

1	Intended Use
2	Summary and Explanation
3	Principle of the Assay
4	Reagents
5	Caution
6	Storage and Stability
7	Specimen Collection and Preparation
8	Methodology
9	Ring Measurement and Result Processing
10	Limitations of Procedure
11	Expected Values
12	Performance Characteristics
13	Bibliography
14	Summary of Procedure
15	RID Reference Table

Deutsch

Français

## HUMAN IgG, IgA & IgM 'NL' BINDARID™ RADIAL IMMUNODIFFUSION KITS

**For *In vitro* Diagnostic Use Only**

**Product Code: RN004.3, RN010.3, RN012.3  
& RK002**

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

*Product manufactured by:*  
The Binding Site Ltd, PO Box 11712, Birmingham, B14 4ZB, UK  
[www.bindingsite.co.uk](http://www.bindingsite.co.uk)  
Telephone: +44 (0) 121 436 1000  
Fax: +44 (0) 121 430 7061  
e-mail: [info@bindingsite.co.uk](mailto:info@bindingsite.co.uk)

*FDA (USA) Information*  
Analyte ID Code: 2806 (IgG); 2803 (IgA); 2808 (IgM)  
Test System ID Code: 61067  
Complexity Cat: High



### 1 INTENDED USE

This kit is intended for measuring human IgG, IgA or IgM in serum and other biological fluids.

### 2 SUMMARY AND EXPLANATION

#### **Immunoglobulin G**

In normal adults, IgG constitutes approximately 75% of the total serum immunoglobulins. It has a Mol. Wt. of 150kD, and is composed of two gamma heavy chains and two light chains. The majority of IgG is synthesised in plasma cells, and its ability to cross the placenta gives it a crucial protective role in the first weeks of life when the neonatal immune system is not fully developed. IgG is divided into four subclasses, IgG1,2,3 and 4 which show considerable differences in their properties, including the ability to fix complement, to bind to macrophages and to pass through the placenta (refs. 1,2,3). Normal serum levels of IgG vary with age (see Section 11) and also race. Raised serum levels are associated with chronic liver disease and myeloma; reduced levels may be associated with malignancy and other severe protein-losing conditions (ref. 4).

#### **Immunoglobulin A**

IgA is the major immunoglobulin class of sero-mucous secretions, part of the defence system for external body surfaces. The monomeric form is composed of two alpha heavy chains and two light chains, but a dimeric form, secretory IgA (sIgA) also occurs in secretions and colostrum. sIgA contains a secretory component and a J chain linking the two IgA molecules. Two subclasses of IgA have been identified in humans; IgA1, which accounts for 80-90% of total serum IgA, and IgA2, which accounts for 30-50% of total IgA in secretions such as milk. The two subclasses appear to be regulated independently. Normal serum levels of IgA vary with age (see Section 11). Raised IgA serum levels are associated with breast feeding, as well as chronic infections, liver disease and myeloma; reduced levels may be associated with certain protein losing conditions (ref. 4).

#### **Immunoglobulin M**

IgM is the first class of immunoglobulin synthesised in response to particulate antigens. Each unit consists of two mu heavy chains and two light chains, five units together with a J-chain comprising an IgM molecule. IgM is therefore multivalent, and deals most efficiently with polyvalent antigens such as bacteria and viruses; it also activates complement. On active immunisation IgM rapidly appears in the serum, but levels normally drop after a week, usually in parallel with the increase in IgG. Normal serum levels are age dependent (see Section 11). Raised IgM levels are associated with hepatitis, myeloma, Waldenstrom's macroglobulinaemia and other infections; reduced levels can occur in antibody deficiency syndrome (ref. 4).

Radial immunodiffusion (RID) is a technique that is routinely used for measuring the concentration of various soluble antigens in biological fluids. It is principally derived from the work of Fahey & McKelvey (ref. 5) and Mancini et al. (refs. 6 & 7).

### 3 PRINCIPLE OF THE ASSAY

The method involves antigen diffusing radially from a cylindrical well through an agarose gel containing an appropriate monospecific antibody. Antigen-antibody complexes are formed which, under the right conditions, 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 the rings are measured at completion. A linear calibration curve is constructed for Procedure TWO, whereas for Procedure ONE a reference table (based upon the ideal linear calibration curve) is provided, which converts ring diameters directly to protein concentrations. Using Procedure THREE, ring diameters are measured before completion; the calibration curve produced will be non-linear.

## 4 REAGENTS

- 4.1 **RID plates** (supplied in foil pouches). These contain monospecific antibody to IgG, IgA or IgM in agarose gel. Up to fourteen samples can be run per plate (including calibrators). Preservatives: 0.099% sodium azide, 0.1% E-amino-n-caproic acid (EACA), 0.01% thiomersal (sodium ethylmercurithiosalicylate), 0.01% benzamide.
- 4.2 **Calibrator(s)**. These are supplied in stabilised liquid form as a set of three containing high, medium and low concentrations of the immunoglobulin. (**Note:** the combi kit contains only one calibrator for each of IgG, IgA and IgM). The concentrations given on the vial labels have been obtained by comparison with the CRM470 International Reference Material. Preservatives: 0.099% sodium azide, 0.1% EACA, 0.01% benzamide.
- 4.3 **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% benzamide.
- 4.4 **Control Serum**. This is supplied in stabilised liquid form. The expected concentrations for IgG, IgA and IgM are marked on the vial label. Preservatives: 0.099% sodium azide, 0.1% EACA, 0.01% benzamide.

## 5 CAUTION

All donors of human serum supplied in this kit have been tested and found negative for Hepatitis B surface antigen (HbsAg) and antibodies to human Immunodeficiency virus (HIV1 & 2) and Hepatitis C virus. However, these tests can not guarantee the absence of infective agents. Proper handling and disposal methods should be established as for all potentially infective material and only personnel adequately trained in such methods should be permitted to perform the procedures.

The plates, calibrators, controls and BSA contain 0.099% sodium azide and plates also contain 0.01% thiomersal 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 for the purposes stated and validity or 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 test 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 the 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 opened they are stable for at least one week at 2-8°C, but for longer storage they should be aliquoted and frozen. All other reagents should be stored at 2-8°C.

## 7 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use fresh or deep frozen serum samples. Microbially contaminated, haemolysed and very lipaemic serum samples or those 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 sample. Results can therefore be accurately compared with the calibrators which have 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 Materials provided:

Individual Kits: (Codes: **RN004.3, RN010.3, RN012.3**)

1. 3 x *Human IgG/A/M NL Bindarid* (radial immunodiffusion plates in foil pouches)
2. 8 x *Gel Dividers*
3. 3 x *Human IgG/A/M NL Calibrator* (liquid calibrator set)
4. 1 x 5mL *7% BSA Solution*
5. 1 x *Human IgG, A and M NL Control Serum* (liquid)
6. 1 x Instruction leaflet, including RID Reference table

**Human Immunoglobulins Combi Kit (RK002)**

1. 3 x *Human IgG/A/M NL Bindarid* (radial immunodiffusion plates in foil pouches - one plate for each class)
2. 8 x *Gel Dividers*
3. 3 x *Human IgG/A/M NL Calibrator* (liquid calibrators - 1 for each class)
4. 1 x 5mL *7% BSA Solution*
5. 1 x *Human IgG, A and M NL Control Serum* (liquid)
6. 1 x Instruction leaflet, including RID Reference table

### 8.2 Materials required but not provided:

- 8.2.1 Equipment for collection and preparation of test samples, eg sample tubes, centrifuge etc.
- 8.2.2 Pipettes for accurate dilution of samples, when required.
- 8.2.3 Micropipettes for sample application. These should be capable of accurately delivering 5µL volumes. Binding Site Micropipettes (code AD041) or 'Hamilton' syringes are recommended.
- 8.2.4 Jeweller's Eyepiece (Code AD040) or RID plate reader for magnifying and accurately measuring the precipitin ring diameters to 0.1mm.
- 8.2.5 Graph paper.

### 8.3 Reagent Preparation

#### 8.3.1 RID Plate(s)

To avoid contamination of the gel, plates should be used in a dust-free environment. Take the plate from the foil pouch and remove the lid. If condensation is visible the plate should be kept upside down until the lid has been removed to prevent droplets falling onto the gel. Check the plate to ensure that no damage has occurred in storage or transit, eg 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(s)

The calibrator is prediluted and must be mixed gently before use. It should be applied to the plates neat. The medium and low calibrators should only be used when a calibration curve is required, as for procedures TWO and THREE (see below). With the combi kit, only a single 'high' calibrator for each immunoglobulin class is provided. Dilutions of these must be made using the 7% BSA provided if procedure TWO or THREE is being followed.

These dilutions should normally be a medium dilution (60%, ie 6 parts in 10) and a low dilution (10%, ie 1 part in 10). It is recommended that 120µL of calibrator is mixed with 80µL of the 7% BSA for a 60% dilution, and 25µL of calibrator is mixed with 225µL of the 7% BSA for a 10% dilution.

#### 8.3.3 Control(s)

The liquid control serum should be applied to the plates undiluted, mixing gently immediately before use.

#### 8.3.4 Samples

Samples should not normally require dilution. Sera from patients with myeloma and other clinical conditions, however, can contain high levels of immunoglobulin and may require dilution prior to application. In such cases it is suggested that to obtain adequate accuracy a minimum volume of 25µL of test sample is mixed with the appropriate volume of BSA. For samples having immunoglobulin concentrations below the detection limit of the plates, one of the following is recommended:

- i) Concentrate the sample.
- ii) Make a double fill of the well (see Section 8.5).
- iii) Use a kit with lower measuring range if available, (see catalogue).

### 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 48 hours (72 hours for IgM). The high calibrator should be run on each plate used to ensure all are performing correctly.

#### 8.4.2 Procedure TWO: Calibration Curve at Completion.

In this method, all three calibrators (or the appropriate high calibrator plus the two dilutions for combi kits) are used to produce a linear calibration curve. Rings must be allowed to develop to completion which will require a minimum diffusion time of 48 hours (72 hours for IgM). To conserve wells, one calibration curve can be used for several plates of the same batch used concurrently. 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, all three calibrators (or the high calibrator plus the two dilutions for combi kits) 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 to construct a separate calibration curve for each plate used.

## 8.5 Application of Calibrators and Samples

The calibrators, control and test samples should be gently mixed immediately before use. Fill the required number of wells with 5µL of the high calibrator using a micropipette. If Procedure TWO or THREE is being followed, also fill the required number of wells with the medium and low calibrators (medium and low dilutions for combi kits). The remaining wells should then be filled with 5µL of appropriately diluted test samples and controls. Plates should not be left open for long periods during calibrator / test sample application, as this will cause excessive drying of the gel.

**Note:** For those samples suspected of containing low concentrations of the specific proteins, a 'double fill' of the well may be made. The well is initially filled with 5µL 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 5µL) 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 with the lid uppermost 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 48 hours (72 hours for IgM). Final ring diameters may be affected by temperature; the expected ring size for the high calibrator is 8mm ± 0.3mm (7.5mm ± 0.3mm for IgM) when incubated at 20-24°C. Extremes of temperature should be avoided.

## 8.7 Quality Control

The control serum should be treated exactly like test samples. Values obtained for each 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 jeweller's eyepiece or a RID plate reader. When reading with an eyepiece, use bright side lighting and a dark background. If difficulties are experienced, view the plate macroscopically and mark the edges of the rings on the back of the plate using a needle. The distance between these marks may then be more easily measured.

**Note:** For Procedures ONE and TWO ring diameters must have developed to completion. If there is any doubt, rings should be remeasured after a further 24 hours to ensure there has been no increase in their diameters. The high calibrator should give a ring diameter of 8.0mm ± 0.3mm (7.5mm ± 0.3mm for IgM) at completion. If the ring diameter is outside this range, see Trouble Shooting (Section 10.3).

### Procedure ONE

The concentration of immunoglobulin in each test sample can be read directly from the RID Reference Table, **providing it has been applied neat as recommended.**

Concentrations obtained for samples giving ring diameters greater than the high calibrator should be regarded as approximate, due to the possibility of incomplete diffusion; they may also cause local antibody depletion thereby affecting adjacent ring sizes. Such samples should preferably be diluted appropriately and re-tested. 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). Any change from the recommended sample dilution (ie neat) must be taken into account when calculating the results.

### Example

Test Sample	Dilution	Ring Diameter (mm)	Table Value (mg/L)	Original Sample Conc. (mg/L)
IgA Serum A	Neat	6.4	3120	3120
IgA Serum B	Neat	>10.0	>9080	>9080
IgA Serum B	1/2	7.8	5130	10260*

\* Calculated as follows: Table value x Recommended Diln./Actual Diln., ie 5130mg/L x (1)/(1/2).

### Procedure TWO

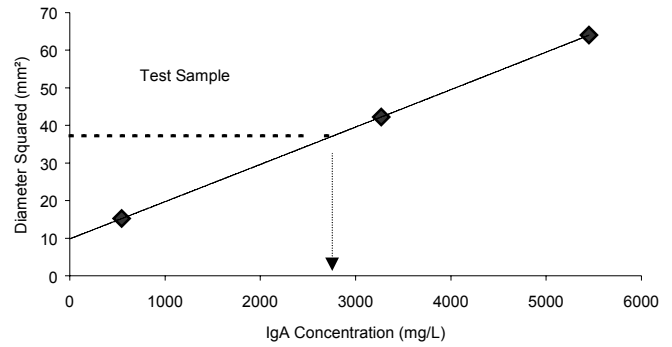
Plot the square of the diameters of the precipitin rings formed by the three calibrators (or the high calibrator plus the two dilutions for the combi kits) versus their immunoglobulin concentration (given on the calibrator vial labels). Immunoglobulin concentrations should be along the horizontal (x) 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 the range 10-12mm<sup>2</sup>. The immunoglobulin concentration is determined from the calibration curve; remember to adjust the sample concentration obtained by any dilution factor used.

### Sample Calculation:

IgA calibrators gave the following ring diameters on an IgA test plate at completion:

Calibrator	Conc. (mg/L)	Diameter (D) of ring (mm)	D squared (mm <sup>2</sup> )
High	5450	8.0	64.0
Medium	3270	6.5	42.3
Low	545	3.9	15.2

A calibration curve was plotted using these results:



An unknown sample, applied neat as recommended, gave a 6.1mm diameter ring on this plate. From the above curve, this corresponds to an IgA concentration of 2680mg/L.

### Procedure THREE

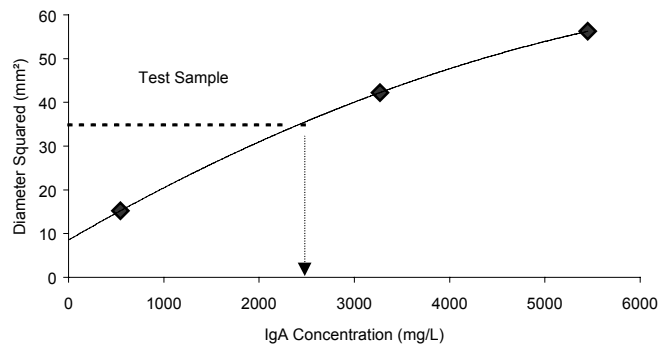
Plot the calibration curve as for Procedure TWO. The graph will not be a straight line but a curve, the gradient of which decreases with increasing protein concentration. The y-intercept should be as indicated for Procedure TWO. Test sample protein concentrations are read off the calibration curve; remember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

### Sample Calculation:

IgA calibrators gave the following diameters on an IgA test plate after 18 hours.

Calibrator	Conc. (mg/L)	Diameter (D) of ring (mm)	D squared (mm <sup>2</sup> )
High	5450	7.5	56.3
Medium	3270	6.5	42.3
Low	545	3.9	15.2

A calibration curve was plotted using these results:



An unknown sample, applied neat as recommended, gave a 5.9mm ring on this plate. From the above curve, this corresponds to an IgA concentration of 2450mg/L.

## 10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

- 10.1** For Procedure ONE, results generated from ring diameters greater than the high calibrator ring diameter (ie 8mm, or 7.5 for IgM) should be regarded as approximate (see Section 9). For Procedures TWO and THREE, accurate results are limited to the calibration curve between the high and low calibrator (low dilution) values – extrapolation beyond these points is not valid. Samples giving results outside these ranges must be diluted or concentrated as appropriate and retested (see Section 8.3.4).
- 10.2** **FDA (USA) Information – see front page**

### 10.3 TROUBLE SHOOTING

Problem	Possible Causes(s)	Suggested Action(s)
<b>A. No ring for:</b>		
1. Calibrator(s)	Calibrator omitted.	Repeat assay.
2. Test sample	i) Sample omitted.	Repeat assay.
	ii) Concentration too high/low	Dilute/concentrate and reassay.

		Suggested Action(s)	
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>B. Oversize rings for:</b>			
1. High calibrator (more than 8.3mm or 7.8 mm for IgM)	i) Inaccurate ring measurement.	Remeasure using eyepiece or RID plate reader.	
	ii) Incorrect volume applied.	Check 5µL volume applied.	
	iii) Inaccurate volume applied.	a) Micropipette malfunction – check operation and repeat assay.	
		b) Poor technique – repeat assay.	
	iv) Partial evaporation of calibrator on storage.	Repeat assay using new calibrator/kit.	
	v) Plate deterioration.	a) Storage damage. Repeat assay using new plate.	
		b) Product expired. Repeat assay using new kit.	
vi) Local antibody depletion due to adjacent high concentration test samples.	Dilute the sample(s) responsible and repeat assay using new plate.		
2. Test samples (above acceptable range – see Section 10.1)	ii) Incorrect volumes applied.	Check 5µL volume applied.	
<b>C. Undersized rings for:</b>			
1. High calibrator (less than 7.7mm or 7.2mm for IgM)	i) Inaccurate ring measurement.	As for B1 above	
	ii) Incorrect volume applied.		
	iii) Inaccurate volume applied.		
	iv) Calibrator deterioration.	a) Storage damage. Repeat assay using new calibrator. b) Product expired. Repeat assay using new kit.	
	v) 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 5µL volume applied.	
<b>D. Double/Multiple rings:</b>			
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.		
<b>E. Non-circular rings:</b>			
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.	
	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.
<b>G. Weak, pitted gel:</b>	Plate has been frozen.	Repeat using new plate. Review storage.	

Problem	Possible Causes(s)	Suggested Action(s)
<b>H. Poor calibration curve:</b>		
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/dilutions).
	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/dilutions).
	ii) Calibration curve constructed incorrectly	Check calibration curve construction.

**10.4** Diagnosis cannot be made and treatment must not be initiated on the basis of IgG, IgA and IgM measurements alone. Clinical history and other laboratory findings must be taken into account.

**10.5** If an unexpected result is obtained, the assay should be repeated, preferably with a fresh sample.

If a problem cannot be resolved, please refer to supplier.

## 11 EXPECTED RESULTS

		Mean Conc. (g/L)	Normal Range (g/L)	Number of samples
IgG	Male	9.96	5.66 - 14.25	62
	Female	9.47	6.29 - 12.65	62
IgA	Male	2.05	0.45 - 3.64	63
	Female	1.70	0.49 - 2.91	60
IgM	Male	1.06	0.03 - 2.09	64
	Female	1.11	0.35 - 1.89	60

The above normal ranges are based on the mean concentration  $\pm$  2 standard deviations. The data provided 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 reference ranges for appropriate clinical conditions.

Serum immunoglobulin concentrations are age-dependent - the results below were obtained by a different radial immunodiffusion method (ref. 8).

### Serum Concentrations of IgG, IgA & IgM at Different Ages (g/L)

AGE	IgG		IgA		IgM	
	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range
Cord blood	10.93	7.45 - 16.02	0.01	0.00 - 0.08	0.11	0.04 - 0.26
1/2 - 3 Months	4.86	2.93 - 8.06	0.13	0.03 - 0.57	0.51	0.16 - 1.64
3 - 6 Months	3.60	1.39 - 9.34	0.18	0.04 - 0.78	0.49	0.20 - 1.20
6 - 12 Months	6.66	4.10 - 10.81	0.32	0.13 - 0.82	1.04	0.48 - 2.29
1 - 2 Years	6.30	3.49 - 11.39	0.36	0.13 - 1.02	1.03	0.40 - 2.29
2 - 3 Years	7.61	4.82 - 12.00	0.51	0.22 - 1.18	1.06	0.54 - 2.09
3 - 6 Years	8.50	5.53 - 13.07	0.77	0.33 - 1.80	1.11	0.56 - 2.18
6 - 9 Years	9.68	6.46 - 14.51	1.01	0.28 - 2.22	1.13	0.55 - 2.32
9 - 12 Years	9.62	6.13 - 15.12	1.21	0.57 - 2.56	1.41	0.70 - 2.84
12 - 16 Years	9.89	6.67 - 14.64	1.28	0.77 - 2.19	1.13	0.49 - 2.61
Adults	10.99	6.58 - 18.37	1.61	0.71 - 3.60	1.33	0.40 - 2.63

Concentrations in excess of 100g/L can occur in the serum of myeloma patients.

## 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 serum preparations containing high, medium and low concentrations of IgG, IgA and IgM. 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 48 hours (72 hours for IgM). For Procedure THREE rings were measured after 18 hours.

Sample Pool		Procedure 1 Mean		Procedure 2 Mean		Procedure 3 Mean	
		Conc (g/L)	CV	Conc (g/L)	CV	Conc (g/L)	CV
IgG	High	21.7	2.3%	20.9	2.2%	20.1	3.7%
	Medium	13.5	2.0%	12.5	1.5%	13.5	1.8%
	Low	5.0	3.9%	4.1	4.0%	4.3	9.7%
IgA	High	4.84	3.0%	4.9	2.9%	4.56	4.7%
	Medium	2.99	1.9%	2.95	1.6%	3.05	1.9%
	Low	1.16	3.9%	1.00	6.6%	1.00	6.6%
IgM	High	2.45	1.9%	2.46	1.7%	2.48	6.9%
	Medium	1.52	2.7%	1.51	2.3%	1.57	1.3%
	Low	0.53	9.9%	0.54	2.5%	0.55	5.0%

### 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 3 plates from separate batches. Six measurements were made per plate, using a human serum pool as the sample.

The interbatch variation is expressed as the CV of mean diameter values obtained from recent batches of plates. The mean diameter for each batch was calculated using

the ring diameter at completion obtained using a human serum pool as the sample, applied to two (or more) plates from each batch (six ring measurements per plate).

**15 RID REFERENCE TABLE**

	Within-plate variation	Interbatch variation
	Mean CV % ± SD (N=3)	CV (%) (N=3)
IgG	0.72 ± 0.27	0.12
IgA	0.83 ± 0.56	1.07
IgM	0.72 ± 0.23	1.12

**13 BIBLIOGRAPHY**

- Hamilton, R H (1987). Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. Clin. Chem. **33**, 1707 - 1725.
- Schur, P H (1987), IgG subclasses - a review. Annals of Allergy, **58**, 89-99.
- Vlug, A & Van Remortel, P (1989). The structure and function of human IgG subclasses. Eur. Clin. Lab. **8**(5), 26-35.
- Zilva, J F & Pannall, P R (1984). Clinical chemistry in diagnosis and treatment. Publ. Lloyd-Luke (Medical Books) Ltd., London. pp 348-352.
- 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. (1963). Peters H. (ed), Amsterdam, Elsevier Publishing Co., p370-373. Protides of the biological fluids. XI Colloquium.
- Mancini, G, Carbonara, A O et al. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochem. **2**, 235-254.
- Lentner, C (ed.) (1984) Geigy Scientific Tables, 8<sup>th</sup> edition, vol 3. Publ. Ciba-Geigy Ltd., Basle, Switzerland. Table 36, p154.

**14 SUMMARY OF PROCEDURE**

- Select Procedure ONE, TWO or THREE. Procedure THREE must be used if results are required quickly.
- Combi Kit only:** Prepare calibrator dilutions if using Procedure TWO or THREE.
- Prepare sample dilutions; this is only required for samples with known high immunoglobulin concentrations.
- Allow condensation to evaporate from RID plate(s).
- Apply calibrator(s), control and samples to RID plate(s) in 5µL volumes.
- Replace lid(s) and incubate at room temperature (20-24°C) for fixed time period - minimum 18 hours (Procedure THREE) or until rings are complete (minimum 48 hours for IgG, IgA; 72 hours for IgM).
- 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 Immunoglobulin Concentration (mg/L)

Diameter of ring (mm)	IgG	IgA	IgM
4.0	2500	605	344
4.1	2840	687	390
4.2	3190	773	440
4.3	3540	859	488
4.4	3900	945	537
4.5	4260	1030	586
4.6	4640	1120	639
4.7	5030	1220	692
4.8	5440	1320	749
4.9	5820	1410	802
5.0	6240	1510	859
5.1	6650	1610	916
5.2	7100	1720	977
5.3	7540	1830	1040
5.4	7980	1930	1100
5.5	8430	2040	1160
5.6	8900	2160	1230
5.7	9370	2270	1290
5.8	9850	2380	1360
5.9	10300	2490	1420
6.0	10800	2620	1490
6.1	11300	2740	1560
6.2	11900	2870	1630
6.3	12400	2990	1700
6.4	12900	3120	1770
6.5	13400	3250	1850
6.6	14000	3390	1920
6.7	14500	3520	2000
6.8	15100	3650	2080
6.9	15700	3800	2160
7.0	16200	3930	2230
7.1	16800	4070	2310
7.2	17400	4220	2400
7.3	18000	4370	2480
7.4	18600	4510	2560
7.5	19200	4660	2650
7.6	19900	4820	2740
7.7	20500	4970	2830
7.8	21200	5130	2910
7.9	21800	5290	3000
8.0	22500	5450	3100
8.1	23200	5610	3190
8.2	23800	5770	3280
8.3	24500	5940	3370
8.4	25200	6110	3470
8.5	25900	6280	3570
8.6	26600	6450	3670
8.7	27300	6620	3770
8.8	28100	6800	3870
8.9	28800	6980	3970
9.0	29600	7160	4070
9.1	30300	7350	4180
9.2	31100	7530	4280
9.3	31900	7720	4390
9.4	32600	7910	4490
9.5	33400	8090	4600
9.6	34200	8290	4710
9.7	35000	8480	4820
9.8	35800	8680	4930
9.9	36700	8880	5050
10.0	37500	9080	5160

**Note:** The above values assume that test samples are applied undiluted in 5µL volumes. The high calibrator should give a ring diameter of 8.0 ± 0.3mm (IgG, IgA) or 7.5 ± 0.3mm (IgM) at completion when incubated at 20-24°C.

1	Verwendungszweck
2	Einleitung
3	Testprinzip
4	Reagenzien
5	Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen
6	Lagerung und Stabilität
7	Probenentnahme und -vorbereitung
8	Testdurchführung
9	Ablesen und Interpretation der Ergebnisse
10	Grenzen der Methode
11	Erwartete Werte
12	Leistungsdaten
13	Bibliographie
14	Kurzanleitung
15	RID-Referenztable

# IgG, IgA & IgM (HUMAN) BINDARID™ KITS FÜR DIE RADIALE IMMUNDIFFUSION

## Nur zur *In vitro* Diagnostik

Bestell-Nr.: RN004.3, RN010.3  
RN012.3 & RK002

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

*In England hergestellt von:*

The Binding Site 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 IgG, IgA oder IgM im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten.

### 2 EINFÜHRUNG

#### Immunglobulin G

In normalen Erwachsenen gehören ca. 75% des gesamten Serum-Immunglobulins zur IgG-Klasse. Es hat ein Molekulargewicht von 150kD und setzt sich aus zwei  $\gamma$ -Ketten (Schwerketten) und zwei Leichtketten zusammen. Das IgG wird überwiegend in den Plasmazellen produziert und durch seine Fähigkeit die Plazenta zu durchdringen, übernimmt es eine wichtige Schutzfunktion in den ersten Wochen nach der Geburt, wenn das neonatale Immunsystem noch nicht voll entwickelt ist. Das IgG setzt sich aus vier Subklassen – IgG1, 2, 3 und 4 – zusammen, die sich deutlich in ihren Eigenschaften unterscheiden: z.B. Fähigkeit zur Komplementbindung, Bindung an Makrophagen und Plazentagängigkeit (Ref. 1,2,3). Die normalen IgG-Serumkonzentrationen sind abhängig von dem Alter (siehe Abschnitt 11) und der Rasse. Erhöhte Serumkonzentrationen sind mit chronischen Lebererkrankungen und Myelomen assoziiert. Erniedrigte Serumkonzentrationen werden in Verbindung mit Immundefekten und anderen schweren Eiweiß-Verlust-Erkrankungen gefunden (Ref.4).

#### Immunglobulin A

IgA ist die wichtigste Immunglobulinklasse der sero-mukösen Sekretion, welche ein Bestandteil des Abwehrsystems auf den externen Körperoberflächen ist. Die monomere Form setzt sich aus zwei  $\alpha$ -Schwerketten und zwei leichten Ketten zusammen. Die dimere Form, das sekretorische IgA (sIgA), findet man hauptsächlich in den Sekreten und Kolostrum. sIgA enthält eine sekretorische Komponente und eine J-Kette, die zwei IgA-Moleküle miteinander verbinden. Das IgA setzt sich aus zwei Subklassen zusammen: IgA1, das ca. 80-90% des gesamten IgA's ausmacht, und IgA2, das in den Sekreten, wie z.B. Muttermilch, 30-50% des IgA's bildet. Die zwei Subklassen werden wahrscheinlich unabhängig voneinander reguliert. Die normalen IgA-Konzentrationen im Serum sind altersabhängig (siehe Abschnitt 11). Erhöhte IgA-Serumkonzentrationen findet man während des Stillens, bei chronischen Infektionen, Lebererkrankungen und Myeloma. Erniedrigte Serumkonzentrationen sind mit verschiedenen Eiweiß-Verlust-Erkrankungen assoziiert (Ref.4).

#### Immunglobulin M

IgM ist die Immunglobulinklasse die zuerst als Antwort auf ein fremdes Antigen gebildet wird. Jede Einheit setzt sich aus zwei schweren und zwei leichten Ketten zusammen. 5 dieser Einheiten, über eine J-Kette miteinander verknüpft, bilden das wirksame IgM-Molekül. Demnach ist IgM multivalent und kann daher sehr effizient auf polyvalente Antigene, wie z. B. Bakterien und Viren, reagieren. Es aktiviert ebenfalls das Komplementsystem. Bei einer aktiven Immunisierung erscheint das IgM sehr schnell im Serum, aber die Konzentration nimmt nach einer Woche wieder ab, parallel dazu steigt die IgG-Konzentration im Serum an. Die normalen IgM-Konzentrationen sind altersabhängig (siehe Abschnitt 11). Erhöhte IgM-Konzentrationen treten bei Hepatitis, Myeloma, Morbus Waldenström und anderen Infektionen auf. Erniedrigte Konzentrationen findet man bei Antikörper-Defizienz-Syndromen (Ref. 4).

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

### 3 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 kann bestimmt werden, 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 Kalibrationskurve ist nicht linear.

#### 4 REAGENZIEN

- 4.1 **Immundefusionsplatten** (in Folienbeutel eingeschweißt): enthalten monospezifisches Antiserum gegen IgG, IgA oder IgM 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-Caprinsäure), 0,01% Thiomersal (Natrium-Ethylmercurithiosalicylat) und 0,01% Benzamidin.
- 4.2 **Kalibratoren**: Ein Set bestehend aus drei Kalibratoren mit hoher, mittlerer und niedriger Konzentration der entsprechenden Immunglobuline. (**Hinweis**: der Kombi-Kit enthält nur einen Kalibrator für jedes Immunglobulin). Sie liegen als stabilisierte Flüssigkeiten vor und die jeweilige Konzentration ist auf dem Flaschenetikett angegeben. Der Wert wurde durch Vergleich mit dem internationalen CRM470-Referenzmaterial ermittelt. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin.
- 4.3 **Die 7 %ige Rinder Serum-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 als stabilisierte Flüssigkeit vor. Die Sollwerte für IgG, IgA und IgM sind auf dem Flaschenetikett angegeben. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin.

#### 5 WARNUNGEN UND VORSICHTMAßNAHMEN

Das Ausgangsmaterial zur Erstellung der Kalibratoren und Kontrollen stammt aus menschlichem Blut. Alle Spender wurden jeweils bezüglich Antikörper gegen Human-Immunschwäche-Virus (HIV 1 & 2), Hepatitis-C-Virus und Hepatitis-B-Oberflächenantigene (HBsAG) untersucht und als negativ befunden. Es gibt aber zur Zeit keine absolut sicheren Testmethoden zum Ausschluss von HIV, Hepatitis-C-Virus oder anderen Infektionsträgern. Deshalb sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden. Umgangs- und Entsorgungsmethoden sollten denen für potentiell infektiösem Material entsprechen. Der Test sollte nur von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden.

Die RID-Platten, Kalibratoren, Kontrollen und BSA-Lösung enthalten 0,099% Natriumazid und die Platten enthalten zusätzlich 0,01% Thiomersal als Konservierungsmittel und müssen mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen behandelt werden. Verschlucken oder Berühren mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Nach Kontakt die Hautstelle mit viel Wasser abspülen und ärztlichen Rat einholen.

Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohren explosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung mit ausreichender Menge Wasser nachspülen um Azidablagerungen zu vermeiden.

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

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

#### 6 LAGERUNG UND STABILITÄT

Den 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. Geöffnet sind sie mindestens eine Woche bei 2-8°C stabil. Für längere Aufbewahrungszeiten sollten sie aliquotiert und bei mindestens -20°C eingefroren werden. Alle anderen Kitkomponenten bei 2-8°C lagern.

#### 7 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 Venenpunkt 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 (wenn notwendig) ausschließlich das im Kit enthaltene Rinder Serum-Albumin (BSA) verwenden, um die Viskosität der Proben zu erhalten. Dadurch können die Ergebnisse direkt mit dem Wert des Kalibrators, der eine ähnliche Viskosität wie normales Serum aufweist, verglichen werden.

### 8 TESTDURCHFÜHRUNG

Eine Zusammenfassung der Testdurchführung befindet sich am Ende der Arbeitsanleitung.

#### 8.1 Gelieferte Materialien: Individuelle Kits (Bestell-Nr.: RN004.3, RN010.3, RN012.3)

- 3 x Human IgG/A/M NL Bindarid (Immundefusionsplatten in Folie eingeschweißt)
- 8 x Gel Dividers (Gel-Trennplatten)
- 3 x Human IgG/A/M NL Calibrator (Kalibratoren, flüssig)
- 1 x 5 mL 7% BSA Solution (Rinderserum-Albumin - BSA)
- 1 x Human IgG, A and M NL Control Serum (Kontrollserum, flüssig)
- 1 x Arbeitsanleitung, inklusive RID-Referenztabelle

#### Immunglobulin Kombi-Kit (Bestell-Nr.:RK002)

- 3 x Human IgG/A/M NL Bindarid (Immundefusionsplatten in Folie eingeschweißt – je 1 Platte pro Immunglobulinklasse)
- 8 x Gel Dividers (Gel-Trennplatten)
- 3 x Human IgG/A/M NL Calibrator (Kalibratoren (flüssig – für jede Immunglobulinklasse einen)
- 1 x 5 mL 7% BSA Solution (Rinderserum-Albumin - BSA)
- 1 x Human IgG, A and M NL Control Serum (Kontrollserum, flüssig)
- 1 x Arbeitsanleitung, inklusive RID-Referenztabelle

#### 8.2 Zusätzlich benötigte, nicht im Kit enthaltene Materialien

- 8.2.1 Laborausstattung zum Sammeln und Vorbereiten der Proben (z. B. Probenröhrchen, Zentrifuge etc.).
- 8.2.2 Pipetten zur exakten Verdünnung der Proben (falls notwendig)
- 8.2.3 Mikropipetten zum Auftragen der Proben. Diese sollten 5µL 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 RID-Reader zur Vergrößerung und genaueren 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 Antigen-Konzentration erwartet. Bei diesen Proben kann es zu einer weitläufige Diffusion des Antigens kommen, wodurch in entfernteren Teilen der Platte die Antikörperkonzentration abnimmt. Unterteilte, teilweise benutzte Platten sind bei 2-8°C in der Folie verpackt bis zu 4 Wochen haltbar. Die Gel-Trennplatten nicht entfernen und das Gel mit der Oberfläche nach oben lagern.

##### 8.3.2 Kalibrator(en)

Die flüssigen Kalibratoren sind vorverdünnt. Vor Gebrauch vorsichtig schütteln und direkt ohne weitere Verdünnung auf die Platte auftragen. Der mittlere und niedrige Kalibrator werden nur für die Erstellung der Standardkurve (Methode 2 und 3) benötigt. Der Kombi-Kit enthält nur einen hohen Kalibrator für jede Immunglobulinklasse. Für Methode 2 und 3 müssen entsprechende Kalibratorverdünnungen hergestellt werden. Dazu wird der Kalibrator auf 60% (Verhältnis 6:10) bzw. 10% (Verhältnis 1: 10) verdünnt (60 %: 120µl Kalibrator + 80µl BSA mischen; 10 %: 25µl Kalibrator + 225µl BSA mischen).

##### 8.3.3 Kontrolle

Die flüssige Kontrolle unverdünnt auftragen. Vor Gebrauch leicht schütteln.

##### 8.3.4 Proben

In der Regel ist keine Verdünnung der Proben notwendig. Seren von Patienten mit Myelomen oder anderen Erkrankungen können hohe Immunglobulin-Konzentrationen enthalten, hier kann eine Verdünnung notwendig werden. In solchen Fällen wird empfohlen mindestens 20µL 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:

- Ankonzentrieren der Probe.
- Doppeltes Probenvolumen auftragen (siehe Abschnitt 8.5).
- Kit mit höherer Empfindlichkeit (siehe Katalog) verwenden.

#### 8.4 Methoden

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

##### 8.4.1 Methode 1: RID-Referenztabelle

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-Referenztabelle

(befindet sich am Ende der Arbeitsanleitung) abgelesen werden. Um sicherzustellen, dass die volle Ringgröße erreicht wird, sollte die Diffusionsdauer mindestens 48 Stunden (72h bei IgM) 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 48 Stunden (72 Stunden bei IgM) dauern. Eine Standardkurve kann für mehrere Platten aus einer Charge verwendet werden. In diesem Fall sollte aber der hohe Kalibrator zur Kontrolle auf jede Platte aufgetragen werden.

#### 8.4.3 Methode 3: Standardkurve vor dem 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 Proben vor dem Auftragen vorsichtig schütteln. Je 5µL des hohen Kalibrators mit einer Mikropipette oder Hamilton-Spritze in eine Vertiefung pipettieren. Bei Methode 2 oder 3 je 5µL des mittleren und niedrigen Kalibrators (Kombi-Kit die mittlere und niedrige Kalibrator-Verdünnung) in je eine Vertiefung pipettieren. In die restlichen Vertiefungen je 5µL der Proben (eventuell verdünnt) und Kontrolle pipettieren. Während des Auftrags sollte die Platte nicht unnötig lange offen stehen, damit das Gel nicht austrocknet.

**Wichtig:** Erwartet man bei einer Probe sehr niedrige Immunglobulin-Konzentrationen, kann das zweifache Probenvolumen in eine Vertiefung aufgetragen werden. Zunächst 5µL 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 5µL der Testprobe 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) 48 Stunden (IgM 72 Stunden). Der Ringdurchmesser wird durch die Temperatur beeinflusst, bei einer Inkubationstemperatur von 20-24°C beträgt der erwartete Ringdurchmesser des hohen Kalibrators 8 mm ± 0.3 mm (7,5 mm ± 0.3 mm bei IgM). Extreme Temperaturen vermeiden.

#### 8.7 Qualitätskontrolle

Die Kontrolle immer wie eine Patientenprobe behandeln. 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 0,1 mm mit Hilfe einer Juwelierlupe oder eines RID-Readers bestimmen. Bei Verwendung einer Lupe ist helles Seitenlicht und ein dunkler Hintergrund sinnvoll. Sollten Ringe schwierig auszuwerten sein, die Ringe makroskopisch beurteilen und die Ränder der Ringe auf der Plattenrückseite mit einer Nadel markieren. Die Abstände zwischen diesen Markierungen können leicht gemessen werden.

**Wichtig:** Bei Methode 1 und 2 müssen die Ringdurchmesser vollständig entwickelt sein. Gibt es daran Zweifel, sollten sie nach 24 Stunden erneut gemessen werden, um sicherzustellen, dass sich der Durchmesser nicht vergrößert hat. Der hohe Kalibrator hat am Diffusionsendpunkt einen Ringdurchmesser von 8,0 mm ± 0,3 mm bzw. 7,5 mm ± 0,3 mm bei IgM. Liegt der Ringdurchmesser nicht in diesem Bereich, siehe "Trouble Shooting" (Abschnitt 10.3).

#### Methode 1: RID-Referenztable

Die Immunglobulin-Konzentration einer Patientenprobe kann direkt aus der RID-Referenztable abgelesen werden, **vorausgesetzt das Serum wurde wie empfohlen, unverdünnt** aufgetragen.

Proben, deren Ringdurchmesser größer als der des höchsten 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-Referenztable 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 (mg/L)
IgA Serum A	unverdünnt	6.4	3120	3120
IgA Serum B	unverdünnt	>10.0	>9080	>9080
IgA Serum B (Wiederholung)	1/2	7.8	5130	10260*

\* Die Konzentration wurde wie folgt berechnet: RID-Referenztable-Wert x empfohlener Verdünnung / tatsächliche Verdünnung: z. B. 5130mg/L x (1)/(1/2).

#### Methode 2: Standardkurve am Diffusionsendpunkt

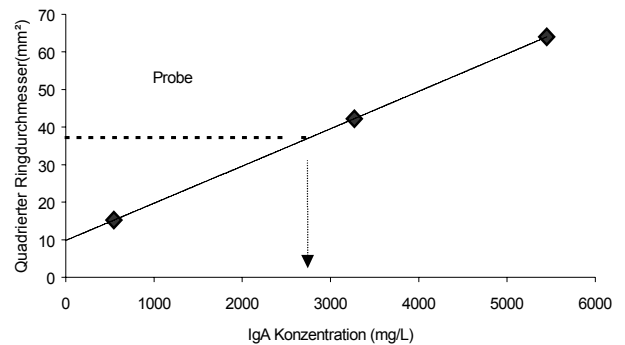
Die Ringdurchmesser der drei Kalibratoren (bei dem Kombi-Kit hoher Kalibrator und die zwei Verdünnungen) bestimmen und die Quadrate der Ringdurchmesser gegen ihre jeweilige Konzentrationen auftragen. Dabei die Immunglobulin-Konzentrationen auf der Abszisse (x-Achse), die quadrierten Ringdurchmesser (mm<sup>2</sup>) 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 10-12mm<sup>2</sup> liegen. Die Immunglobulin-Konzentration der Patientenproben aus der Standardkurve ablesen. Wichtig: Korrektur der Probenkonzentration durch etwaige Verdünnungsfaktoren.

#### Berechnung der Antigenkonzentration in einer Patientenprobe:

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

Kalibrator	Konzentration (mg/L)	Ringdurchmesser (mm)	Quadrat des Ringdurchmessers (mm <sup>2</sup> )
Hoch	5450	8,0	64,0
Mittel	3270	6,5	42,3
Niedrig	545	3,9	15,2

Aus diesen Werten wurde die nachstehende Standardkurve erstellt:



Eine unbekannte Patientenprobe, wie empfohlen unverdünnt aufgetragen, ergibt einen Ringdurchmesser von 6,1 mm auf dieser RID-Platte. Von obiger Standardkurve abgelesen entspricht dies einer IgA-Konzentration von 2680mg/L.

#### Methode 3: Standardkurve vor dem Diffusionsendpunkt

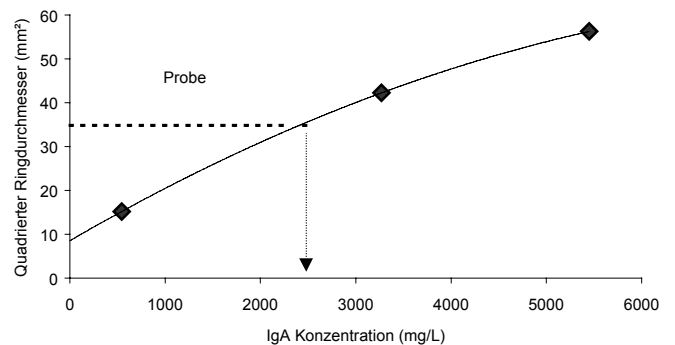
Die Standardkurve wird wie bei Methode 2 erstellt, aber man erhält keine Gerade, sondern eine Kurve. Die Kurve zeigt als Folge der unvollständigen Diffusion bei hohen Konzentrationen einen Abfall. Der Schnittpunkt mit der y-Achse sollte wie bei Methode 2 sein. Die Immunglobulin-Konzentration der Patientenproben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

#### Berechnung der Antigenkonzentration in einer Patientenprobe:

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

Kalibrator	Konzentration (mg/L)	Ringdurchmesser (mm)	Quadrat d. Ringdurchmessers (mm <sup>2</sup> )
Hoch	5450	7,5	56,3
Mittel	3270	6,5	42,3
Niedrig	545	3,9	15,2

Aus diesen Werten wurde die nachstehende Standardkurve erstellt:





Eine unbekannt Patientenprobe, wie empfohlen unverdünnt aufgetragen, ergibt einen Ringdurchmesser von 5,9mm auf dieser RID-Platte. Von obiger Standardkurve abgelesen entspricht dies einer IgA-Konzentration von 2450mg/L.

**10 GRENZEN DER METHODE**

**10.1** Methode 1 liefert nur in dem in der RID-Referenztablette angegebenen Bereich exakte Ergebnisse. Dabei ist zu beachten, dass Ringdurchmesser, die größer als der unverdünnte Kalibrator (8,0 mm bzw. 7,5mm für IgM) 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 Konzentration erneut getestet werden (siehe Abschnitt 8.3.4).

**10.2 FDA (USA) Informationen :** siehe englische Packungsbeilage.

**10.3 TROUBLE SHOOTING**

Problem	Fehlerquelle	Lösung	
<b>A. Keine Präzipitationsringe bei :</b>			
1. Kalibrator(en)	Kalibrator nicht aufgetragen	Test wiederholen	
2. Proben	i) Probe nicht aufgetragen	Test wiederholen	
	ii) Konzentration zu hoch/niedrig	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>B. Zu große Ringe :</b>			
1. Hoher Kalibrator (>8,3mm oder 7.8mm bei IgM).	i) Ring ungenau gemessen	Erneute Messung mit Lupe oder RID-Reader	
	ii) Falsches Volumen aufgetragen	Überprüfen, ob 5 µL aufgetragen wurden	
	iii) Ungenaueres Volumen aufgetragen	a) Mikropipette defekt-Funktion überprüfen und Test wiederholen	
		b) Verfahrensfehler – Test wiederholen	
	iv) Kalibrator während Lagerung teilweise verdunstet	Test mit neuem Kalibrator/Kit wiederholen	
	v) Platte unbrauchbar	a) Lagerungsschaden – Test mit neuer Platte wiederholen.	
		b) Kit abgelaufen – Test mit neuem Kit wiederholen.	
vi) Lokale Antikörperverminderung wegen zu hoher Antigenkonzentration in der Probe	Entsprechende Proben verdünnen und auf neuer Platte testen.		
vii) Inkubationstemperatur zu hoch (siehe Abschnitt 8.6)	Test wiederholen: Inkubation bei 20 – 24°C.		
2. Patientenseren (oberhalb des Wertebereichs : siehe Abschnitt 10.1)	i) Proteinkonzentration zu hoch	Höhere Probenverdünnung – Test wiederholen	
	ii) Falsches Volumen aufgetragen	Kontrollieren, dass 5µL aufgetragen werden.	
<b>C Zu kleine Ringe bei:</b>			
1. Hoher Kalibrator (kleiner als 7.7mm oder 7.2mm bei IgM).	i) Ring ungenau gemessen	} Siehe B1	
	ii) Falsches Volumen aufgetragen		
	iii) Ungenaueres Volumen aufgetragen		
	iv) Kalibrator unbrauchbar	a) Falsche Lagerung; Test mit neuem Kalibrator wiederholen	
		b) Kit abgelaufen; Test mit neuem Kit wiederholen	
v) Inkubations - temperatur zu niedrig (siehe 8.6)	Test wiederholen, Inkubation bei 20-24°C.		
2. Patientenseren (unterhalb des Wertebereichs - siehe Abschnitt 10.1)	i) Konzentration zu niedrig	siehe Abschnitt 8.3.4). Test wiederholen	
	ii) Falsches Volumen aufgetragen	Kontrollieren, dass 5µL aufgetragen werden.	
<b>D. Doppel-/ Vielfachringe bei:</b>			
i) nicht spezifische Präzipitation nahe der Vertiefung (Grund: PEG im Gel)	Außeren Ring ablesen.		
	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		

Problem	Fehlerquelle	Lösung
<b>E. Ungleichmäßige Ringe:</b>	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 einer feuchten Kammer oder in Folie eingeschweißt.
	iv) Lokale Antikörperverminderung wegen zu hoher Antigenkonzentration	Die entsprechende Probe verdünnen und auf neuer Platte erneut testen.
<b>F. Trübes Gel:</b>	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).
<b>G. Brüchiges, unebenes Gel:</b>	Platte war eingefroren	Test mit neuer Platte wiederholen ; Lagertemperatur überprüfen
<b>H. Schlechte Standardkurve:</b>		
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/Verdünnungen)
	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/Verdünnungen)
	ii) Standardkurve falsch erstellt	Konstruktion der Standardkurve überprüfen.

**10.4** Die Diagnose und die Einleitung einer Therapie darf nicht ausschließlich auf der IgG-, IgA- und IgM-Bestimmung basieren. Das klinische Bild und andere Laborbefunde müssen ebenfalls berücksichtigt werden.

**10.5** Zeigt eine Patientenprobe ein ungewöhnliches Ergebnis, sollte der Test möglichst mit einer frischen Probe wiederholt werden.

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

**11 ERWARTETE WERTE**

Die folgenden Werte wurden mit diesem Kit erhalten:

		Mittlere Konzentration. (g/L)	Normalbereich (g/L)	Anzahl d. Proben
IgG	Männer	9.96	5.66 - 14.25	62
	Frauen	9.47	6.29 - 12.65	62
IgA	Männer	2.05	0.45 - 3.64	63
	Frauen	1.70	0.49 - 2.91	60
IgM	Männer	1.06	0.03 - 2.09	64
	Frauen	1.11	0.35 - 1.89	60

Die oben aufgeführten Normalbereiche errechnen sich aus der Mittleren Konzentration ± 2 Standardabweichungen. Diese Werte wurden mit Hilfe eines normalen, britischen Blutspenderkollektivs ermittelt und dienen nur zur Orientierung. Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor eigene Immunglobulin-Konzentrationsbereiche für die verschiedenen assoziierten Erkrankungen erstellen sollte.

Die Immunglobulin-Serumkonzentrationen sind altersabhängig – die unten aufgeführten Daten wurden mit einer anderen radialen Immundiffusionsmethode erhalten (Ref. 8).

**Serum Konzentrationen für IgG, IgA und IgM in verschiedenen Altersklassen**

ALTER	IgG		IgA		IgM	
	Mittelwert	Bereich	Mittelwert	Bereich	Mittelwert	Bereich
Nabelschnurblut	10.93	7.45 - 16.02	0.01	0.00 - 0.08	0.11	0.04 - 0.26
1/2 - 3 Monate	4.86	2.93 - 8.06	0.13	0.03 - 0.57	0.51	0.16 - 1.64
3 - 6 Monate	3.60	1.39 - 9.34	0.18	0.04 - 0.78	0.49	0.20 - 1.20
6 - 12 Monate	6.66	4.10 - 10.81	0.32	0.13 - 0.82	1.04	0.48 - 2.29
1 - 2 Jahre	6.30	3.49 - 11.39	0.36	0.13 - 1.02	1.03	0.40 - 2.29
2 - 3 Jahre	7.61	4.82 - 12.00	0.51	0.22 - 1.18	1.06	0.54 - 2.09
3 - 6 Jahre	8.50	5.53 - 13.07	0.77	0.33 - 1.80	1.11	0.56 - 2.18
6 - 9 Jahre	9.68	6.46 - 14.51	1.01	0.28 - 2.22	1.13	0.55 - 2.32
9 - 12 Jahre	9.62	6.13 - 15.12	1.21	0.57 - 2.56	1.41	0.70 - 2.84
12 - 16 Jahre	9.89	6.67 - 14.84	1.28	0.77 - 2.19	1.13	0.49 - 2.61
Erwachsene	10.99	6.58 - 18.37	1.61	0.71 - 3.60	1.33	0.40 - 2.63

Konzentrationen von mehr als 100g/L können im Serum von Myelom-Patienten auftreten.

## 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 IgG, IgA und IgM 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 48 Stunden (72 Stunden bei IgM), für Methode 3 nach 18 Stunden gemessen.

Proben Pool	Methode 1 RID-Referenz- tabelle) g/L		Methode 2 (Standardkurve) g/L		Methode 3 (zeitlich begrenzte Diffusion) 18 h g/L		
	Mittel- wert	%VK	Mittel- wert	%VK	Mittel- wert	%VK	
IgG	Hoch	21.7	2.3%	20.9	2.2%	20.1	3.7%
	Mittel	13.5	2.0%	12.5	1.5%	13.5	1.8%
	Niedrig	5.0	3.9%	4.1	4.0%	4.3	9.7%
IgA	Hoch	4.84	3.0%	4.9	2.9%	4.56	4.7%
	Mittel	2.99	1.9%	2.95	1.6%	3.05	1.9%
	Niedrig	1.16	3.9%	1.00	6.6%	1.00	6.6%
IgM	Hoch	2.45	1.9%	2.46	1.7%	2.48	6.9%
	Mittel	1.52	2.7%	1.51	2.3%	1.57	1.3%
	Niedrig	0.53	9.9%	0.54	2.5%	0.55	5.0%

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

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

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

	Intra-Assay-Variation	Inter-Chargen- Variation
	Mittlerer %VK ± SD (N=3)	%VK (N=3)
IgG	0.72 ± 0.27	0.12
IgA	0.83 ± 0.56	1.07
IgM	0.72 ± 0.23	1.12

## 13 REFERENZEN

- Hamilton, R H (1987), Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. Clin. Chem. **33**, 1707 - 1725.
- Schur, P H (1987), IgG subclasses - a review. Annals of Allergy, **58**, 89-99.
- Vlug, A & Van Remortel, P (1989). The structure and function of human IgG subclasses. Eur. Clin. Lab. **8**(5), 26-35.
- Zilva, J F & Pannall, P R (1984). Clinical chemistry in diagnosis and treatment. Publ. Lloyd-Luke (Medical Books) Ltd., London. pp 348-352.
- 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. (1963). Peters H. (ed), Amsterdam, Elsevier Publishing Co., p370-373. Protides of the biological fluids. XI Colloquium.
- Mancini, G, Carbonara, A O et al. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochem. **2**, 235-254.
- Lentner, C (ed.) (1984) Geigy Scientific Tables, 8<sup>th</sup> edition, vol 3. Publ. Ciba-Geigy Ltd., Basle, Switzerland. Table 36, p154.

## 14 KURZARBEITSANLEITUNG

- Auswahl zwischen Methode 1, 2 oder 3. Methode 3 wird angewendet, wenn die Ergebnisse schnell benötigt werden.
- Nur für Kombi-Kit:** Bei Arbeiten mit Methode 2 oder 3 Kalibratorverdünnungen herstellen.
- Bei Proben mit hoher Immunglobulin-Konzentration Verdünnung herstellen.
- Eventuell vorhandenes Kondenswasser verdunsten lassen (Platte 5 – 15 Minuten offen bei Raumtemperatur stehen lassen).
- Kalibrator(en), Kontrolle und Proben auftragen: je 5µL.
- Platte mit Deckel verschließen – Inkubation bei Raumtemperatur (ca. 20-24°C): mindestens 18h bei Methode 3 oder bis zum Diffusionsendpunkt (mindestens 48h bei IgG und IgA bzw. 72 Stunden bei IgM bei Methode 1 und 2).
- Messen der Ringdurchmesser.
- Ergebnisse aus der RID-Referenztable ablesen (Methode 1) oder Standardkurve erstellen und aus dieser die Ergebnisse ablesen (Methode 2 und 3).

RID-Referenz-Tabelle für Immunglobulin (Human)  
Konzentration in mg/L

Ringdurch- messer (mm)	IgG	IgA	IgM
4.0	2500	605	344
4.1	2840	687	390
4.2	3190	773	440
4.3	3540	859	488
4.4	3900	945	537
4.5	4260	1030	586
4.6	4640	1120	639
4.7	5030	1220	692
4.8	5440	1320	749
4.9	5820	1410	802
5.0	6240	1510	859
5.1	6650	1610	916
5.2	7100	1720	977
5.3	7540	1830	1040
5.4	7980	1930	1100
5.5	8430	2040	1160
5.6	8900	2160	1230
5.7	9370	2270	1290
5.8	9850	2380	1360
5.9	10300	2490	1420
6.0	10800	2620	1490
6.1	11300	2740	1560
6.2	11900	2870	1630
6.3	12400	2990	1700
6.4	12900	3120	1770
6.5	13400	3250	1850
6.6	14000	3390	1920
6.7	14500	3520	2000
6.8	15100	3650	2080
6.9	15700	3800	2160
7.0	16200	3930	2230
7.1	16800	4070	2310
7.2	17400	4220	2400
7.3	18000	4370	2480
7.4	18600	4510	2560
7.5	19200	4660	2650
7.6	19900	4820	2740
7.7	20500	4970	2830
7.8	21200	5130	2910
7.9	21800	5290	3000
8.0	22500	5450	3100
8.1	23200	5610	3190
8.2	23800	5770	3280
8.3	24500	5940	3370
8.4	25200	6110	3470
8.5	25900	6280	3570
8.6	26600	6450	3670
8.7	27300	6620	3770
8.8	28100	6800	3870
8.9	28800	6980	3970
9.0	29600	7160	4070
9.1	30300	7350	4180
9.2	31100	7530	4280
9.3	31900	7720	4390
9.4	32600	7910	4490
9.5	33400	8090	4600
9.6	34200	8290	4710
9.7	35000	8480	4820
9.8	35800	8680	4930
9.9	36700	8880	5050
10.0	37500	9080	5160

**Hinweis:** Die in der Tabelle angegebenen Werte gehen davon aus, dass die Proben unverdünnt und mit einem Volumen von 5 µL aufgetragen wurden. Der hohe Kalibrator sollte einen Ringdurchmesser von 8.0 ± 0.3mm bzw. 7.5 ± 0.3mm bei IgM am Diffusionsendpunkt und einer Inkubationstemperatur von 20-24°C aufweisen.

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

## KITS BINDARID™ 'NL' DE DOSAGE DES IgG, IgA et IgM EN IMMUNODIFFUSION RADIALE

Pour usage diagnostique *in-vitro* uniquement

**Code Produit: RN004, RN010, RN012 &  
RK002**

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

Produit fabriqué en Angleterre par la société :  
The Binding Site Ltd, PO Box 11712, Birmingham, B14 4ZB,  
United Kingdom. [www.bindingsite.co.uk](http://www.bindingsite.co.uk)

Distribués en France par la société :  
The Binding Site, 14 rue des Glairaux, BP226, 38522 Saint-Egrève Cedex.  
Téléphone : 04.38.02.19.19  
Fax : 04.38.02.19.20  
e-mail : [Binding.Site@wanadoo.fr](mailto:Binding.Site@wanadoo.fr)



### 1 UTILISATION

Ces kits sont utilisés pour quantifier les IgG, IgA ou IgM humaines dans le sérum et les autres fluides biologiques.

### 2 PRESENTATION GENERALE

#### Immunoglobuline G

Chez les adultes sains, l'IgG représente approximativement 75% des immunoglobulines totales du sérum. Elle a un poids moléculaire de 150 kDa et elle est composée de 2 chaînes lourdes gamma et de 2 chaînes légères. La majorité des IgG est synthétisée dans les cellules plasmiques et leur capacité à traverser le placenta leur donne un rôle crucial de protection dans les premières semaines de la vie quand le système immunitaire néonatal n'est pas encore complètement développé. Les IgG sont divisées en 4 sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 qui montrent des différences considérables dans leurs propriétés, incluant la capacité à fixer le complément, à se lier aux macrophages, à traverser le placenta (réfs. 1,2,3). Les niveaux normaux d'IgG varient en fonction de l'âge (cf. paragraphe 11) et aussi avec la race. Des niveaux élevés en IgG sont associés à des maladies hépatiques chroniques et à des myélomes. Des niveaux réduits peuvent être associés à des malignités et d'autres conditions graves de perte de protéines (réf. 4).

#### Immunoglobuline A

L'IgA est la classe principale d'immunoglobuline des sécrétions séro-muqueuses qui fait partie du système de défense des surfaces extracorporelles. La forme monomérique est composée de 2 chaînes lourdes alpha et de 2 chaînes légères, mais la forme dimérique (IgA sécrétoire) est également présente dans les sécrétions et le colostrum. L'IgA sécrétoire comprend un composant sécrétoire et une chaîne J liant 2 molécules d'IgA. Deux sous-classes d'IgA ont été identifiées chez l'homme ; l'IgA1 qui représente 80 à 90% des IgA sériques totales et l'IgA2 qui représente 30 à 50% des IgA totales des sécrétions comme le lait. Les 2 sous-classes semblent être régulées indépendamment. Les niveaux normaux d'IgA varient avec l'âge (cf. paragraphe 11). Des niveaux élevés en IgA sont associés à des infections chroniques, des maladies du foie et des myélomes. Des niveaux réduits en IgA peuvent être associés à certaines conditions de perte de protéines (réf. 4).

#### Immunoglobuline M

L'IgM est la première classe synthétisée en réponse à des antigènes particuliers. Chaque unité est constituée de 2 chaînes lourdes mu et de 2 chaînes légères ; 5 unités liées ensemble avec une chaîne J composent une molécule d'IgM. L'IgM est par conséquent polyvalente et réagit plus efficacement avec les antigènes polyvalents comme les bactéries et les virus ; elle active aussi le complément. Lors d'une immunisation active, l'IgM apparaît rapidement dans le sérum mais son taux chute normalement après une semaine, parallèlement avec une augmentation des IgG. Les niveaux sériques normaux en IgM sont dépendants de l'âge. Des niveaux élevés en IgM sont associés à des hépatites, des myélomes, des macroglobulinémies de Waldenstrom et d'autres infections. Des niveaux réduits peuvent apparaître dans les syndromes d'immunodéficience (réf. 4).

L'immunodiffusion radiale (IDR) est une technique largement utilisée pour la quantification d'antigènes solubles (habituellement des protéines) dans les liquides biologiques. Elle fait référence aux travaux de Fahey & Mc Kelvey (réf. 5) et de Mancini et al. (réfs 6. et 7).

### 3 PRINCIPE DU TEST

Le principe repose sur la diffusion radiale d'un antigène à partir d'un puits cylindrique creusé dans un gel d'agarose contenant un anticorps monospécifique. La formation des complexes antigène-anticorps donnera lieu à un anneau de précipitation tout autour du puits. La taille du cercle augmentera jusqu'à la zone d'équivalence. Au point final de diffusion, il existe une relation linéaire entre le carré du diamètre de l'anneau de précipitation 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 précipitation de l'échantillon.

Trois procédures de mesure différentes peuvent être utilisées avec les réactifs The Binding Site (voir paragraphe 8.4). Pour la procédure 1 et 2, la mesure des anneaux de précipitation 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 les réactifs. Cette Table de Référence est établie à partir d'une droite de calibration idéale.

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

4.1 **Plaques IDR** (fournies dans un emballage individuel). Elles contiennent un anticorps monospécifique dirigé contre l'IgG, l'IgA ou l'IgM inclus dans un gel d'agarose. 14 échantillons (calibrateurs inclus) peuvent être mesurés sur chaque plaque. Conservateurs : azide de sodium 0,099%, Thimerosal (éthylmercurithiosalicyle de sodium) 0,01%, Acide E amino caproïque (EACA) 0,1%, benzamidine 0,01%.

4.2 **Calibrateur(s)**. Ils sont fournis sous forme liquide stable avec 3 concentrations en immunoglobulines : basse, moyenne, élevée (**Note**: le combi kit contient seulement un calibrateur pour chaque immunoglobuline : IgG, IgA et IgM). Les concentrations indiquées sur l'étiquette des flacons ont été obtenues en comparaison avec la référence internationale CRM470. Conservateurs: azide de sodium 0,099%, EACA 0,1%, benzamidine 0,01%.

4.3 **Solution de sérum albumine bovine (BSA) 7%** Elle est fournie sous forme liquide stable pour être utilisée comme diluant. Conservateurs: azide de sodium 0,099%, EACA 0,1%, benzamidine 0,01%.

4.4 **Sérum de contrôle**. Il est fourni sous forme liquide stable. Les concentrations attendues en IgG, IgA et IgM sont indiquées sur l'étiquette du flacon. Conservateurs: azide de sodium 0,099%, EACA 0,1%, benzamidine 0,01%.

## 5 PRECAUTIONS

Tous les sérums humains issus de donneurs fournis dans ces kits ont été testés et trouvés négatifs pour les antigènes Hbs et les anticorps anti-HIV 1 et HIV2 et HCV. Cependant, ces tests ne peuvent pas garantir l'absence d'agents infectieux. C'est pourquoi il est nécessaire de prendre les précautions liées à la manipulation des sérums humains.

Les plaques, les calibrateurs, les contrôles et la BSA contiennent 0,099% d'azide de sodium et les plaques contiennent aussi 0,01% de thimerosal comme conservateur. Ces réactifs doivent être manipulés avec précaution : ne pas ingérer, ni mettre en contact avec la peau ou 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 les récipients afin d'éviter la formation des azides de métaux.

Il est recommandé de suivre scrupuleusement le protocole. Des résultats obtenus en utilisant d'autres méthodes ne peuvent pas être garantis.

Des réactifs de différents numéros de lot de kits ne sont pas interchangeables. Si un grand nombre de tests doit être réalisé, s'assurer que tous les réactifs proviennent d'un même lot.

## 6 STOCKAGE ET STABILITE

Les kits non ouverts doivent être stockés à 2-8°C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit. NE PAS CONGELER. Les dates de péremption des composants individuels sont indiquées sur les étiquettes des composants. Les plaques IDR doivent être stockées à 2-8°C et sont endommagées par des températures extrêmes. La congélation endommage le gel c'est pourquoi les plaques doivent être conservées loin des éléments réfrigérants des réfrigérateurs. Des températures élevées doivent être évitées car elles induisent un dessèchement du gel ce qui affecte les performances. Les plaques non ouvertes doivent être stockées à plat et à l'envers (étiquette de l'emballage dessus) afin d'éviter que la condensation ne s'accumule dans les puits. Manipuler les plaques avec précaution pour ne pas endommager le gel.

Les calibrateurs et les contrôles non ouverts doivent être stockés à 2-8°C. Une fois ouverts, ils ne sont stables qu'une semaine à 2-8°C. Pour un stockage plus long, ils doivent être aliquotés et congelés. Tous les autres réactifs doivent être stockés à 2-8°C.

## 7 COLLECTE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des sérums frais ou congelés. Les sérums contaminés par des bactéries, hémolysés, 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 et séparer le sérum dès que possible afin d'éviter l'hémolyse. Le sérum peut être stocké à 2-8°C pendant 48 heures avant le test ou pour un stockage plus long aliquoté et congelé à -20°C ou à une température inférieure. Les congélations et décongélations répétées doivent être évitées.

La BSA incluse dans le kit doit être utilisée comme diluant si nécessaire afin de maintenir la viscosité de l'échantillon. Les résultats peuvent ainsi être comparés de façon fiable aux calibrateurs qui ont une viscosité similaire au sérum normal.

## 8 METHODOLOGIE

(Un résumé de la procédure est donné à la fin de la présente fiche technique)

### 8.1 Matériel fourni:

Kits individuels: (Codes: RN004.3, RN010.3, RN012.3)

- 3 Human IgG/A/M NL Bindarid (plaques d'immunodiffusion radiale dans leur emballage)
- 8 Gel Dividers (séparateurs de gel, pour sectionner le gel)
- 3 Human IgG/A/M NL Calibrator (calibrateurs liquides)
- 1 flacon de 5mL 7% BSA Solution (BSA 7% )
- 1 flacon Human IgG, A and M NL Control Serum (sérum de contrôle)

- 1 fiche technique comprenant une table de référence IDR

### Combi kit Immunoglobulines humaines (RK002)

- 3 Human IgG/A/M NL Bindarid (plaques d'immunodiffusion radiale dans leur emballage)
- 8 Gel Dividers (séparateurs de gel, pour sectionner le gel)
- 3 Human IgG/A/M NL Calibrator (calibrateurs liquides, 1 pour chaque classe)
- 1 flacon de 5mL 7% BSA Solution (BSA 7% )
- 1 flacon Human IgG, A and M NL Control Serum (sérum de contrôle)
- 1 fiche technique comprenant une table de référence IDR

### 8.2 Matériel nécessaire et non fourni:

- 8.2.1 Matériel de prélèvement et de préparation des échantillons (tubes, centrifugeuse ...).
- 8.2.2 Pipettes pour la dilution précise des échantillons (si nécessaire).
- 8.2.3 Micropipettes de précision de 5 µl pour le dépôt des échantillons. Les micropipettes The Binding Site (code AD041) ou les seringues «Hamilton» sont recommandées.
- 8.2.4 Loupe de bijoutier (code AD040) ou lecteur de plaques.
- 8.2.5 Papier graphique.

### 8.3 Préparation des réactifs

#### 8.3.1 Plaques IDR

Afin d'éviter la contamination du gel, les plaques doivent être utilisées dans un environnement sans poussière. Retirer la plaque de son emballage et enlever le couvercle. Si des gouttelettes de condensation sont visibles sur le couvercle, maintenir la plaque à l'envers jusqu'à l'ouverture de manière à éviter que l'eau de condensation ne retombe dans les puits. Vérifier la plaque afin de s'assurer qu'aucun dommage n'ait eu lieu dans le stockage ou le transit, comme des fentes dans le gel par exemple. Laisser la plaque ouverte pendant 10 à 15 minutes (ou plus longtemps si nécessaire) à température ambiante pour permettre à la condensation présente dans les puits ou sur le gel de s'évaporer. Les échantillons ne doivent jamais être déposés dans les puits si de l'eau est encore présente.

**Partition de la plaque:** Les plaques peuvent être coupées en plus de 4 sections à l'aide des séparateurs de gel avant utilisation. Chaque séparateur doit être positionné correctement sur le gel, les bords coupants vers le bas, avec le bras stabilisant sur l'étiquette centrale de la plaque. Presser fortement sur le bras pour couper le gel et laisser en position.

Le découpage de la plaque est recommandé si seule une partie de la plaque est utilisée initialement ou si des échantillons contenant des concentrations élevées en immunoglobulines sont mesurées (en diffusant sur une large surface) ce qui induirait une déplétion en anticorps sur la plaque. Après une première utilisation, les plaques découpées doivent être replacées dans leur emballage et stockées à 2-8°C avec les séparateurs en place dans le gel. Stocker les plaques découpées à l'endroit et les utiliser dans les quatre semaines suivantes.

#### 8.3.2 Calibrateur(s)

Les calibrateurs pré-dilués seront homogénéisés avant utilisation. Ils doivent être déposés sans dilution. Les calibrateurs moyens et bas doivent être utilisés si une courbe de calibration est nécessaire (procédures 2 et 3). Avec le combi kit, seul un calibrateur haut est fourni pour chaque classe d'immunoglobuline. Les dilutions de ce calibrateur doivent être faites avec la BSA 7% fournie si les procédures 2 et 3 sont suivies.

Ces dilutions doivent être normalement une dilution moyenne (60%, soit 6 volumes dans 10) et une dilution basse (10%, soit 1 volume dans 10). Il est recommandé que 120 µl de calibrateur soit mélangé avec 80 µl de BSA 7% pour la dilution à 60% et que 25 µl de calibrateur soit mélangé à 225 µl de BSA 7% pour la dilution à 10%.

#### 8.3.3 Contrôle(s)

Le sérum de contrôle liquide doit être déposé pur, le mélanger doucement avant utilisation.

#### 8.3.4 Echantillons

Les échantillons ne requièrent pas de dilution. Cependant, des sérums de patients atteints de myélomes peuvent avoir des taux élevés en immunoglobulines, une dilution de l'échantillon est alors nécessaire. Dans de tels cas, il est suggéré que pour obtenir une précision adéquate, un volume minimum de 25 µl d'échantillon soit mélangé au volume approprié de BSA. Pour les échantillons connus ou suspectés d'avoir une concentration en immunoglobulines inférieure à la limite de détection des plaques,

- il est conseillé de concentrer l'échantillon
- faire un double dépôt (cf. paragraphe 8.5)
- utiliser un kit avec un domaine de mesure plus bas (cf. catalogue)

### 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 avec les réactifs. Les diamètres des anneaux seront mesurés au point final de diffusion : 48 heures (72 heures pour les IgM). Le calibrateur haut non dilué sera déposé sur chaque plaque pour vérifier la validité de la manipulation.

#### 8.4.2 Procédure 2 : Courbe de calibration au point final de diffusion.

Pour cette méthode, l'utilisation des calibrateurs (ou des dilutions du calibrateur haut) permettra d'établir une courbe de calibration linéaire.

Les diamètres seront mesurés au point final de diffusion : 48 heures (72 heures pour les IgM). Une seule courbe de calibration est suffisante pour un même lot de plaques, mais il est nécessaire, dans ce cas là, de déposer le calibrateur haut non dilué sur chaque plaque utilisée.

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

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

### 8.5 Dépôt des calibrateurs et des échantillons

Les calibrateurs, le contrôle et les échantillons seront homogénéisés juste avant utilisation. Déposer dans le nombre de puits requis, 5 µl de calibrateur pur en utilisant une micropipette. Si les procédures 2 ou 3 sont suivies, déposer également les dilutions du calibrateur. Déposer ensuite 5 µl d'échantillons et de contrôle dilués de façon appropriée. Durant les dépôts, ne pas laisser la plaque exposée à l'air libre pendant un temps trop long, de manière à éviter un dessèchement excessif du gel.

**Note :** Pour les échantillons ayant des concentrations faibles en protéine spécifique, un double dépôt peut être fait : déposer 5 µl d'échantillon, laisser diffuser complètement dans le gel (au moins 30 minutes) avec le couvercle fermé, déposer à nouveau 5 µl dans le puits et incubé normalement. Les résultats obtenus doivent tenir compte du double dépôt mais sont cependant moins précis que ceux obtenus lors d'un simple dépôt.

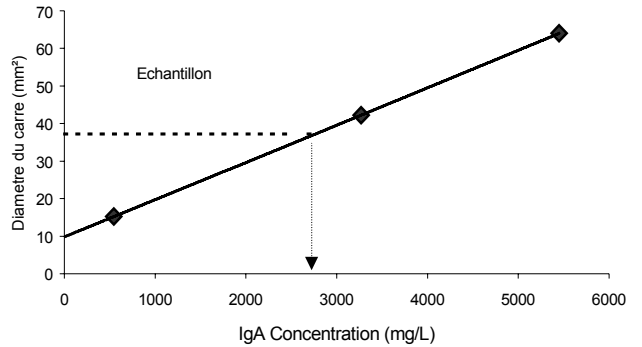
### 8.6 Incubation

Après les dépôts, la plaque est hermétiquement fermée et maintenue à plat à température ambiante (approximativement 20-24°C). Pour diminuer les phénomènes d'évaporation, il est recommandé de replacer la plaque dans son emballage aluminium ou de l'incuber dans une chambre humide. 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 48 heures (72 h pour les IgM). Les diamètres des anneaux de diffusion sont dépendants de la température. La température idéale d'incubation se situe entre 20 et 24°C. La taille de l'anneau pour le calibrateur haut doit être de 8 mm +/- 0,3 mm (7,5 mm +/- 0,3 mm pour les IgM) à 20-24°C. Les températures extrême doivent être évitées.

### 8.7 Contrôle de qualité

Le 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.

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



Un échantillon inconnu déposé pur comme recommandé a donné un anneau de diamètre 6,1 mm sur cette plaque. D'après la courbe ci-dessus, cela correspond à une concentration en IgA de 2680 mg/l.

### Procédure 3

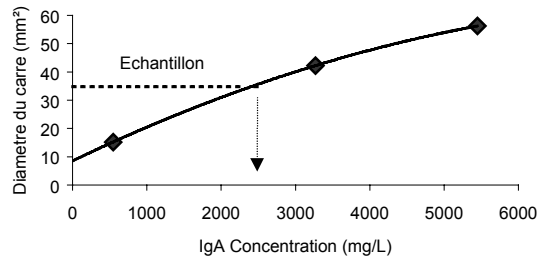
Tracer la courbe de calibration comme dans la procédure 2. La courbe de calibration obtenue ne sera pas linéaire, la pente de la droite diminuant tandis que la concentration augmente. L'intersection avec l'axe des Y obéit aux mêmes règles que pour la procédure 2. Les concentrations pour les échantillons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

### Exemple de calcul :

Les calibrateurs IgA ont donné, après 18 heures, les diamètres des anneaux suivants :

Calibrateur	Concentration (mg/L)	Diamètre de l'anneau (mm)	Diamètre au carré (mm²)
Haut	5450	7.5	56.3
Moyen	3270	6.5	42.3
Bas	545	3.9	15.2

Une courbe de calibration a été tracée à partir de ces résultats :



Un échantillon inconnu, déposé pur comme recommandé, a donné un anneau d'un diamètre de 5,9 mm, ce qui correspond à une concentration en IgA de 2450 mg/l.

## 9 MESURE DES ANNEAUX ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Après le temps d'incubation nécessaire, mesurer les diamètres des anneaux de diffusion à l'aide d'une loupe de bijoutier ou d'un lecteur électronique. La lecture à l'aide de la loupe de bijoutier se fait sur un fond noir, en utilisant un éclairage latéral. Les bords des anneaux pourront être repérés macroscopiquement sur le fond de la plaque à l'aide d'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 mm +/- 0,3 mm (7,5 mm +/- 0,3 mm pour les IgM) au point final de diffusion. Si le diamètre n'est pas dans cette limite, cf paragraphe 10.3 sur les problèmes possibles.

### Procédure 1

La concentration en immunoglobulines des échantillons est lue directement sur la table de référence, à condition que les échantillons soient déposés purs.

Les échantillons dont le diamètre de diffusion est supérieur à celui du calibrateur haut 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 affectera 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 paragraphe 8.3.4). Il faudra tenir compte de la dilution de l'échantillon dans la lecture de la concentration.

### Exemple

Echantillons	Dilution	Diamètre de l'anneau (mm)	Valeur de la table (mg/l)	Concentration réelle de l'échantillon (mg/L)
IgA Serum A	pur	6.4	3120	3120
IgA Serum B	pur	>10.0	>9080	>9080
IgA Serum B	1/2	7.8	5130	10260*

\* Calculée de la façon suivante : valeur de la table x dilution recommandée/dilution actuelle soit 5130mg/L x (1)/(1/2).

### Procédure 2

Tracer la meilleure droite de calibration à l'aide du calibrateur et de ses deux dilutions. Pour ce faire, reporter sur l'axe des X les concentrations en immunoglobulines figurant sur l'étiquette des flacons des calibrateurs et les concentrations des deux dilutions du calibrateur et sur l'axe des Y les diamètres au carré des anneaux de diffusion. L'ordonnée à l'origine de la droite tient compte du diamètre du puits et du volume d'échantillon; elle doit être comprise entre 10 et 12 mm². La concentration en immunoglobulines est lue à partir de la courbe de calibration. Ne pas oublier de tenir compte des facteurs de dilution des échantillons.

### Exemple de calcul :

Les calibrateurs IgA ont donné les diamètres des anneaux suivants au point final de diffusion :

Calibrateur	Concentration (mg/L)	Diamètre de l'anneau (mm)	Diamètre au carré (mm²)
Haut	5450	8.0	64.0
Moyen	3270	6.5	42.3
Bas	545	3.9	15.2

## 10 LIMITES DE LA PROCEDURE

**10.1** Il est préférable de redoser en les diluant les échantillons dont le diamètre est supérieur à celui du calibrateur haut (8 mm ou 7,5 mm pour les IgM) lorsque la procédure 1 est utilisée (cf paragraphe 9).

Pour les procédures 2 et 3, les extrapolations en dehors de la courbe de calibration obtenue ne sont pas exactes. Il faudra redoser les échantillons après dilution ou concentration ou alors utiliser des réactifs avec des domaines de mesure adaptés (cf paragraphe 8.3.4)

**10.2** Information FDA (USA) – cf 1ere page

**10.3** PROBLÈMES POSSIBLES

Problème	Causes probables	Solutions envisagées
<b>A. Pas de diffusion:</b>		
1. Calibrateur	Calibrateur non déposé.	Répéter le test.
2. Echantillon	i) Echantillon non déposé.	Répéter le test.
	ii) Concentration trop haute ou trop basse.	Diluer ou concentrer et répéter le test.
3. Calibrateur et échantillon	Plaque détériorée.	a) Mauvaises conditions de conservation. Répéter le test avec nouvelle plaque.
		b) Vérifier la date de péremption. Répéter le test avec nouvelle plaque/kit.

Problème	Causes probables	Solutions envisagées
<b>B. Anneaux de diffusion trop larges :</b>		
1. Calibrateur haut non dilué (Diamètre supérieur à 8,3 mm ou 7,8mm pour IgM)	i) Mesure inexacte.	Mesure à l'aide d'une loupe ou d'un lecteur électronique.
	ii) Volume de dépôt incorrect.	Vérifier le volume de dépôt (5µl)
	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) Evaporation partielle du calibrateur reconstitué lors du stockage	Répéter le test en utilisant un nouveau calibrateur/kit.
	v) Détérioration de la plaque.	a) Mauvais stockage. Répéter le test en utilisant une nouvelle plaque.
		b) Produit périmé. Répéter le test en utilisant un nouveau kit.
vi) Déplétion locale en anticorps due à un échantillon voisin trop concentré.	Diluer les échantillons responsables. Refaire les tests en utilisant de nouvelles plaques.	
vii) Température d'incubation trop élevée (voir section 8.6).	Répéter le test à 20-24°C.	
2. Echantillons (au-dessus du domaine de mesure acceptable (voir paragraphe 10.1))	i) Concentration trop élevée.	Diluer l'échantillon et répéter le test.
	ii) Volume déposé incorrect.	Vérifier le volume de dépôt (5µl).
<b>C. Anneaux de diffusion trop petits :</b>		
1. Calibrateur haut non dilué (diamètre inférieur à 7,7 mm ou 7,2mm pour IgM)	i) Mesure inexacte de l'anneau.	} Cf B1
	ii) Volume de dépôt incorrect.	
	iii) Volume déposé incorrect.	
	iv) Détérioration du calibrateur.	a) Vérifier les conditions de stockage. Répéter le test avec un nouveau calibrateur. b) Produit périmé. Répéter le test en utilisant un nouveau kit.
	v) Température d'incubation trop basse (cf paragraphe 8.6).	Répéter le test en incubant à 20 -24°C.
2. Echantillons (en-dessous du domaine de mesure acceptable - cf paragraphe 10.1).	i) Concentration trop basse.	cf paragraphe 8.3.4 et répéter le test.
	ii) Volume déposé incorrect.	Vérifier le volume déposé 5µl.
<b>D. Anneaux de diffusion doubles ou multiples :</b>		
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.
	iii) Détérioration du calibrateur.	a) Mauvais stockage. Répéter le test avec un nouveau calibrateur.
		b) Produit périmé. Répéter le test avec un nouveau kit.
	iv) Détérioration de l'échantillon.	Répéter le test en utilisant un échantillon fraîchement prélevé.
<b>E. Anneaux de diffusion non circulaires :</b>		
i) Mauvais dépôt de l'échantillon.	ii) Gel desséché avant utilisation.	Répéter le test. a) Mauvais stockage. Répéter le test avec une nouvelle plaque. b) Produit périmé. Répéter le test en utilisant une nouvelle plaque/kit.
	iii) Gel desséché durant les dépôts et l'incubation.	Refaire le test avec une nouvelle plaque en réduisant le temps d'exposition de la plaque à l'air. Incuber avec le couvercle bien fermé dans une chambre humide ou dans l'étui d'origine.
	iv) Déplétion locale en anticorps due à un échantillon voisin trop concentré.	Diluer l'échantillon en cause et répéter le test.

Problème	Causes probables	Solutions envisagées
<b>F. Gel trouble:</b>	i) Plaque congelée.	Répéter le test en utilisant une nouvelle plaque. Vérifier les conditions de stockage.
	ii) Gel desséché avant utilisation.	Cf E(ii) ci-dessus.
	iii) Gel desséché durant les dépôts et l'incubation.	Cf E(iii) ci-dessus.
<b>G. Gel piqué, pâle:</b>	Plaque congelée.	Répéter le test en utilisant une nouvelle plaque. Vérifier les conditions de stockage.
<b>H. Mauvaise courbe de calibration:</b>		
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/dilutions 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/dilutions moyen et bas).
	ii) Courbe de calibration mal construite.	Vérifier la construction de la courbe.

**10.4** Un diagnostic ne peut pas être fait et un traitement initié sur la base des dosages des IgG, IgA et IgM seuls. La clinique et d'autres tests doivent être pris en considération.

**10.5** Si un résultat inattendu est obtenu, le test doit être répété de préférence avec un nouveau prélèvement.

**Si un problème persiste, se référer au fournisseur.**

## 11 VALEURS ATTENDUES

		Conc. moyenne (g/L)	Gamme normale (g/L)	Nombre d'échantillons
IgG	Homme	9.96	5.66 - 14.25	62
	Femme	9.47	6.29 - 12.65	62
IgA	Homme	2.05	0.45 - 3.64	63
	Femme	1.70	0.49 - 2.91	60
IgM	Homme	1.06	0.03 - 2.09	64
	Femme	1.11	0.35 - 1.89	60

Les gammes normales ci-dessus sont obtenues sur la base de la concentration moyenne +/- 2 déviations standard. Les données fournies ci-dessus ont été obtenues à partir d'un nombre limité de donneurs de sang anglais et ne sont données qu'à titre indicatif. Il est fortement recommandé de générer ses propres normes en fonction de ses conditions cliniques.

Les concentrations sériques en immunoglobulines sont dépendantes de l'âge – les résultats ci-dessus ont été obtenus en immunodiffusion radiale (ref. 8)

### Concentrations sériques d'IgG, IgA et IgM à différents âges (g/L)

AGE	IgG		IgA		IgM	
	Moyenne	Gamme	Moyenne	Gamme	Moyenne	Gamme
Sang de cordon	10.93	7.45 - 16.02	0.01	0.00 - 0.08	0.11	0.04 - 0.26
1/2 - 3 Mois	4.86	2.93 - 8.06	0.13	0.03 - 0.57	0.51	0.16 - 1.64
3 - 6 Mois	3.60	1.39 - 9.34	0.18	0.04 - 0.78	0.49	0.20 - 1.20
6 - 12 Mois	6.66	4.10 - 10.81	0.32	0.13 - 0.82	1.04	0.48 - 2.29
1 - 2 ans	6.30	3.49 - 11.39	0.36	0.13 - 1.02	1.03	0.40 - 2.29
2 - 3 ans	7.61	4.82 - 12.00	0.51	0.22 - 1.18	1.06	0.54 - 2.09
3 - 6 ans	8.50	5.53 - 13.07	0.77	0.33 - 1.80	1.11	0.56 - 2.18
6 - 9 ans	9.68	6.46 - 14.51	1.01	0.28 - 2.22	1.13	0.55 - 2.32
9 - 12 ans	9.62	6.13 - 15.12	1.21	0.57 - 2.56	1.41	0.70 - 2.84
12 - 16 ans	9.89	6.67 - 14.64	1.28	0.77 - 2.19	1.13	0.49 - 2.61
Adultes	10.99	6.58 - 18.37	1.61	0.71 - 3.60	1.33	0.40 - 2.63

Des concentrations supérieures à 100g/l peuvent être trouvées dans le sérum de patients atteints de myélomes.

## 12 PERFORMANCES

### 12.1 Précision

La précision (répétabilité) du kit est exprimée en moyenne et en pourcentage du coefficient de variation (CV) qui a été déterminé en utilisant des préparations de plasma humains contenant des concentrations faibles, moyennes ou élevées en IgG, IgA et IgM. 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 diamètres des anneaux ont été mesurés après 48 heures (72 heures pour les IgM). Pour la procédure 3, les anneaux ont été mesurés après 18 heures d'incubation.

Echantillons		Procédure 1		Procédure 2		Procédure 3	
		Conc moy (g/L)	CV	Conc moy (g/L)	CV	Conc moy (g/L)	CV
IgG	Haut	21.7	2.3%	20.9	2.2%	20.1	3.7%
	Moyen	13.5	2.0%	12.5	1.5%	13.5	1.8%
	Bas	5.0	3.9%	4.1	4.0%	4.3	9.7%
IgA	Haut	4.84	3.0%	4.9	2.9%	4.56	4.7%
	Moyen	2.99	1.9%	2.95	1.6%	3.05	1.9%
	Bas	1.16	3.9%	1.00	6.6%	1.00	6.6%
Ig M	Haut	2.45	1.9%	2.46	1.7%	2.48	6.9%
	Moyen	1.52	2.7%	1.51	2.3%	1.57	1.3%
	Bas	0.53	9.9%	0.54	2.5%	0.55	5.0%

### 12.2 Variation inter-plaque et inter-lot

La variation inter-plaque est exprimée par la moyenne +/- la déviation standard du CV fait en utilisant 3 plaques de lots différents. Six mesures ont été réalisées par plaque, en utilisant un pool de sérum humain comme échantillon.

La variation inter lot est exprimée par le CV des valeurs moyennes des diamètres obtenues à partir d'un pool de sérum humain à diffusion complète en utilisant 2 plaques ou plus de chaque lot (6 mesures d'anneaux par plaque).

	Variation inter plaque	Variation inter lot
	Moyenne CV +/- SD	CV en % (n=3)
IgG	0.72 ± 0.27	0.12
IgA	0.83 ± 0.56	1.07
IgM	0.72 ± 0.23	1.12

### 13 BIBLIOGRAPHIE

- Hamilton, R H (1987), Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. Clin. Chem. **33**, 1707 - 1725.
- Schur, P H (1987), IgG subclasses - a review. Annals of Allergy, **58**, 89-99.
- Vlug, A & Van Remortel, P (1989). The structure and function of human IgG subclasses. Eur. Clin. Lab. **8**(5), 26-35.
- Zilva, J F & Pannall, P R (1984). Clinical chemistry in diagnosis and treatment. Publ. Lloyd-Luke (Medical Books) Ltd., London. pp 348-352.
- Fahey, J L & McKelvey, EM (1965). Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. J. Immunol., **94**, 84-90.
- Mancini, G, Vaerman, JP et al. (1963). Peters H. (ed), Amsterdam, Elsevier Publishing Co., p370-373. Protides of the biological fluids. XI Colloquium.
- Mancini, G, Carbonara, AO et al. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochem. **2**, 235-254.
- Lentner, C (ed.) (1984) Geigy Scientific Tables, 8<sup>th</sup> edition, vol 3. Publ. Ciba-Geigy Ltd., Basle, Switzerland. Table 36, p154.

### 14 RESUME DE LA PROCEDURE

- Choisir la procédure 1, 2 ou 3. La procédure 3 peut être utilisée si des résultats sont demandés rapidement.
- Combi Kit seulement: Préparer les dilutions des calibrateurs en utilisant la procédure 2 ou 3.
- Préparer les dilutions des échantillons : ceci est seulement requis pour des échantillons avec des concentrations connues élevées en immunoglobulines.
- Laisser l'eau de condensation s'évaporer des plaques.
- Déposer le(s) calibrateur(s), le contrôle et les échantillons en volumes de 5 µl.
- Remplacer le couvercle et incubé à température ambiante (20-24°C) pour une période fixée - minimum 18 heures (Procédure 3) ou jusqu'à ce que les anneaux soient complets (minimum 48 heures pour les IgG et les IgA; 72 heures pour les IgM).
- Mesurer le diamètre des anneaux.
- Lire les résultats à partir de la table de référence (Procédure 1) ou tracer la courbe de calibration et en déduire les résultats (Procédures 2 et 3).

Table de référence IDR  
pour les immunoglobulines humaines (mg/L)

Diamètre de l'anneau (mm)	IgG	IgA	IgM
4.0	2500	605	344
4.1	2840	687	390
4.2	3190	773	440
4.3	3540	859	488
4.4	3900	945	537
4.5	4260	1030	586
4.6	4640	1120	639
4.7	5030	1220	692
4.8	5440	1320	749
4.9	5820	1410	802
5.0	6240	1510	859
5.1	6650	1610	916
5.2	7100	1720	977
5.3	7540	1830	1040
5.4	7980	1930	1100
5.5	8430	2040	1160
5.6	8900	2160	1230
5.7	9370	2270	1290
5.8	9850	2380	1360
5.9	10300	2490	1420
6.0	10800	2620	1490
6.1	11300	2740	1560
6.2	11900	2870	1630
6.3	12400	2990	1700
6.4	12900	3120	1770
6.5	13400	3250	1850
6.6	14000	3390	1920
6.7	14500	3520	2000
6.8	15100	3650	2080
6.9	15700	3800	2160
7.0	16200	3930	2230
7.1	16800	4070	2310
7.2	17400	4220	2400
7.3	18000	4370	2480
7.4	18600	4510	2560
7.5	19200	4660	2650
7.6	19900	4820	2740
7.7	20500	4970	2830
7.8	21200	5130	2910
7.9	21800	5290	3000
8.0	22500	5450	3100
8.1	23200	5610	3190
8.2	23800	5770	3280
8.3	24500	5940	3370
8.4	25200	6110	3470
8.5	25900	6280	3570
8.6	26600	6450	3670
8.7	27300	6620	3770
8.8	28100	6800	3870
8.9	28800	6980	3970
9.0	29600	7160	4070
9.1	30300	7350	4180
9.2	31100	7530	4280
9.3	31900	7720	4390
9.4	32600	7910	4490
9.5	33400	8090	4600
9.6	34200	8290	4710
9.7	35000	8480	4820
9.8	35800	8680	4930
9.9	36700	8880	5050
10.0	37500	9080	5160

**Note:** Les valeurs ci-dessous sont valables pour des échantillons déposés purs en volumes de 5 µl. Le calibrateur haut doit donner un diamètre de l'anneau de 8 +/- 0,3 mm (IgG, IgA) ou 7,5 +/- 0,3 mm (IgM) à diffusion complète et à une température d'incubation de 20 à 24°C.