

Order information:

Catalog No.	Contents
H3801 Hit 1 / 917 (AU* / ILab*)	R1 2 x 18 ml R2 2 x 4 ml

(*) Kit contains only reagent barcodes for Hitachi systems.

System information:

Hitachi 911/917: ACN 032
For application on the Hitachi 912, please use an open system or contact the Analyticon Customer Support.

Intended use:

Immunoturbidimetric assay for the in vitro quantitative determination of human C4 in human serum and plasma.

Summary:

The complement system can be activated via the classical and an alternative route. Complement factor C4 participates in activation by the classical route. A decrease in C4 is common, but complete absence is rare. A lowered concentration or the complete absence of C4 occurs in immunocomplex diseases, systemic lupus erythematosus (SLE), autoimmune thyroiditis and juvenile dermatomyositis. The commencement of SLE in patients with C4-deficiencies can often be detected at a very early stage, and the course of the disease is milder than in patients with normal complement levels. Infections such as bacterial and viral meningitis, streptococcal and staphylococcal sepsis and pneumonia are associated with a decrease in C4. Additional differentiation can be obtained by the determination of C4 when the level of complement factor C3 is low. If in such cases the protein concentration of C4 is normal, then an activation of the alternative route is likely. The main use of C4 determinations is in assessing the course of hypocomplement conditions. As an acute phase protein, C4 is produced to an increased extent during inflammatory processes. It is elevated in systemic infections, non-infectious chronic inflammatory conditions (primarily chronic polyarthritis) and physiological states (pregnancy). The elevation rarely exceeds twice the normal value and can mask a reduction in the current consumption. A variety of methods, such as nephelometry, radial immunodiffusion and turbidimetry are available for the determination of complement factor C 4.

Test principle:

Immunoturbidimetric assay
• Sample and addition of R1 (buffer)
• Addition of R2 (anti-C4 antibody/buffer) and start of reaction

Anti-C 4 antibodies react with antigen in the sample to form an antigen/antibody complexes which, following agglutination, are measured turbidimetrically.

Reagent concentration:

R1:	
TRIS* buffer pH 7.8	100 mmol/l
Polyethylene glycol	4.5%
NaCl	150 mmol/l
Preservative	
R2:	
Anti-human C 4 antibody (rabbit);	dependent on titer
TRIS* buffer pH 7.8	80 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
Preservative	

*TRIS= Tris (hydroxymethyl)-aminomethane

Preparation and stability:

R1: Ready for use.
R2: Ready for use.
Unopened kit components: Up to the expiration date at +2°C to +8°C
Onboard stability at +2°C to +8°C: R1 84 days
R2 84 days

Specimen:

Collect serum using standard sampling tubes
Na heparin-, Li-heparin plasma or EDTA-Plasma
Stability: 2 days at +20°C - +25°C
2 days at +4°C - +8°C

Centrifuge samples containing precipitate before performing the assay.

Limitation interference:

Criterion: Recovery within ±10% of initial value.
Icterus: No significant interference up to a bilirubin concentration of 80 mg/dl.
Hemolysis: No significant interference up to a haemoglobin concentration of 1100mg/dl.
Lipemia (Intralipid): Elevated levels of triglycerides may interfere. There is poor correlation between turbidity and triglycerides concentration.
Rheumatoid factors up to 1200 IU/ml do not interfere.
No high-dose hook-effect is seen up to a C 4 concentration of 500 mg/dl.
Monoclonal gammopathy sera of the IgA or IgM type can interfere with the C4 determination.
The effect of drugs or their metabolic products on the test is not known in all cases. In case of doubt it is recommended to repeat the test after the medication has been

discontinued. However, the medication may only be discontinued according to instructions of the attending physician.

Notes:

For in vitro diagnostic use.
The material safety data sheet contains further safety-related information. It is available for download from our homepage <http://www.analyticon-diagnostics.com>. Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Testing procedure:

Applications for automated systems are available on request.

Materials provided

- Working solutions as described above
- Additional materials required
- Calibrators and controls as indicated below
- 0.9% NaCl

Manual procedure:		
Wavelength:	340 nm	
Temperature:	+37°C	
Cuvette:	1 cm	
Zero adjustment:	against blank	
sample/calibrator ---	Blank 12 µl	Sample/Calibrator 750 µl
R1	750 µl	750 µl
Mix, incubate 5 min. and read A ₁ . Then add:		
R2	150 µl	150 µl
Mix, incubate 5 min. and read A ₂ .		
Calculation:		
$\Delta A = [(A_2 - A_1) \text{ sample or calibrator}] - [(A_2 - A_1) \text{ blank}]$		
The concentration of C4 in patient sera has to be calculated from ΔA using mathematic function as logit/log or can be read from a graph using values of 6 levels of standards in the concentration range of 0 to 100 mg/dl C4. For zero value is recommended to use saline solution (0.9%)		

Measuring/reportable range:

1.5 - 100 mg/dl (0.015 - 1.0 g/l)*
At higher concentrations, dilute the sample with 0.9% NaCl (e.g. 1 + 1). Multiply the result by the appropriate factor (e.g. 2).

*Maximum reportable range is dependent on the highest standard concentration.

Expected values:

10 - 40 mg/dl (0.1 - 0.4 g/l)**

** Reference values according to CRM 470 Protein Standardization

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patients' population and if necessary determine its own reference range. For diagnostic purposes the C 4 results should always be assayed in conjunction with the patient's medical history, clinical examinations and other findings.

Analytical sensitivity (lower detection limit):

1.5 mg/dl (0.015 g/l)

The lower detection limit represents the lowest measurable C 4 concentration that can be distinguished from zero. It is calculated as the concentration lying three standard deviations above that of the lowest standard (zero standard + 3 SD, within run precision, n = 21).

Imprecision:

Reproducibility within run was determined using controls (n = 20). The following results were obtained:

	Within run		
	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Sample			
Sample 1	19.45	0.22	1.11
Sample 2	25.52	0.27	1.07
Sample 3	38.13	0.41	1.08

Reproducibility between day was determined using controls (n = 20). The following results were obtained:

	Between day		
	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Sample			
Human serum 1	19.8	0.44	2.22
Human serum 2	39.5	0.83	2.09
Human serum 3	59.1	1.17	1.99

Method comparison:

A comparison of the Analyticon Turbitex C4 (y) with a commercial obtainable assay (x) gave with 60 samples the following result.

$$y = 1.021 x + 1.374; r = 0.974$$

Quality control:

Protein Control Level 1	3 x 1 ml	#7661
Protein Control Level 2	3 x 1 ml	#7662

The control intervals and limits must be adapted to the individual laboratory and country-specific requirements. Values obtained should fall within established limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the limits.

Calibration:

Standardization: The C4 method was calibrated against the Reference Preparation CRM 470 (RPPHS - Reference Preparation for Proteins in Human serum).

• Roche/Hitachi 904/911/912/917

S1:	NaCl (0.9%)	
S2-S6:	Bio Cal [®] P	3 x 1 ml #1470

Multiply the lot specific calibrator value by the factors below to determine the standard concentrations for the six-point calibration curve:

S2: 0.204 S5: 1.750

S3: 0.407 S6: 2.500

S4: 1.00

• Roche/Hitachi 704/717/902

S1:	NaCl (0.9%)	
S2-S6:	Bio Cal [®] P Cal set	5 x 1 ml #1475

Calibration frequency

Full recalibration is recommended

- after 90 days
- after lot change
- as required following quality control procedures

Disposal:

Please note the legal regulations.

Literature:

1. Bablok W et al. General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin Chem Biochem 1988; 26:783-790
2. Consensus values of the Deutsche Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin, the Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie and the Verband der Diagnostica-Industrie e.V. (VDGH). Clin Lab 1995;41:743-748
3. Greiling H, Gressner AM ed.. Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3rd. Stuttgart/New York: Schattauer, 1995: 1159-62
4. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. List of Analytes Preanalytical Variables. Broschüre in: Samples: From the Patient to the Laboratory. Darmstadt: GIT-Verlag, 1996
5. Müller-Eberhard HJ. Complement: Chemistry and pathways. In: Inflammation: Basic principles and clinical correlates. Gallin I, Goldstein IM, Snyderman R ed. New York: Raven Press, 1988:21-53
6. Passing H, Bablok W. A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two different Analytical Methods. J Clin Chem Clin Biochem 1983;21: 709-720
7. Thomas L ed. Labor und Diagnose, 5th Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH 1998:812-823
8. Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd Philadelphia Pa.: WB Saunders, 1995: 164-165

Bestellinformation:

Katalog-Nr.	Inhalt
H3801	Hit I / 917 (AU* / ILab*)
	R1 2 x 18 ml R2 2 x 4 ml

(*) Kit enthält nur Reagenzien-Barcodes für Hitachi Systeme.

Systeminformation:

Hitachi 911/917: ACN 032
Für die Benutzung am Hitachi 912 verwenden Sie bitte ein offenes System oder wenden Sie sich an den Analyticon Kundensupport.

Anwendungszweck:

Immunologischer Trübungstest zur quantitativen in vitro Bestimmung von Human-C4 in Humanserum und -plasma.

Zusammenfassung:

Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt auf einem klassischen und auf einem alternativen Weg. Der Komplementfaktor C4 nimmt auf dem klassischen Weg an der Aktivierung teil. Ein Abfall von C4 ist üblich, ein vollständiges Fehlen von C4 selten. Verminderte Konzentration oder vollständiges Fehlen von C4 treten auf bei Immunkomplexkrankheiten, Systemischen Lupus Erythematoses (SLE), Autoimmun-Thyreoiditis und juveniler Dermatomyositis. Der Beginn von SLE bei Patienten mit C 4-Mangelzuständen lässt sich oft sehr früh feststellen und der Verlauf ist leichter als bei Patienten mit normalem Komplement. Infektionen wie die bakterielle und virale Meningitis, Streptokokken- und Staphylokokken-Sepsis sowie Pneumonie sind mit C4-Abfall verbunden. Zusätzlich lässt sich durch die Bestimmung von C4 bei erniedrigten Werten des Komplementfaktors C3 differenzieren. Ist die Proteinkonzentration von C4 normal, liegt mit einiger Wahrscheinlichkeit eine Aktivierung des alternativen Weges vor. Schwerpunkt der C4-Bestimmung ist die Verlaufsbeurteilung hypokomplementärer Zustände. Als Akutphasenprotein wird C4 während der Entzündung vermehrt gebildet. Es ist erhöht bei systemischen Infektionskrankheiten, nicht infektiösen chronischen Entzündungszuständen (primär chronischer Polyarthritis) und physiologischen Zuständen (Schwangerschaft). Die Erhöhung überschreitet selten den zweifachen Wert und kann eine Verringerung im Spiegel hinsichtlich des laufenden Verbrauchs maskieren. Zur Bestimmung des Komplementfaktors C4 stehen verschiedene Methoden wie die Nephelometrie, die radiale Immundiffusion und die Turbidimetrie zur Verfügung.

Testprinzip:

Immunologischer Trübungstest
• Probe und Zugabe von R1 (Puffer)
• Zugabe von R2 (Anti-C4 – Antikörper/Puffer) und Start der Reaktion

Anti-C 4-Antikörper reagieren mit dem Antigen aus der Probe unter Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes, der nach Agglutination turbidimetrisch gemessen wird.

Konzentration der gebrauchsfertigen Lösung:

R1:	
TRIS* Puffer pH 7,8	100 mmol/l
Polyethylenglykol	4,5 %
NaCl	150 mmol/l
Konservierungsmittel	

R2:	
Anti-Human C 4-Antikörper (Kaninchen);	abhängig vom Titer
TRIS* Puffer pH 7,8	80 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
Konservierungsmittel	

*TRIS= Tris (hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid

Lagerung und Haltbarkeit:

R1: Inhalt ist gebrauchsfertig
R2: Inhalt ist gebrauchsfertig
Bei +2°C bis +8°C sind die Reagenzien bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.
Onboard Stabilität bei +2°C bis +8°C: R1: 84 Tage
R2: 84 Tage

Untersuchungsgut:

Serum, entnommen mit Standard-Probenentnahmeröhrchen
Na-Heparin-, Li-Heparin-, oder K-EDTA-Plasma
Haltbarkeit: 2 Tage bei +20°C bis +25°C
2 Tage bei +4°C bis +8°C

Proben, die Präzipitate enthalten, müssen vor dem Test zentrifugiert werden.

Hinweis:

In vitro Diagnostikum.
Weitere sicherheitsrelevante Informationen sind im Sicherheitsdatenblatt enthalten. Dieses steht auf unserer Homepage <http://www.analyticon-diagnostics.com> zum Download bereit.
Die beim Umgang mit Laborreagenzien üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Einschränkungen des Verfahrens - Interferenzen:

Als Bewertung gilt: Wiederfindung $\pm 10\%$ vom Ausgangswert.
Ikterus: Keine wesentliche Beeinflussung bis zu einer Bilirubin-Konzentration von 80mg/dl.
Hämolyse: Keine wesentliche Beeinflussung bis zu einer Hämoglobin-Konzentration von 1100 mg/dl.
Lipämie: Erhöhte Triglycerid-Konzentrationen können die Messwerte beeinflussen. Es besteht keine zufrieden stellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.
Keine wesentliche Beeinflussung durch Rheumafaktoren bis zu einer Konzentration von 1200IU/ml.
Es wurde kein High-Dose-Hook-Effekt bis zu einer C4 Konzentration von 500mg/dl beobachtet.
Monoklonale Gammopathie vom Typ IgA bzw. IgM kann die C4-Bestimmung stören. Die Auswirkung von Medikamenten oder deren Metaboliten auf den Test ist nicht in allen Fällen bekannt. Im Zweifelsfall wird deshalb empfohlen, den Test nach Absetzen der Medikation zu wiederholen. Ein Absetzen der Medikation darf allerdings nur nach Anweisung des behandelnden Arztes erfolgen.

Testverfahren:

Applikationen für automatisierte Systeme sind auf Anfrage erhältlich.

Gelieferte Materialien

- Gebrauchsfertige Lösungen wie vorher angegeben
- zusätzlich benötigte Materialien
- Kalibrations- und Kontrollmaterialien wie nachfolgend beschrieben
- NaCl-Lösung (0,9%)

Manuelle Testdurchführung:		
Wellenlänge:		340 nm
Reaktionstemperatur:		+37 °C
Schichtdicke:		1 cm
Messung:		gegen Reagenzienleerwert (RLW)
Probe/Kalibrator	RLW	Probe/Kalibrator
R1	12 µl	750 µl
	750 µl	750 µl
Mischen, 5 Min. inkubieren und E ₁ ablesen. Dann zufügen:		
R2	150 µl	150 µl
Mischen, 5 Min. inkubieren und E ₂ ablesen.		
Berechnung:		
$\Delta E = [(E_2 - E_1) \text{ Probe oder Kalibrator}] - [(E_2 - E_1) \text{ RLW}]$		
Die Konzentration von C 4 in Patientenserum sollte aus dem ΔE der Probe mit Hilfe eines mathematischen Modells wie logit/log berechnet oder aus einer Kalibrationskurve abgelesen werden, beruhend auf den Messergebnissen von 6 Standards für einen Kalibrationsbereich von 0 bis 100 mg/dl C 4. Für den Nullpunkt wird die Verwendung einer NaCl-Lösung (0,9%) empfohlen.		

Messbereich:

1,5 - 100 mg/dl bzw. 0,015 - 1,0 g/l*
Bei höheren Konzentrationen werden die Proben manuell mit Natriumchlorid-Lösung (0,9%) verdünnt (z.B. 1 + 1). Das Ergebnis ist mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor zu multiplizieren (z.B. Faktor 2).

*Abhängig von der höchsten angegebenen Standardkonzentration.

Referenzbereich:

10 - 40 mg/dl* bzw. 0,1 - 0,4 g/l**

** Referenzwerte gemäß CRM 470 Protein-Standardisierung

Jedes Labor sollte die Übertragbarkeit der Referenzbereiche für die eigenen Patientengruppen überprüfen und gegebenenfalls eigene Referenzbereiche ermitteln. Für diagnostische Zwecke sind die C 4-Ergebnisse stets im Zusammenhang mit der Anamnese, der klinischen Untersuchung und anderen Untersuchungsergebnissen zu werten.

Sensitivität (analytische Nachweisgrenze):

1,5 mg/dl bzw. 0,015 g/l
Die Nachweisgrenze entspricht der niedrigsten messbaren C 4-Konzentration, die von Null unterschieden werden kann. Sie wird berechnet als die Konzentration, die drei Standardabweichungen oberhalb des niedrigsten Standards liegt. (Nullstandard + 3 SD, Serienpräzision, n = 21)

Impräzision:

Die Reproduzierbarkeit in Serie wurde mit Kontrollproben (n = 20) bestimmt und ergab folgende Ergebnisse:

Probe	In der Serie		
	MW mg/dl	SD mg/dl	VK %
Kontrolle 1	19,45	0,22	1,11
Kontrolle 2	25,52	0,27	1,07
Kontrolle 3	38,13	0,41	1,08

Die Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag wurde mit Kontrollproben (n = 20) bestimmt und ergab folgende Ergebnisse:

Probe	Tag / Tag		
	MW mg/dl	SD mg/dl	VK %
Humanserum 1	19,8	0,44	2,22
Humanserum 2	39,5	0,83	2,09
Humanserum 3	59,1	1,17	1,99

Methodenvergleich:

Bei einem Vergleich von Analyticon Turbitex C3c (y) mit einem kommerziell erhältlichen Test (x) wurden mit 60 Proben folgende Ergebnisse erhalten:
 $y = 1,374 x + 1,021$; $r = 0,974$

Qualitätskontrolle:

Protein Control Level 1 3 x 1 ml #7661
 Protein Control Level 2 3 x 1 ml #7662

Die Kontrollintervalle und Kontrollgrenzen sind den individuellen Anforderungen jedes Labors und den länderspezifischen Richtlinien anzupassen. Die Ergebnisse müssen innerhalb der festgesetzten Bereiche liegen. Jedes Labor sollte Korrekturmaßnahmen für den Fall beschreiben, dass Werte außerhalb des Bereichs liegen.

Kalibration:

Multikalibration

Standardisierung: Die C 4-Methode wurde an der Referenzpräparation CRM 470 abgeglichen (RPPHS - Reference Preparation for Proteins in Human Serum).

• Roche/Hitachi 904/911/912/917

S1: NaCl (0,9%)

S2-S6: Bio Cal® P 5 x 1 ml #1470

Faktoren für die Berechnung der Standardkonzentrationen der Sechspunkt-Kalibrationskurve aus dem chargenspezifischen Sollwert des

Bio Cal P:

S2: 0,204 S5: 1,750

S3: 0,407 S6: 2,500

S4: 1,000

• Roche/Hitachi 704/717/902

S1: NaCl (0,9%)

S2-S5: Bio Cal® P Cal set 5 x 1 ml #1475

Kalibrationshäufigkeit:

Eine Vollkalibration wird empfohlen:

- Nach 84 Tagen
- Bei Chargenwechsel
- Wenn Qualitätskontrollverfahren dies erfordern

Entsorgung:

Bitte beachten Sie die jeweiligen gesetzlichen Vorschriften.

Literatur:

1. Bablok W et al. General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin Chem Biochem 1988; 26:783-790
2. Greiling H, Gressner AM (Hrsg.). Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. Auflage. Stuttgart/New York: Schattauer, 1995: 1159-62
3. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. List of Analytes Preamplified. Broschüre in: Samples: From the Patient to the Laboratory. Darmstadt: GIT-Verlag, 1996
4. Konsensuswerte der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin, der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und des Verbandes der Diagnostica-Industrie e.V. (VDGH). Clin Lab 1995;41:743-748
5. Müller-Eberhard HJ. Complement: Chemistry and pathways. In: Inflammation: Basic principles and clinical correlates. Gallin I, Goldstein IM, Snyderman R (Hrsg.) New York: Raven Press, 1988:21-53
6. Passing H, Bablok W. A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two different Analytical Methods. J Clin Chem Clin Biochem 1983;21: 709-720
7. Thomas L (Hrsg.) Labor und Diagnose, 5. Auflage. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH 1998:812-823
8. Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3. Auflage. Philadelphia Pa.: WB Saunders, 1995: 164-165