



## TURB C4 - Complemento C4 C4

### Finalidade:

Reagente utilizado na determinação quantitativa de Complemento C4 no soro ou plasma humano por imunoturbidimetria. Somente para uso diagnóstico "in vitro".

### Princípio:

A turbidimetria baseia-se na detecção ótica de partículas muito pequenas suspensas em líquido. Quando o anticorpo específico para Complemento C4 reage com o C4 presente na amostra (antígeno) formam-se os imunocomplexos insolúveis que induzem uma turbidez, medida por espectrofotometria a 340 nm. Essa turbidez é diretamente proporcional à concentração do complemento C4 na amostra.

### Metodologia:

Imunoturbidimetria

### Significado Clínico:

O sistema complemento é um grupo de 20 proteínas distintas imunologicamente presentes no sangue e tecidos. Elas podem interagir com complexos de antígeno-anticorpo, entre si e com as membranas das células, de um modo complexo pretendendo a destruir vírus e bactérias. Elas são sintetizadas no fígado e estão presentes no soro como moléculas funcionalmente inativas, mas são ativadas através dos complexos de antígeno-anticorpo. O Complemento C4 é uma  $\alpha$ -glicoproteína de 3 subunidades. É um reagente de fase aguda cujos níveis são aumentados durante a fase aguda, baixos níveis são encontrados em doenças complexas imunes e em angioedema herdada, enquanto os níveis do complemento C4 são normais.

### Reagentes:

Reagente 1- Diluente: Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: Tampão Imidazole pH 7, PEG, cloreto de sódio, azida de sódica (<1g/l)

Reagente 2 - Anticorpo: Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: Anticorpo Complemento C4 anti-humano (título  $\pm$  4 mg/ml) em pH 7.4 Tampão de HEPES, estabilizadores e azida sódica (<1g/l)

Os reagentes estão prontos para uso e quando não abertos são estáveis até a data de vencimento impressa no rótulo do produto. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

### Precauções e Cuidados Requeridos:

Este reagente deve ser usado somente para uso diagnóstico "in vitro".

Os produtos de origem humana foram testados e estão livres de HBsAg e anticorpos para HCV e HIV, porém este material deve ser tratado cuidadosamente como potencialmente infeccioso. Não pipetar com a boca. Evitar contato com a pele e roupa. No caso de contato com os olhos, lavar com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

O reagente contém azida sódica como conservante. Este componente pode reagir com cobre e chumbo podendo tornar-se um metal explosivo. Ao descartá-lo, adicionar grande quantidade de água.

Deve-se monitorar a temperatura do ambiente de trabalho bem como o tempo de reação para obtenção de resultados corretos. Não usar se o reagente apresentar turbidez, presença de precipitado e se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco.

### Material Necessário não Fornecido:

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C.
2. Espectrofotômetro ou fotômetro capaz de medir absorbância em 340nm.
3. Pipetas de vidro e/ou automáticas.
4. Calibrador e controles Ebram.
5. Medidor de tempo.
6. Tubo de ensaio

### Amostra:

É recomendado soro livre de hemólise ou plasma (EDTA). O C4 é estável no soro por 48 horas se for refrigerado entre 2 - 8°C. Para período mais prolongado, congelar a amostra (-20°C) até no máximo 3 meses (congelar somente uma vez). Todas as amostras e controles são considerados potencialmente infectantes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

### Preparo do Paciente:

Não é necessário jejum. Todavia, poderá ser modificado seguindo orientação médica

### Interferências:

Triglicérides até 2500 mg/dL, bilirrubina até 20 mg/dL, hemoglobina

até 1000 mg/L, turbidez 5%, citrato de sódio até 1000 mg/dL não interferem significativamente no resultado. Algumas drogas e substâncias afetam a concentração do Complemento C4, sugerimos consultar Young et al.

### Parâmetros do Sistema:

Temperatura: 37°C  
Comprimento de Onda: 340 nm.  
Tipo de Reação: Ponto final  
Direção: Crescente  
Pré-diluição da amostra: 1:5  
Vol. Amostra diluída: 35 $\mu$ L  
Vol. do Diluente : 250 $\mu$ L  
Vol. do Anticorpo: 50 $\mu$ L  
Tempo de Incubação: 10min

### Calibração:

Utilizar o calibrador Turbocalib - Calibrador Turbidimétrico Ebram - Cód. 1042. A concentração do Complemento C4 no calibrador é rastreável ao material de referência CRM470 ( Preparação de referência para proteínas séricas humanas, certificada em conjunto pelo Colégio Americano de Patologistas, Communal office of Reference e Federação Internacional de Química Clínica (IFCC)

### Procedimento Automatizado:

Vide manual para utilização do equipamento, protocolo específico e instruções de uso do reagente.

Para analisadores onde não seja possível o preparo automático da curva de calibração, deve-se seguir orientação do preparo dos pontos de calibração descrito, em Preparo da Curva de Calibração para Analisadores Automáticos, no verso dessa instrução de uso.

### Procedimento Manual:

Pré-diluir as amostras e os controles, em fisiológica, na razão 1:5 (100 $\mu$ l de amostra + 400 $\mu$ l de solução fisiológica).

### PREPARO DOS PONTOS DE CALIBRAÇÃO

Identificar 6 tubos de ensaios (1 a 6).  
Adicionar ao tubo 1, 400 $\mu$ l de solução fisiológica + 100 $\mu$ l de calibrador. Homogeneizar.  
Adicionar aos tubos 2 a 6, 250 $\mu$ l de solução fisiológica.  
Transferir 250 $\mu$ l do conteúdo do tubo 1 para o tubo 2. Homogeneizar.  
Transferir 250 $\mu$ l do conteúdo do tubo 2 para o tubo 3. Homogeneizar.  
Transferir 250 $\mu$ l do conteúdo do tubo 3 para o tubo 4. Homogeneizar.  
Transferir 250 $\mu$ l do conteúdo do tubo 4 para o tubo 5. Homogeneizar.

	Tubo1	Tubo2	Tubo3	Tubo4	Tubo5	Tubo6
Fator de diluição	1.0	0.5	0.25	0.125	0.063	0

Obs: a concentração de cada ponto é obtida multiplicando-se a concentração do calibrador pelo fator de diluição

### PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Separar tubos de ensaio para cada ponto de calibração, branco, amostra / soro controle e realizar os procedimentos conforme tabela abaixo:

	Branco	Calibrador	Amostra/S.C.
Água destilada	35 $\mu$ L	-	-
Pontos de Calibração	-	35 $\mu$ L	-
Amostra/S.C. dil 1:5	-	-	35 $\mu$ L
Reagente R1	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L

Incubar todos os tubos a 37°C por 5 minutos. Realizar leitura (A1) à 340 nm zerando o aparelho com água destilada.  
Reagente R2 50 $\mu$ L 50 $\mu$ L  
Incubar todos os tubos a 37°C por 5 minutos. Realizar leitura (A2) à 340 nm zerando o aparelho com água destilada.

### Cálculos:

Abs. = Absorbância  
1.A Abs final dos pontos de calibração = (A2 - A1) dos pontos de calibração - (A2 - A1) branco do reagente  
2. Confecção da Curva de calibração  
-Em um papel milimetrado plotar as absorbâncias finais, dos pontos de calibração no eixo das ordenadas. (eixo y)  
-Plotar as concentrações de cada ponto de calibração, na ordem crescente, no eixo das abscissas. (eixo x)

3.A Abs final de amostra = (A2 - A1) amostra - (A2 - A1) branco do reagente  
-Interpoler as absorbâncias finais de cada amostra / soro controle, na curva de calibração para determinar a respectiva concentração.

### Exemplo:

1.Abs.Final do ponto de calib. = (A2 - A1)calib - (A2 - A1)branco  
Abs.Final do ponto de calib. = (0,325 - 0,095) - (0,115 - 0,050)  
Abs.Final do ponto de calib. = 0,165  
obs: realizar esse cálculo para todos os pontos da curva de calibração.  
2.Abs.Final de amostra = (A2 - A1) amostra - (A2 - A1)branco  
Abs.Final de amostra = (0,367 - 0,084) - (0,100 - 0,040)  
Abs.Final de amostra = 0,223

Utilizar a curva de calibração no papel milimetrado para obter as concentrações das amostras.

### Linearidade:

Quando executado de acordo com o recomendado o teste é linear até 400mg/dL. Valores superiores, diluir a amostra com solução salina, repetir a medição e multiplicar o resultado pela fator de diluição. A linearidade pode variar consideravelmente dependendo

do instrumento utilizado. O limite da linearidade depende da relação de amostra/reagente. Aumenta reduzindo o volume da amostra, enquanto que a sensibilidade do ensaio diminuirá proporcionalmente.

### Controle de Qualidade:

Cada laboratório deve manter um programa interno de qualidade que defina objetivos, procedimentos, normas, limites de tolerância e ações corretivas. Deve-se manter também um sistema definido para se monitorar a variação analítica do sistema de medição seguindo as Boas Práticas de Laboratório Clínico. Aconselhamos o uso do Turbcontrol - Controle Turbidimétrico Ebram - cód.1043.

### Valores Esperados:

Adultos: 12 - 36 mg/dL.  
Crianças de 1 mês a 12 meses: 7 - 40 mg/dL.  
Estes valores são dados unicamente como título orientativo. É recomendado que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

### Estudos Comparativos:

A comparação com Nefelometria nos proporcionou os seguintes resultados:  $y = 0.93418x - 0.1518$ ;  $r = 0.9940$

### Precisão:

\* Intra - Precisão analisada  
3 amostras de soro foram consecutivamente dosadas 20 vezes no Cobas Mira.

Valores Esperados	n	Média	S.D.	C.V.
Baixo	20	9.9	0.45	4.54
Médio	20	26.3	0.57	2.18
Alto	20	52.9	2.10	3.97

\* Inter-Precisão de exame  
2 soros controle foram dosados diariamente no Cobas Mira depois da calibração.

Valores Esperados	n	Média	S.D.	C.V.
Ortho	64	21.4	0.66	3.08
Ortho	64	13.5	0.56	4.17

### Exatidão:

Os controles são analisados em duplicidade no Cobas Mira.  
Controle Valores analisados Valores das Medidas (mg/dl)  
Ebram 37 (31 - 43) 38  
Liquicheck 1 16 (13 - 19) 16.7  
Liquicheck 2 52 (42 - 62) 47.7  
Serorm L 10 (8 - 12) 9.4  
Serorm N 34 (27 - 41) 31.9  
Serorm H 45 (36 - 54) 43.0

### Sensibilidade Metodológica:

0,04 mg/dL

### Especificidade:

Nos estudos comparativos realizados apresentamos dados determinados em um analisador. A comparação com soros controles já validados mostrou uma especificidade analítica adequada.

### Observações:

1. A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade  $\geq$  1 mega ohm ou condutividade  $\leq$  10 microsiemens e concentração de silicatos  $<$  0,1 mg/L (água tipo II). Para o enxágue da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade  $\geq$  0,1 megaohms ou condutividade  $\leq$  10 microsiemens. No enxágue final utilizar água tipo II.

### Apresentação:

Linha Automação: R1= 1 x 25mL + R2= 1 x 3mL - Cód.1035  
Linha Hitch-Line: R1= 1 x 90mL + R2= 1 x 12mL - Cód. 10035

Para mais informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM - tel. (011) 2291-2811, sac@ebram.com ou www.ebram.com.

### Referência Bibliográfica:

- 1.Tietz Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders, Philadelphia, (1994).
- 2.Roitt, L., Essential Immunology, Blackwell, Oxford, (1991).
- 3.Dati, F et al., Lab. Med. 13, 87 (1989)
- 4.Young, D.S. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Testes, Third Edition, AACC Press 1990.
- 5.Watchel M et al. Creation and Verification of Reference Intervals, Laboratory Medicine, 1996; 26:593-7.
6. Arquivos da Ebram.

