

Quantitative determination of complement C4 (C4) IVD

Store 2 - 8°C.

INTENDED USE

The C4 is a quantitative turbidimetric test for the measurement of complement C4 in human serum or plasma.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Anti-human C4 antibodies when mixed with samples containing C4, form insoluble complexes. These complexes cause an absorbance change, dependent upon the C4 concentration of the patient sample, that can be quantified by comparison from a calibrator of known C4 concentration.

CLINICAL SIGNIFICANCE¹

C4 is the second component reacting in the classical pathway cascade. Most synthesis occurs in the hepatic parenchymal cells, although some may be synthesized by monocytes or other tissues.

C4 levels in plasma rise modestly after trauma or inflammation and tissue necrosis (acute phase process).

Inherited primary deficiency of C4 is associated with a high prevalence of autoimmune or collagen vascular disease, particularly Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Also, levels of C4 are more commonly depressed because of consumption as a consequence of formed immune-complexes.

REAGENTS

Diluent (R1)	Tris buffer 20 mmol/L, PEG 8000, pH 8.3. Sodium azide 0.95 g/L.
Antibody (R2)	Goat serum, anti-human C4, pH 7.5. Sodium azide 0.95 g/L.
Optional	Cod: 1102003 PROT CAL.

CALIBRATION

The assay is calibrated to the Reference Material ERM-DA470k/IFCC. It must be used the PROT CAL to calibrate the reagent. The reagent (both monoreagent and bireagent) should be recalibrated every 2 weeks, when the controls are out of specifications, and when changing the reagent lot or the instrument settings.

PREPARATION

Reagents: Ready to use.

Calibration Curve: Prepare the following PROT CAL dilutions in NaCl 9 g/L as diluent. Multiply the concentration of the C4 calibrator by the corresponding factor stated in table below to obtain the C4 concentration of each dilution.

Calibrator dilution	1	2	3	4	5	6
Calibrator (µL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date.

Reagent deterioration: The presence of particles and turbidity. Do not use.

Do not freeze; frozen Antibody or Diluent could change the functionality of the test.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Thermostatic bath at 37°C.

- Spectrophotometer or photometer thermostatable at 37°C with a 340nm filter (320 – 360 nm).

SAMPLES

Fresh serum or plasma. EDTA or heparin should be used as anticoagulant. Stable 7 days at 2-8°C or 3 months at -20°C.

The samples with presence of fibrin should be centrifuged.

Do not use highly hemolyzed or lipemic samples.

PROCEDURE

1. Bring the reagents and the photometer (cuvette holder) to 37°C.

2. Assay conditions:

Wavelength: 340

Temperature: 37 °C

Cuvette lighth path: 1cm

3. Adjust the instrument to zero with distilled water.

4. Pipette into a cuvette:

Reagent R1	800 µL
Sample or Calibrator	20 µL

5. Mix and read the absorbance (A₁) after the sample addition.

6. Immediately, pipette into de cuvette:

Reagent R2	200 µL
------------	--------

7. Mix and read the absorbance (A₂) of calibrators and sample exactly 2 minutes after the R2 addition.

Spinreact has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

CALCULATIONS

Calculate the absorbance difference (A₂-A₁) of each point of the calibration curve and plot the values obtained against the C4 concentration of each calibrator dilution. C4 concentration in the sample is calculated by interpolation of its (A₂-A₁) in the calibration curve.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of manual and automated assay procedures. Spinreact PROT CONTROL (Cod.:1102004). Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES⁵

Neonates: Between 13 - 38 mg/dL.

Adults: Between 10 – 40 mg/dL.

Each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Measurement range: Up to 75 mg/dL, under the described assay conditions. Samples with higher concentrations, should be diluted 1/5 in NaCl 9 g/L and re-tested again. The linearity limit and measurement range depends on the sample to reagent / ratio. It will be higher by decreasing the sample volume, although the sensitivity of the test will be proportionally decreased.

2. Detection Limit: Values less than 1 mg/dL give non-reproducible results.

3. Prozone effect: No prozone effect was detected upon 500 mg/dL.

4. Sensitivity: Δ 23.6 mA. mg/dL (5 mg/dL), Δ 12.9 mA. mg/dL (37mg/dL).

5. Precision: The reagent has been tested for 20 days, using three levels of serum in a EP5-based study.

EP5	CV (%)		
	8.57 mg/dl	22.46 mg/dl	42.98 mg/dl
Total	3.9%	2.4%	1.9%
Within Run	1.6%	1%	1%
Between Run	2.2%	1.6%	1.1%
Between Day	2.8%	1.4%	1.2%

6. Accuracy: Results obtained using this reagent (y) were compared to those obtained using an immunoturbidimetric method from Bayer. 46 samples ranging from 9 to 60 mg/dL of C4 were assayed. The correlation coefficient (r) was 0.97 and the regression equation y = 1.16x - 1.9.

The results of the performance characteristics depend on the used analyzer.

INTERFERENCES

Hemoglobin (10 g/L), bilirubin (40 mg/dL) and rheumatoid factors (600 IU/mL), do not interfere. Lipemia (1.25 g/L), interferes. Other substances may interfere.⁶⁻⁷

NOTES

1. The linearity depends on the calibrator concentration.

2. Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

BIBLIOGRAPHY

1. Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.

2. Yang Y et al. Curr Dir Autoimmun 2004; 7: 98-132.

3. Borque L et al. Clin Biochem 1983; 16: 330-333.

4. Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.

5. Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34: 517-520.

6. Young DS. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

7. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PACKAGING

Ref.: 1102104

Cont.

R1. Diluent: 1 x 40 mL
R2. Antibody: 1 x 10 mL

Determinación cuantitativa del complemento C4 (C4) IVD

Conservar a 2 - 8°C.

USO RECOMENDADO

Ensayo turbidimétrico para la cuantificación del complemento C4 en suero o plasma humano.

PRINCIPIO DEL METODO

Los anticuerpos anti-C4 forman compuestos insolubles cuando se combinan con el C4 de la muestra del paciente, ocasionando un cambio de absorbancia proporcional a la concentración de C4 en la muestra, y que puede ser cuantificada por comparación con un calibrador de C4 de concentración conocida.

SIGNIFICADO CLINICO¹

El complemento C4 es el segundo componente reactivo de la vía clásica de activación del complemento. Es una proteína sintetizada por el hígado, aunque también puede ser sintetizado por los monocitos u otros tejidos.

La concentración de C4 en plasma, aumenta como consecuencia de una respuesta de fase aguda (trauma, inflamación o necrosis tisular).

Una deficiencia genética completa induce una disminución de la concentración de C4 en plasma, asociada a una elevada prevalencia de enfermedades autoinmunes o colágeno-vasculares, particularmente, el Lupus Eritematoso Sistémico (SLE). También su concentración puede disminuir como consecuencia del consumo en la formación de complejos inmuno.

REACTIVOS

Diluyente (R1)	Tampón tris 20 mmol/L, PEG 8000, pH, 8,3. Azida sódica 0,95 g/L.
Anticuerpo (R2)	Suero de cabra, anti-C4 humana, pH 7,5. Azida sódica 0,95 g/L.
Opcional:	Cod: 1102003 PROT CAL.

CALIBRACION

El ensayo está estandarizado frente al Material de Referencia ERM-DA470k/IFCC. Debe utilizarse el PROT CAL para la calibración. El reactivo (tanto monoreactivo como bireactivo) se debe recalibrar cada 2 semanas, cuando los controles están fuera de especificaciones, y cuando el lote de reactivo o la configuración del instrumento cambia.

PREPARACION

Reactivos: Listos Para el uso.

Curva de Calibración: Preparar las siguientes diluciones del PROT CAL en NaCl 9 g/L como diluyente. Para obtener las concentraciones de cada dilución de C4, multiplicar la concentración de C4 del calibrador por el factor correspondiente indicado en la tabla:

Dilución calibrador	1	2	3	4	5	6
Calibrador (µL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0.1	0,25	0,5	0,75	1,0

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, y se evita la contaminación durante su uso. No utilizar reactivos que hayan sobrepasado la fecha de caducidad.

Indicadores de deterioro: Presencia de partículas y turbidez.
No congelar; la congelación del Anticuerpo o Diluyente puede afectar la funcionalidad de los mismos.

MATERIAL ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C.
- Espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatable a 37°C para lecturas a 340 nm (320-360 nm).

MUESTRAS

Suero o plasma fresco, recogido con heparina o EDTA como anticoagulantes. Estable 7 días a 2-8°C o 3 meses a -20°C.

Las muestras con restos de fibrina deben ser centrifugadas.
No utilizar muestras altamente hemolizadas o lipémicas.

PROCEDIMIENTO

- Calentar los reactivos y el fotómetro (portacubetas) a 37°C.
- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 340 nm
 - Temperatura: 37°C
 - Paso de luz de la cubeta: 1 cm
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

Reactivo R1	800 µL
Muestra o Calibrador	20 µL

- Mezclar y leer la absorbancia (A₁) después de la adición de la muestra.
- Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:

Reactivo R2	200 µL
-------------	--------

- Mezclar y leer la absorbancia (A₂) exactamente después de 2 minutos de añadir el reactivo R2.

Spinreact dispone de adaptaciones detalladas a la mayoría de analizadores automáticos del mercado. Solicite la información a su distribuidor.

CALCULOS

Calcular la diferencia de absorbancias (A₂ - A₁) obtenidas para los distintos calibradores, y construir la curva de calibración de los valores obtenidos frente a las concentraciones de C4 de cada dilución del Calibrador. La concentración de C4 en la muestra se calcula por interpolación de su diferencia (A₂ - A₁) en la curva de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar sueros control para controlar los ensayos tanto en procedimiento manual como en automático. Spinreact dispone del PROT CONTROL cod: 1102004.

Cada laboratorio debería establecer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

VALORES DE REFERENCIA⁴

Recién nacidos: Entre 13 - 38 mg/dL.

Adultos: Entre 10 - 40 mg/dL.

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

- Rango de medida:** hasta 75 mg/dL, en las condiciones descritas del ensayo. Las muestras con valores superiores deben diluirse 1/5 con NaCl 9 g/L y ensayarse de nuevo. El intervalo de medida depende de la relación muestra/reactivo. Disminuyendo el volumen de muestra, se aumenta el límite superior del intervalo de medida, aunque se reduce la sensibilidad.
- Límite de detección:** valores por debajo de 1 mg/dL dan lugar a resultados poco reproducibles.
- Sensibilidad:** Δ 23.6 mA/mg/dL (5 mg/dL), Δ 12.9 mA / mg/dL (37 mg/dL).
- Efecto prozona:** No se observa efecto prozona hasta valores de 500 mg/dL.
- Precisión:** El reactivo ha sido probado durante 20 días con tres niveles diferentes de suero en un estudio basado en las normas EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	8.57 mg/dl	22.46 mg/dl	42.98 mg/dl
Total	3.9%	2.4%	1.9%
Within Run	1.6%	1%	1%
Between Run	2.2%	1.6%	1.1%
Between Day	2.8%	1.4%	1.2%

- Exactitud:** El comportamiento de este método (y) fue comparado con un método inmunoturbidimétrico de Bayer. 46 muestras de concentraciones de C4 entre 9 y 60 mg/dL fueron analizadas con ambos métodos.

El coeficiente de regresión (r) fue de 0,97 y la ecuación de la recta de regresión y = 1.16 x - 1.86.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Bilirrubina (40 mg/dL), hemoglobina (10 g/L) y los factores reumatoides (600 UI/mL), no interfieren. Los lípidos (1,25 g/L), interfieren. Otras sustancias pueden interferir⁵⁻⁶.

NOTAS

- El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

BIBLIOGRAFIA

- Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
- Yang Y et al. Curr Dir Autoimmun 2004; 7: 98-132.
- Borquez L et al. Clin Biochem 1983; 16: 330-333.
- Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
- Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34: 517-520.
- Young DS. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PRESENTACION

Ref.: 1102104

Cont. R1. Diluyente: 1 x 40 mL
R2. Anticuerpo: 1 x 10 mL

Détermination quantitative du complément C4 (C4) IVD

Conserver à 2 - 8°C.

USAGE RECOMMANDÉ

Essai turbidimétrique pour la quantification du complément C4 en sérum ou plasma humain.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les anticorps anti-C4 forment des composés insolubles quand ils sont associés avec le C4 de l'échantillon du patient, occasionnant un changement d'absorbance proportionnel à la concentration de C4 dans l'échantillon, et qui peut être quantifiée par comparaison avec un calibre de C4 de concentration connue.

SIGNIFICATION CLINIQUE¹

Le complément C4 est le second composant réactif de la voie classique d'activation du complément. C'est une protéine synthétisée par le foie, même si elle peut aussi être synthétisée par les monocytes ou autres tissus.

La concentration de C4 dans le plasma augmente suite à une réponse de phase aiguë (traumatisme, inflammation ou nécrose tissulaire).

Une déficience génétique complète induit une diminution de la concentration de C4 dans le plasma, associée à une prévalence élevée de maladie auto-immunes ou collagène-vasculaires, en particulier, le Lupus Érythémateux Systémique (LES). Sa concentration peut également diminuer comme conséquence de la consommation dans la formation de complexes immunes.

RÉACTIFS

Diluant (R1)	Tampon tris 20 mmol/L, PEG 8000, pH, 8,3. Azoture de sodium 0,95 g/L.
Anticorps (R2)	Sérum de chèvre, anti-C4 humain, pH 7,5. Azoture de sodium 0,95 g/L.
En option :	Cod : 1102003 PROT CAL

ÉTALONNAGE

L'essai est étalonné par rapport au matériel de référence ERM-DA470k/IFCC. Pour l'étalonnage il faut utiliser le PROT CAL. Le réactif (aussi bien monoréactif que biréactif) doit être recalibré toutes les 2 semaines, quand les contrôles sont en dehors des spécifications, et quand le lot de réactif ou la configuration de l'instrument change.

PRÉPARATION

Réactifs : Prêts à l'usage.

Courbe d'étalonnage : Préparer les dilutions suivantes du PROT CAL en ClNa 9 g/L comme diluant. Pour obtenir les concentrations de chaque dilution de C4, multiplier la concentration de C4 du calibre par le facteur correspondant indiqué dans le tableau :

Dilution calibre	1	2	3	4	5	6
Calibre (µL)	--	10	25	50	75	100
ClNa 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	-
Facteur	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0

CONSERVATION ET STABILITÉ

Tous les composants du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration quand les flacons sont gardés bien fermés à 2-8°C, et que la contamination est évitée au cours de leur utilisation. Ne pas utiliser de réactifs qui ont dépassé la date d'expiration.

Indicateurs de détérioration : Présence de particules et de turbidité.

Ne pas congeler, la congélation de l'anticorps ou du diluant peut affecter leur fonctionnalité.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

- Bain - marie à 37°C.

- Spectrophotomètre ou photomètre avec cuvette thermostable à 37°C pour des lectures à 340 nm (320-360 nm).

ÉCHANTILLONS

Sérum ou plasma frais, recueilli avec héparine ou EDTA comme anticoagulants. Stable 7 jours à 2-8°C ou 3 mois à -20°C.

Les échantillons avec des restes de fibrine doivent être centrifugés.

Ne pas utiliser d'échantillons fortement hémolysés ou lypémiques.

PROCÉDURE

1. Chauffer les réactifs et le photomètre (porte- cuvettes) à 37°C.

2. Conditions de l'essai :

Longueur d'onde : 340 nm

Température : 37°C

Passage de lumière de la cuvette: 1 cm

3. Ajuster le spectrophotomètre à zéro par rapport à l'eau distillée l'eau distillée.

4. Introduire la pipette dans une cuvette:

Réactif R1	800 µL
Échantillon ou calibre	20 µL

5. Mélanger et lire l'absorbance (A_1) après l'ajout de l'échantillon.

6. Introduire la pipette dans la cuvette tout de suite après :

Réactif R2	200 µL
------------	--------

7. Mélanger et lire l'absorbance (A_2) exactement 2 minutes après avoir ajouté le réactif R2.

Spinreact dispose d'adaptations détaillées pour la plupart des analyseurs automatiques du marché. Veuillez contacter votre distributeur pour obtenir des informations.

CALCULS

Calculer la différence d'absorbances ($A_2 - A_1$) obtenues pour les différents calibres, et construire la courbe d'étalonnage des valeurs obtenues face aux concentrations en C4 de chaque dilution du calibre. La concentration en C4 dans l'échantillon est calculée par interpolation de sa différence ($A_2 - A_1$) dans la courbe d'étalonnage.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Il est recommandé d'utiliser des sérums de contrôle, afin de contrôler les essais aussi bien lors de procédures manuelles qu'automatiques. Spinreact dispose du PROT CONTROL cod : 1102004.

Chaque laboratoire doit établir son propre Contrôle de Qualité et des corrections en cas de non-conformité des contrôles en termes de tolérances exigées.

VALEURS DE RÉFÉRENCE⁴

Nouveaux nés : Entre 13 - 38 mg/dL.

Adultes : Entre 10 - 40 mg/dL.

Chaque laboratoire devrait établir ses propres valeurs de référence.

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

1. **Limite de linéarité :** jusqu'à 75 mg/dL dans les conditions décrites de l'essai. Les échantillons avec des valeurs supérieures doivent être dilués 1/5 avec ClNa 9 g/L et testés à nouveau. L'intervalle de mesure dépend du rapport échantillon/réactif. En réduisant le volume d'échantillon, on augmente la limite supérieure de l'intervalle de mesure, même si la sensibilité est réduite.

2. **Limites de détection :** les valeurs en dessous de 1 mg/dL entraînent des résultats peu reproductibles.

3. **Sensibilité :** Δ 23,6 mA/mg/dL (5 mg/dL), Δ 12,9 mA / mg/dL (37 mg/dL),

4. **Effet prozone :** Aucun effet prozone n'a été observé jusqu'à des valeurs de 500 mg/dL.

5. **Précision :** Le réactif a été testé pendant 20 jours avec trois niveaux de sérum différents dans une étude basée sur les normes EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	8,57 mg/dL	22,46 mg/dL	42,98 mg/dL
Total	3,9%	2,4%	1,9%
Pendant l'exécution	1,6%	1%	1%
Entre l'exécution	2,2%	1,6%	1,1%
Entre jours	2,8%	1,4%	1,2%

6. **Exactitude :** Le comportement de cette méthode (y) a été comparé avec une méthode immunoturbidimétrique de Bayer. 46 échantillons de concentrations de C4 entre 9 et 60 mg/dL ont été analysés avec les deux méthodes. Le coefficient de régression (r) a été de 0,97 et l'équation de la droite de régression $y = 1,16x - 1,86$.

Les caractéristiques de la méthode peuvent varier selon l'analyseur utilisé.

INTERFÉRENCES

Bilirubine (40 mg/dL), hémoglobine (10 g/L) et facteurs rhumatoïdes (600 UI/mL), n'interfèrent pas. Les lipides (1,25 g/L) interfèrent. D'autres substances peuvent interférer⁵⁻⁶

REMARQUES

1. Le diagnostic clinique ne doit pas être réalisé uniquement avec les résultats d'un seul essai, mais doit également tenir compte des données cliniques du patient.

BIBLIOGRAPHIE

- Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
- Yang Y et al. Curr Dir Autoimmun 2004; 7: 98-132.
- Borque L et al. Clin Biochem 1983; 16: 330-333.
- Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
- Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34: 517-520.
- Young DS. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PRÉSENTATION

Réf : 1102104

Cont.

R1. Diluant : 1 x 40 mL

R2. Anticorps : 1 x 10 mL

Determinação quantitativa do complemento C4 (C4)
IVD

Conservar a 2 - 8°C.

USO RECOMENDADO

Ensaio turbidimétrico para a quantificação do complemento C4 no soro ou plasma humano.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os anticorpos anti-C4 formam compostos insolúveis quando se combinam com o C4 da amostra do paciente, provocando uma alteração da absorvância proporcional à concentração do C4 na amostra, e que pode ser quantificada por comparação com um calibrador de C4 de concentração conhecida.

SIGNIFICADO CLÍNICO¹

O complemento C4 é o segundo componente reagente da via clássica de activação do complemento. É uma proteína sintetizada pelo fígado, embora também possa ser sintetizada pelos monócitos ou outros tecidos.

A concentração de C4 no plasma, aumenta como consequência de uma resposta de fase aguda (trauma, inflamação ou necrose tissular).

Uma deficiência genética completa induz uma diminuição da concentração de C4 no plasma, associada a uma elevada prevalência de doenças autoimunes ou colagénio-vasculares, particularmente, no Lupus Eritematoso Sistémico (SLE). A sua concentração também pode diminuir como consequência do consumo na formação de complexos imunes.

REAGENTES

Sovente (R1)	Tampão tris 20 mmol/L, PEG 8000, pH, 8,3. Azida sódica 0,95 g/L.
Anticorpo (R2)	Soro de cabra, anti-C4 humana, pH 7,5. Azida sódica 0,95 g/L.
Opcional:	Cod: 1102003 PROT CAL.

CALIBRAÇÃO

O ensaio está calibrado com o Material de Referência ERM-DA470k/IFCC. Deve utilizar-se o Calibrador PROT CAL para a Calibração. O reagente (tanto monoreagente como bireagente) deve ser recalibrado em cada mês, quando os controlos estão fora das especificações, e quando o lote de reagente ou a configuração do equipamento muda.

PREPARACION
Reagentes: Prontos a utilizar.
Curva de Calibração: Preparar as seguintes diluições do PROT CAL em NaCl 9 g/L como solvente. Para obter as concentrações de cada diluição de C4, multiplicar a concentração de C4 do calibrador pelo factor correspondente indicado na tabela:

Diluição calibrador	1	2	3	4	5	6
Calibrador (µL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Todos os componentes do kit são estáveis até à data de validade indicada na embalagem quando os frascos são mantidos bem fechados a 2-8°C, e se evita a contaminação durante a utilização. Não utilizar reagentes que tenham ultrapassado o prazo.

Indicadores de deterioração: Presença de partículas e turvação

Não congelar; a congelação do Anticorpo ou Diluente pode afectar a funcionalidade dos mesmos.

MATERIAL ADICIONAL

- Banho de água a 37°C.

- Espectrofotómetro ou fotómetro com cuvette termostaticável a 37°C para leituras a 340 nm (320-360 nm).

AMOSTRAS

Soro ou plasma fresco, recolhido com heparina ou EDTA como anticoagulantes. Estável 7 dias a 2-8°C ou 3 meses a -20°C.

As amostras com restos de fibrina devem ser centrifugadas.

Não utilizar amostras altamente hemolizadas ou lipémicas.

PROCEDIMENTO

1. Aquecer os reagentes e o fotómetro (portacuvetes) a 37°C.

2. Condições do ensaio:

Longitude de comprimento de onda: 340 nm

Temperatura: 37°C

Passagem luz da cuvette: 1 cm

3. Ajustar o espectrofotómetro a zero frente a água destilada.

4. Pipetar para uma cuvette:

Reagente R1	800 µL
Amostra ou Calibrador	20 µL

 5. Agitar e ler a absorvância (A₁) depois da adição da amostra.

6. Imediatamente depois, pipetar para a cuvette:

Reagente R2	200 µL
-------------	--------

 7. Agitar e ler a absorvância (A₂) exactamente 2 minutos depois de adicionar o reagente R2.

Spinreact dispõe de adaptações detalhadas para a maioria de analisadores automáticos do mercado. Solicite a informação ao seu distribuidor.
CÁLCULOS

 Calcular a diferença de absorvâncias (A₂ - A₁) obtidas para os distintos calibradores, e construir a curva de calibração dos valores obtidos com as concentrações de C4 de cada diluição do Calibrador. A concentração de C4 na amostra calcula-se por interpolação da sua diferença (A₂ - A₁) na curva de calibração.

CONTROLO DE QUALIDADE

Recomenda-se a utilização de soros controlo para controlar os ensaios tanto no procedimento manual como no automático. Spinreact dispõe do PROT CONTROL Ref: 1102004.

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio Controlo de Qualidade e estabelecer correções no caso de os controlos não cumprirem com as tolerâncias exigidas.

VALORES DE REFERÊNCIA⁴

Recém nascidos: Entre 13 - 38 mg/dL.

Adultos: Entre 10 - 40 mg/dL.

É recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

1. Intervalo de medida: até 75 mg/dL, nas condições descritas do ensaio. As amostras com valores superiores devem diluir-se 1/5 com NaCl 9 g/L e novamente testadas. O intervalo de medida depende da relação amostra/reagente. Diminuindo o volume de amostra, aumenta-se o limite superior do intervalo de medida, embora se reduza a sensibilidade.

2. Limite de detecção: valores abaixo 1 mg/dL darão lugar a resultados pouco reprodutíveis.

3. Sensibilidade: Δ 23,6 mA/mg/dL (5 mg/dL), Δ 12,9 mA / mg/dL (37 mg/dL),

4. Efeito prozona: Não se observa efeito prozona até valores de 500 mg/dL.

5. Precisão: O reagente foi testado durante 20 dias com três níveis diferentes de soro num estudo baseado nas normas EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	8,57 mg/dL	22,46 mg/dL	42,98 mg/dL
Total	3,9%	2,4%	1,9%
Within Run	1,6%	1%	1%
Between Run	2,2%	1,6%	1,1%
Between Day	2,8%	1,4%	1,2%

 6. Exactidão: O comportamento deste método (y) foi comparado com um método imunoturbidimétrico de Bayer. 46 amostras de concentrações de C4 entre 9 e 60 mg/dL foram analisadas com ambos métodos. O coeficiente de regressão (r) foi de 0,97 e a equação da recta de regressão $y = 1,16x - 1,9$.

As características do método podem variar conforme o analisador utilizado.

INTERFERÊNCIAS

 Hemoglobina (10 g/L), Bilirrubina (40 mg/dL), e os factores reumatóides (600 UI/mL), não interferem. Os lípidos (1,25 g/L), interferem. Outras substâncias podem interferir⁵⁻⁶.

NOTAS

1. A linearidade depende da concentração do calibrador.

2. O diagnóstico clínico não deve ser feito unicamente com os resultados de um único ensaio, mas deve considerar-se ao mesmo tempo os dados clínicos do paciente.

BIBLIOGRAFIA

1. Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
2. Yang Y et al. Curr Dir Autoimmun 2004; 7: 98-132.
3. Borque L et al. Clin Biochem 1983; 16: 330-333.
4. Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
5. Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34: 517-520.
6. Young DS. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.
7. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

APRESENTAÇÃO

Ref.: 1102104

Cont.	R1. Diluente: 1 x 40 mL R2. Anticorpo: 1 x 10 mL
-------	---