

## Complemento C4 MonlabTest®



Turbidimetría

### Determinación cuantitativa del complemento C4 (C4)

Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*. Conservar a 2-8°C.

#### USO RECOMENDADO

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

#### PRINCIPIO DEL MÉTODO

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 CLÍNICO<sup>1</sup>

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

<b>Diluyente (R1)</b>	Tampón tris 20 mmol/L, PEG 8000, pH 8,3. Azida sódica 0,95 g/L.
<b>Anticuerpo (R2)</b>	Suero de cabra, anti-C4 humana, pH 7,5. Azida sódica 0,95 g/L.
<b>Opcional</b>	Multicalibrador Proteínas (MO-165044).

#### CALIBRACIÓN

El ensayo está estandarizado frente al Material de Referencia ERM-DA470k/IFCC. Debe utilizarse el Multicalibrador Proteínas MonlabTest 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.

#### PREPARACIÓN

Reactivos: Listos para el uso.

Curva de Calibración: Preparar las siguientes diluciones del Multicalibrador Proteínas MonlabTest 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

#### CONSERVACIÓN 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 su funcionalidad.

#### MATERIAL ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C.
- Espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatizable 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

1. Calentar los reactivos y el fotómetro (portacubetas) a 37°C.

2. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: ..... 340 nm

Temperatura: ..... 37°C

Paso de luz de la cubeta: ..... 1 cm

3. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

4. Pipetear en una cubeta:

Reactivo R1	800 µL
Muestra o Calibrador	20 µL

5. Mezclar y leer la absorbancia (A<sub>1</sub>) después de la adición de la muestra.

6. Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:

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

7. Mezclar y leer la absorbancia (A<sub>2</sub>) exactamente después de 2 minutos de añadir el reactivo R2.

**MONLAB dispone de adaptaciones detalladas a la mayoría de los analizadores automáticos del mercado.**

#### CÁLCULOS

Calcular la diferencia de absorbancias (A<sub>2</sub> - A<sub>1</sub>) 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 (A<sub>2</sub> - A<sub>1</sub>) en la curva de calibración.

#### CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar sueros control para controlar los ensayos tanto en procedimiento manual como en automático. MONLAB dispone del Multicontrol Proteínas MonlabTest (MO-165045).

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 REFERENCIA<sup>4</sup>

Recién nacidos: Entre 13 - 38 mg/dL.

Adultos: Entre 10 - 40 mg/dL.

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

#### CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

**1. 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.

**2. Límite de detección:** valores por debajo de 1 mg/dL dan lugar a resultados poco reproducibles.

**3. Sensibilidad:** Δ23.6 mA/mg/dL (5 mg/dL), Δ12.9 mA/mg/dL (37 mg/dL).

**4. Efecto prozona:** No se observa efecto prozona hasta valores de 500 mg/dL.

**5. 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%

**6. 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)<sup>2</sup> 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 interferir<sup>5-6</sup>.

#### NOTAS

1. 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.

#### BIBLIOGRAFÍA

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.

#### PRESENTACIÓN

MO-165043

R1: 1 x 40 mL

R2: 1 x 10 mL

#### SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD

	Fabricante		Uso de diagnóstico <i>in vitro</i>
	No reutilizar		Consultar las instrucciones de uso
	Contiene suficiente para <n> test		Mantener seco
	Código		Límite de temperatura
	Número de lote		Fecha de caducidad



## Complement C4 MonlabTest®



Turbidimetry.

### Quantitative determination of complement C4 (C4)

Only for professional *in vitro* diagnostic use. Store at 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 SIGNIFICANCE<sup>1</sup>

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

<b>Diluent (R1)</b>	Tris buffer 20 mmol/L, PEG 8000, pH 8.3. Sodium azide 0.95 g/L.
<b>Antibody (R2)</b>	Goat serum, anti-human C4, pH 7.5. Sodium azide 0.95 g/L.
<b>Optional</b>	Multicalibrator Protein (MO-165044)

#### CALIBRATION

The assay is calibrated to the Reference Material ERM-DA470k/IFCC. It must be used the Multicalibrator Protein MonlabTest 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 Multicalibrator Protein MonlabTest 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 thermostable at 37°C with a 340 nm 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

- Bring the reagents and the photometer (cuvette holder) to 37°C.
- Assay conditions:
  - Wavelength: ..... 340
  - Temperature: ..... 37 °C
  - Cuvette light path: ..... 1cm
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette:

Reagent R1	800 µL
Sample or Calibrator	20 µL

- Mix and read the absorbance (A<sub>1</sub>) after the sample addition.

- Immediately, pipette into de cuvette:

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

- Mix and read the absorbance (A<sub>2</sub>) of calibrators and sample exactly 2 minutes after the R2 addition.

**MONLAB has instruction sheets for several automatic analyzers.**

#### CALCULATIONS

Calculate the absorbance difference (A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) 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 (A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) in the calibration curve.

#### QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of manual and automated assay procedures. MONLAB provide Multicontrol Protein MonlabTest (MO-165045). Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

#### REFERENCE VALUES<sup>5</sup>

Neonates: Between 13 – 38 mg/dL.

Adults: Between 10 – 40 mg/dL.

Each laboratory should establish its own reference range.

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- 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 depend 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.
- Detection Limit:** Values less than 1 mg/dL give non-reproducible results.
- Prozone effect:** No prozone effect was detected upon 500 mg/dL.
- Sensitivity:** Δ23.6 mA. mg/dL (5 mg/dL), Δ 12.9 mA. mg/dL (37mg/dL).
- Precision:** The reagent has been tested for 20 days, using three levels of serum in an 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%

- 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)<sup>2</sup> 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.<sup>6-7</sup>

#### NOTES

- The linearity depends on the calibrator concentration.
- Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result but should integrate both clinical and laboratory data.

#### BIBLIOGRAPHY

- 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.

#### PACKAGING

MO-165043	R1: 1 x 40 mL R2: 1 x 10 mL
-----------	--------------------------------

#### SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS

	Manufacturer		For <i>in vitro</i> diagnostic use only
	Don't re-use		Consult instructions for use
	Contains sufficient for <n> tests		Keep dry
	Catalogue Code		Temperature limitation
	Lot Number		Use by

