor B NL Bindarid* (placas de Inmunodifusión radial)
- 8.1.2 8 x *Gel Dividers* (Divisores de gel)
- 8.1.3 1 x *Human Factor B NL Calibrator* (lyophilised) Calibrador
- 8.1.4 1 x 5mL 7% *BSA Solution*
- 8.1.5 1 x *Human Factor B Control Serum* (Control Normal, liofilizado)
- 8.1.6 1 x 5mL *Distilled Water* (Agua Destilada)
- 8.1.7 1 x Instrucciones y Tabla de referencias RID.

8.2 Materiales necesarios pero no suministrados

- 8.2.1 Equipamiento para la colección y preparación de las muestras, p.ej. tubos de muestras, centrífuga, etc.
- 8.2.2 Pipetas para una adecuada dilución de las muestras y controles.
- 8.2.3 Micropipetas para la aplicación de las muestras. Estas deberán dispensar 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 milimetrado.

8.3 Preparación de los reactivos

8.3.1 RID Plate(s)

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 pipetar las muestras en pocillos que todavía tengan condensación!

Partición de la placa: Las placas pueden dividirse antes de su empleo hasta en cuatro secciones, utilizando para ello los divisores de gel. Colocar cada divisor con cuidado y con la arista afilada hacia abajo. El brazo estabilizador deberá descansar sobre la etiqueta de plástico central. Presionar firmemente sobre el brazo para cortar el gel y dejarlo en posición.

La división de las placas solamente se recomienda cuando solo se vaya a emplear una parte de los 14 pocillos o para la medición de muestras con sospecha de una elevada concentración de antígeno. En estas muestras se puede llegar a una amplia difusión del antígeno, por lo que en zonas apartadas de la placa se reduce la concentración de anticuerpos. Tras el uso parcial, las placas deberán guardarse en su sobre hermético bien cerrado entre 2 y 8°C con los separadores puestos. Guardar las placas divididas boca arriba y utilizar dentro de las siguientes 4 semanas.

8.3.2 Calibrador

El calibrador liofilizado se reconstituirá con el volumen de agua destilada indicado en la etiqueta del vial – usar el agua destilada suministrada con el kit. Antes del uso, todo el material contenido en la botella debe haberse diluido completamente (invirtiendo el vial un mínimo de treinta minutos). El calibrador está prediluido y se aplica directamente a la placa. Deberán realizarse diluciones del calibrador solo si se necesita confeccionar la curva de calibración (Tal como en los Procedimientos DOS y TRES). Estas diluciones serán habitualmente una dilución media (60%, p.ej. 6 partes en 10) y una dilución baja (10%, p.ej 1 parte en 10). Se recomienda mezclar 120µL de calibrador con 80µL del diluyente suministrado (7% BSA) para una dilución al 60%, y 25µL de calibrador con 225µL del diluyente para una dilución al 10%.

8.3.3 Control

El control liofilizado se reconstituye con el volumen de agua destilada indicado en la etiqueta del vial. Se mezclará cuidadosamente por inversión hasta total dilución del contenido. Se aplicará directamente a la placas.

8.3.4 Muestra

Las muestras normalmente no requieren dilución. Solo cuando se trate de muestras con un elevado contenido en Factor B será necesario diluir. En tales casos para conseguir una buena precisión se sugiere un volumen mínimo de 20µL de muestra con el volumen apropiado de BSA. Para muestras con concentraciones de Factor B inferiores a los límites de detección de las placas, se recomienda uno de los siguientes procedimientos:

- i) Concentrar la muestra
- ii) dispensar una doble carga de muestra en el pocillo (ver Sección 8.5)

8.4 Procedimientos

8.4.1 Procedimiento UNO: Tabla de referencia RID

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

8.4.2 Procedimiento DOS: Curva de Calibración a Conclusión

En este método se usan tres diluciones de calibrador para confeccionar una curva lineal de calibración. Los Aros deben dejarse desarrollar a conclusión lo cual requerirá un tiempo mínimo de difusión de 72 horas. Para ahorrar pocillos puede utilizarse una única curva de calibración para varias placas del mismo lote. En tales casos se recomienda añadir siempre un calibrador a cada placa para asegurarse del correcto funcionamiento.

8.4.3 Procedimiento TRES: Curva de Calibración antes de Conclusión

En este método las tres concentraciones de calibrador se utilizan 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

El calibrador, control y muestras deberán mezclarse bien antes de la aplicación. Llenar el número de pocillos necesario con 5µL de calibrador preparado usando una micropipeta. Si va a seguirse el Procedimiento DOS o TRES, llenar también con las diluciones del calibrador media y baja. 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 de Factor B, 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 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). 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 tamaño de Aro esperado para el calibrador sin diluir es de 9,0mm (±0,3mm) cuando se incuba a 20-24°C. Deben evitarse 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 aproximando al 0,1mm, mediante una lupa de joyero o un lector de placas RID. Cuando se utilice la Lupa de joyero usar luz brillante lateral y fondo oscuro. Si resulta difícil, ver la placa macroscópicamente y marcar los límites de los aros usando una aguja, la distancia entre estas marcas es más fácilmente medible.

Nota: para los procedimientos UNO y DOS se deben desarrollar los Aros a Conclusión. Si existe cualquier duda, deberían medirse de nuevo los diámetros al cabo de 24 horas y asegurarse de que no han aumentado. El calibrador neto debe dar un diámetro de aro de 9,0mm ± 0,3mm a conclusión. Si el diámetro del aro está fuera de este rango, ver Resolución de Problemas (Sección 10.2).

Procedimiento UNO

La concentración de Factor B se puede leer directamente de la tabla de Referencias RID.

Las concentraciones obtenidas de muestras que dan diámetros superiores al calibrador neto se deberán considerar como aproximados, debido a la posibilidad de difusión incompleta; pueden incluso provocar reducción local del anticuerpo afectando a los tamaños de aros adyacentes. Tales muestras deberían diluirse apropiadamente (a 1/2 dilución, p.ej. una parte de muestra con una parte de BSA) y volver a analizar. Las muestras dando diámetros por debajo del límite inferior de la Tabla de referencias RID, deberán repetirse más concentradas (ver Sección 8.3.4). Cualquier cambio en la concentración de muestra se deberá tener en cuenta al calcular los resultados.

Ejemplo:

Muestra	Dilución	Diámetro de aro (mm)	Valor de tabla (mg/L)	Conc. de la muestra (mg/L)
Factor B suero A	Neto	6,4	196	196
Factor B suero B	Neto	>11	>704	>704
Factor B suero B	1/2	8,5	395	790*

* Calculado como sigue: Valor Tabla x Dilución Recomendada./Dilución Actual., p.ej. 395mg/L x (1)/(1/2).

Procedimiento DOS

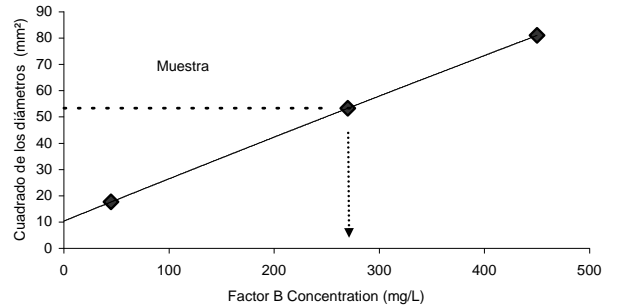
Representar gráficamente el cuadrado de los diámetros de los Aros de precipitación formados por los tres calibradores contra sus concentraciones correspondientes (indicados en la etiqueta del calibrador). Las concentraciones de Factor B se trazan en el eje horizontal (x) y los cuadrados de los diámetros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

Calculo de la muestra:

Los calibradores de FactorB dan los siguientes diámetros en la placa a Conclusión:

Calibrador	Conc. (mg/L)	Diámetro (D) de aro (mm)	Cuadrado de D (mm ²)
Conc Neto	450	9,0	81,0
Medio	270	7,3	53,3
Bajo	45	4,2	17,6

Se traza la curva usando estos resultados:



Una muestra desconocida sin diluir, da un diámetro de aro de 7,3mm en esta placa. De acuerdo con la curva anterior, esto corresponde a una concentración Factor B de 270mg/L.

Procedimiento TRES

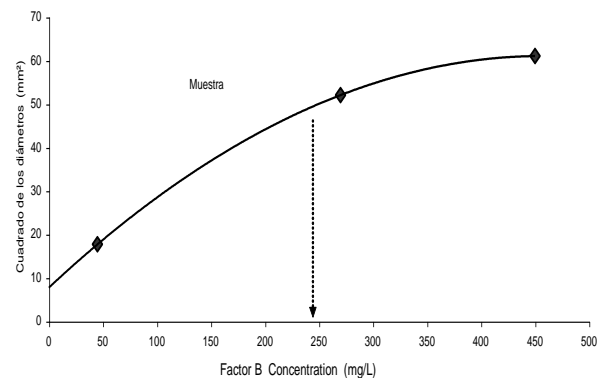
Trazar la curva de calibración según el método DOS. No se obtiene una línea recta pero si una curva, decreciente según aumenta la concentración de proteínas. El punto de intersección del eje "y" debe ser como el del método DOS. La lectura de las concentraciones se leen de la curva de calibración. Importante: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

Calculo de la muestra:

Las diluciones de calibrador de Factor B dan los siguientes diámetros de Aro tras 18 horas de incubación:

Calibrador	Concn. (mg/L)	Diámetro (D) de aro (mm)	Cuadrado de D (mm ²)
Neto Conc	450	7,8	60,8
Medio	270	7,2	51,8
Bajo	45	4,2	17,6

Se traza la siguiente curva de calibración usando estos resultados:



Una muestra desconocida sin diluir, da un diámetro de aro de 7,0mm en esta placa. De acuerdo con la curva anterior, esto corresponde a una concentración de Factor B de 247mg/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 (9,0mm) 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 adecuados (ver sección 8.3.4).

10.2 RESOLUCION 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.

Problema	Posible(s) causa(s)	Sugerencia(s)
B. Aros demasiado grandes para:		
1. Calibrador sin diluir (más de 9,3mm)	i) Medición inexacta del aro.	Medir de nuevo con lupa o con el lector RID.
	ii) Aplicación de volumen incorrecto.	Verificar si se ha aplicado el volumen de 5µL.
	iii) Aplicación de volumen inexacto.	a) Malfuncionamiento de la micropipeta – verificar funcionamiento y repetir prueba. b) Error de procedimiento – Repetir prueba.
	iv) Reconstitución del calibrador incorrecto.	a) Malfuncionamiento de la micropipeta – verificar funcionamiento y repetir prueba con nuevo calibrador. b) Error de procedimiento – Repetir prueba utilizando calibrador nuevo.
	v) Evaporación parcial del calibrador durante el almacenamiento.	Repetir prueba con nuevo calibrador / kit.
	vi) Deterioro placa.	a) Deterioro durante el almacenamiento. Repetir con placa nueva. b) Producto caducado. Repetir con un kit nuevo.
	vii) Reducción de anticuerpos locales por concentración demasiado alta en la muestra.	Diluir las correspondientes muestras y repetir la prueba con una placa nueva.
	viii) Temperatura de incubación demasiado elevada (ver punto 8.6).	Repetir prueba incubando a 20-24°C.
2. resultados de muestras por encima del rango aceptado - ver sección 10.1).	i) Concentración demasiado alta.	Diluir y repetir la prueba.
	ii) Aplicación incorrecta de volúmenes.	Comprobar que se ha aplicado un volumen de 5µL.
C. Aros demasiado pequeños para		
1. Calibrador sin diluir (menos de 8,7mm)	i) Medición inexacta del aro.	} Ver B1
	ii) Aplicación de volumen incorrecto.	
	iii) Aplicación de volumen incorrecto.	
	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 elevada (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. Leer aro exterior.
D. Aros dobles/Múltiples		
i) Precipitación no específica cerca del pocillo (motivo: PEG en el gel).	ii) Error en el procedimiento.	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) Deterioro muestra.	Repetir prueba con muestra reciente.
	E. Aros no-circulares	
i) Error en el procedimiento.	ii) Gel se ha secado antes del 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.	ii) Gel se ha secado antes del uso.	Repetir prueba con placa correctamente almacenada. Verificar almacenado. 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 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 Factor B. 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 reciente.

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

11 VALORES ESPERADOS

Se han obtenido los siguientes resultados con este kit:

	Media(mg/L)	95 Percentil rango (mg/L)	No. de muestras
Factor B	298	205 - 400	29

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

12 CARACTERISTICAS

12.1 Precisión

La precisión (repetitividad) de este kit se expresa como la media y el valor de Coeficiente de variación (CV). El Coeficiente de variación se determina por medición de Pool de sueros que contienen concentraciones altas, medias y bajas de Factor B. Todos los análisis se realizaron en el laboratorio de The Binding Site Group 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 métodos UNO y DOS se midieron los diámetros de aro tras 72 horas y para el método TRES, tras 18 horas.

Pool de muestras	Proced. UNO		Proced. DOS		Proced. TRES	
	Media conc. mg/L	CV	Media conc. mg/L	CV	Media conc. mg/L	CV
Alto	437,6	4,0%	428,2	3,7%	342,6	11,6%
Medio	260,4	7,7%	245,6	10,9%	231,2	5,4%
Bajo	133,5	8,1%	116,4	14,9%	83,6	12,1%

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

La variación dentro de la palca se expresa como la media ± desviación standard de determinaciones de CV usando 5 placas de lotes distintos. Se realizan seis mediciones por placa, utilizando un pool de sueros humanos como muestras.

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

Variación en la placa	Variación interlotes
Media CV%± SD	CV (%)
0,80 ± 0,56 (n=5)	0,57 (n=5)

13 BIBLIOGRAFIA

- 13.1 Marcus-Bagley, D & Alper, CA (1992) Methods for allotyping complement proteins. In: Manual of clinical laboratory immunology, 4th ed. NR Rose *et al* eds. Washington: Am. Soc. Microbiology, 124-125.
- 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, Carbonara, AO *et al.* (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochem. **2**, 235-254.

14 RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

- 14.1 Seleccionar método UNO, DOS o TRES. Si se necesitan resultados rápidamente, seleccionar método TRES.
- 14.2 Reconstituir calibrador(es) y control(es) con el agua destilada del kit.
- 14.3 Preparar diluciones de las muestras (necesario para método DOS y TRES).
- 14.4 Permitir la evaporación de la condensación de la(s) placa(s) RID.
- 14.5 Aplicar calibrador(es), control y muestras a la placa(s) RID en volúmenes de 5µL.
- 14.6 Colocar tapa e incubar a temperatura ambiente (aproximadamente 20-24°C) durante el tiempo fijado (mínimo 18 horas) (Método TRES) o hasta que los aros se hayan completado (mínimo 72 horas) (Método UNO y DOS).
- 14.7 Medir los diámetros de los aros.
- 14.8 Leer los resultados de la tabla de referencias RID (método UNO) o trazar la curva de calibración y leer de ésta los resultados (métodos DOS y TRES).

Tabla de referencias RID para Human Factor B
Concentraciones en mg/L

Diametro de ARO, mm	Conc.
4,0	38,0
4,1	43,2
4,2	48,4
4,3	53,8
4,4	59,3
4,5	65,0
4,6	70,7
4,7	76,6
4,8	82,6
4,9	88,8
5,0	95,1
5,1	101
5,2	108
5,3	115
5,4	121
5,5	128
5,6	135
5,7	143
5,8	150
5,9	157
6,0	165
6,1	172
6,2	180
6,3	188
6,4	196
6,5	204
6,6	213
6,7	221
6,8	230
6,9	238
7,0	247
7,1	256
7,2	265
7,3	274
7,4	284
7,5	293
7,6	303
7,7	312
7,8	322
7,9	332
8,0	342
8,1	352
8,2	363
8,3	372
8,4	384
8,5	395
8,6	405
8,7	416
8,8	427
8,9	439
9,0	450
9,1	461
9,2	473
9,3	485
9,4	497
9,5	509
9,6	521
9,7	533
9,8	545
9,9	558
10,0	570
10,1	583
10,2	596
10,3	609
10,4	622
10,5	635
10,6	649
10,7	662
10,8	676
10,9	690
11,0	704

Nota: Los valores antes citados corresponden a muestras sin diluir con un volumen de 5 μ L. El diámetro de aro del calibrador sin diluir debe dar un diámetro de aro a Punto Final de 9,0 \pm 0,3mm con una temperatura de incubación de 20-24 °C.