

Χρήση για την οποία προορίζεται

Το Autokit CH50 είναι μία *in-vitro* ανοσολογική δοκιμασία λιποσωμάτος (LIA) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής δραστηριότητας του συμπληρώματος (CH50) στον ανθρώπινο ορό, με τη χρήση μίας αυτοματοποιημένης διαδικασίας.

Περιλήψη και επεξήγηση της εξέτασης

Η διαδοχική σειρά αντιδράσεων του συμπληρώματος, που αποτελείται από ~20 πρωτεΐνες του ορού, παίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό αμυντικό σύστημα. Η δραστηριότητα του συμπληρώματος στον ανθρώπινο ορό μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη διάγνωση πολλών παθήσεων. Κλινικά, η δραστηριότητα του συμπληρώματος είναι ένας άμεσος δείκτης ανωμاليών του συστήματος του συμπληρώματος και διαφέρει από τα ανοσοποιητικά συστατικά του συστήματος. Η δραστηριότητα του συμπληρώματος έχει συσχετιστεί με το ενεργό στάδιο του συστηματικού ερυθροματώδους λύκου, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, την κρουσφαριναιμία-αγγειίτιδα, μερικές μορφές νεφρίτιδας και τις κληρονομικές ανεπάρκειες του συστήματος του συμπληρώματος.¹

Παλαιότερα, η πιο κοινή χρησιμοποιούμενη δοκιμασία για τη δραστηριότητα του συμπληρώματος βασιζόταν στην αιμόλυση με τη μεσολάβηση του συμπληρώματος ευαισθητοποιημένων με αντίσωμα ερυθροκυττάρων.² Στη μέθοδο αυτή, είναι απαραίτητες οι κατάλληλες αραιώσεις του ορού για να μετρηθεί η λύση των κυττάρων -δείτεών. Έχει αναπτυχθεί μια απλούστερη μέθοδος που δεν απαιτεί αραιώση του ορού.³

Ωστόσο, και οι δύο μέθοδοι είναι περίπλοκες και χρονοβόρες και τα αντιδραστήρια δεν είναι σταθερά εξαιτίας της χρήσης ερυθροκυττάρων. Επιπλέον, είναι δύσκολο να αυτοματοποιηθεί μία δοκιμασία αιμόλυσης με συμπλήρωμα εξαιτίας της ασταθούς φύσης της ερυθροκυτταρικής διαστολής.

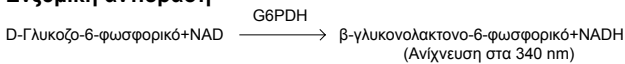
Τα λιποσώματα, αποτελούμενα από συγκεντρικά στρώματα λιπιδίων που χωρίζονται με υδατικά μεσοδιαστήματα, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη μελέτη της καταστροφής των κυτταρικών μεμβρανών με τη μεσολάβηση του συμπληρώματος.^{4,5} Μία ομοιογενής δοκιμασία για την ολική δραστηριότητα του συμπληρώματος που βασίζεται στην ανοσολογική λύση των λιποσωμάτων έχει αναφερθεί στο παρελθόν.⁶ Ο βαθμός λύσης των λιποσωμάτων καθορίζεται από τη δραστηριότητα της εγκλωβισμένης αλκαλικής φωσφατάσης και η διαδικασία, η οποία γίνεται χειροκίνητα, δε μπορεί να εφαρμοστεί σε αυτοματοποιημένους εργαστηριακούς αναλυτές. Η μέθοδος αυτή απαιτεί την προσθήκη πολλών αντιδραστηρίων σε δοκιμαστικούς σωλήνες, μακρό χρόνο αντίδρασης και τη χρήση αντισωμάτων που συνδέονται στα λιποσώματα τα οποία μπορεί να επάγουν τη συσσωρευση και την καθίζηση των λιποσωμάτων στο επεξεργασμένο αντιδραστήριο.

Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μία αυτοματοποιημένη, ομοιογενή δοκιμασία που βασίζεται στα λιποσώματα για την ολική δραστηριότητα του συμπληρώματος στον ανθρώπινο ορό.

Χρησιμοποιήσαμε ένα ομοιογενή πληθυσμό μικρού μεγέθους λιποσωμάτων (200 nm) που παρείχε σταθερή διασπορά και γλυκοζο-6-φωσφορική δευδρογονάση (G6PDH, EC 1.1.1.49) ως εγκλωβισμένο ένζυμο (το ιδανικό pH του G6PDH είναι το ουδέτερο σε σύγκριση με αυτό της αλκαλικής φωσφατάσης). Με τη χρήση των λιποσωμάτων αυτών δημιουργήσαμε ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα εξέτασης της ολικής δραστηριότητας του συμπληρώματος.⁷

Αρχή της μεθόδου

Όταν ένα δείγμα αναμειγνύεται με το Λιπόσωμα και το Υπόστρωμα, τα αντισώματα στο αντιδραστήριο συνδέονται με το δυνηπροφαινύλιο (DNP) στα λιποσώματα και κατάπιν οι παράγοντες συμπληρώματος στο δείγμα ενεργοποιούνται από το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος. Οι ενεργοποιημένοι αυτοί παράγοντες συμπληρώματος διασπούν τη μεμβράνη του λιποσωμάτος. Το ένζυμο, G6PDH, που περιέχεται στο λιπόσωμα, αντιδρά με το NAD και το γλυκοζο-6-φωσφορικό (G6P) στο αντιδραστήριο. Κατά την ενζυμική αυτή αντίδραση, το NAD μειώνεται σε NADH. Ως αποτέλεσμα αυτής της ελάττωσης, η απορρόφηση στη 340 nm αυξάνεται. Η αύξηση της απορρόφησης είναι ανάλογη με τη δραστηριότητα του συμπληρώματος στο δείγμα.

Ενζυμική αντίδραση**Αντιδραστήρια****Περιεχόμενα και συνθήκες φύλαξης**

R1: Λιπόσωμα	2 φιαλίδια x 20 mL	Να φυλάσσεται στους 2-10°C. (Να μην ψύχεται)
R2: Υπόστρωμα	1 φιαλίδιο x για 20 mL	Να φυλάσσεται στους 2-10°C.
R2a: Διαλύτης	1 φιαλίδιο x 20 mL	Να φυλάσσεται στους 2-10°C.
R1: Λιπόσωμα	Περιέχει G6PDH	4 μονάδες/mL
R2: Υπόστρωμα	Περιέχει G6PDH	24 mmol/L
R2a: Διαλύτης	Περιέχει αντι-DNP αντισώμα, αίγας και	9 mmol/L NAD
	Περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα μηλικού αλάτος (pH 5.0)	10 mmol/L

Μείγμα των:
5-χλωρο-2-μεθυλο-2H-ισοθειαιζωλ-3-όνη [αριθ. EK247-500-7] και
2-μεθυλο-2H-ισοθειαιζωλ-3-όνη [αριθ. EK 220-239-6] (3:1)

Το προϊόν (R2a) περιέχει συστατικά που ανήκουν στην κατηγορία της Οδηγίας 1999/45/ ΕΚ.

Χαρακτηριστικό γράμμα και καθορισμός κινδύνου του προϊόντος:

Xi



Xi: Ερεθιστικό

Φράσεις-R:

R 43 Μπορεί να προκαλέσει ευαισθητοποίηση σε επαφή με το δέρμα.

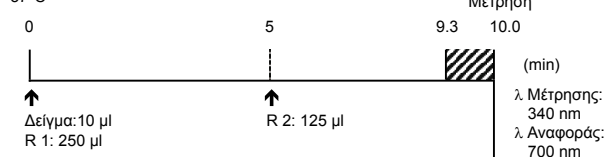
Φράσεις-S:

S 24 Αποφεύγετε την επαφή με το δέρμα
S 37 Να φοράτε κατάλληλα γάντια

Πρότυπη διαδικασία

Hitachi®717

37°C



Η παραπάνω βασική διαδικασία αποτελεί παράδειγμα. Οι εφαρμογές σε όργανα είναι διαθέσιμες κατόπιν αιτήσεως.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

- Μόνο για διαγνωστική χρήση *in-vitro*.
- Η χρήση αυτής της δοκιμασίας επιτρέπεται μόνο σε εκπαιδευμένο και ειδικευμένο προσωπικό. Ανατρέξτε στις ισχύουσες σχετικές εθνικές και τοπικές προδιαγραφές και νόμους.
- Να μη χρησιμοποιείται εσωτερικά σε ανθρώπους ή ζώα.
- Λειτουργήστε τους αμναλυτές σύμφωνα με το εγχειρίδιο χρήσης, κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες.
- Μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες.
- Τα αντιδραστήρια να χρησιμοποιούνται μόνο για την πιο πάνω περιγραφόμενη δοκιμασία.
- Η κλινική διάγνωση θα πρέπει να καθορίζεται από το γιατρό με βάση τα κλινικά συμπτώματα και τα άλλα αποτελέσματα εξετάσεων.
- Αποθηκεύστε στις καθοριζόμενες συνθήκες. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα κάθε περιεκτική αντιδραστηρίου.
- Μετά το άνοιγμα, συνιστάται η άμεση χρήση. Κατά τη φύλαξη των ανοικτών αντιδραστηρίων, κλείστε τα φιαλίδια και φυλάξτε στις καθοριζόμενες συνθήκες.
- Καθώς όλα τα δείγματα είναι δυναμικά μολυσματικά, ο χειρισμός τους απαιτεί τις ανάλογες προφυλάξεις. Ανατρέξτε στα αντίστοιχα πρωτόκολλα της καλής εργαστηριακής πρακτικής για την αποφυγή της μετάδοσης μολύνσεων και χειριστείτε τα δείγματα σε συμφωνία με οποιοσδήποτε άλλους τοπικούς ή εθνικούς κανονισμούς που σχετίζονται με τον ασφαλή χειρισμό τέτοιων υλικών.
- Εάν τα αντιδραστήρια έλθουν σε επαφή με το στόμα, τα μάτια ή το δέρμα ξεπλένετε αμέσως με άφθονο νερό. Αν είναι απαραίτητο συμβουλευθείτε γιατρό.
- Όταν απορρίπτετε τα αντιδραστήρια να ακολουθείτε τους τοπικούς ή εθνικούς κανονισμούς.

Φυσικές ή χημικές ενδείξεις αστάθειας

Η παρουσία ζύμματος στα αντιδραστήρια ή οι τιμές του ορού ελέγχου που βρίσκονται έξω από τον αποδεκτό εύρος του κατασκευαστή μπορεί να αποτελούν ένδειξη αστάθειας του αντιδραστηρίου.

Όργανα

Το αντιδραστήριο είναι σχεδιασμένο για χρήση με τους αυτόματους αναλυτές που διατίθενται στο. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο λειτουργίας για περιγραφή της λειτουργίας του οργάνου και για προδιαγραφές. Οι βάσεις λειτουργίας σε εναλλακτικά όργανα θα πρέπει να ορίζεται από τον τελικό χρήστη.

Συλλογή και διατήρηση δειγμάτων

Ως δείγμα χρησιμοποιείται ορό. Συνιστάται η μέτρηση της δραστηριότητας του συμπληρώματος στο δείγμα αμέσως μετά το διαχωρισμό του ορού. Αν είναι απαραίτητο, φυλάξτε τα δείγματα στους -70°C η λιγότερο. Το ασκορβικό οξύ, η χολερυθρίνη, η αιμοσφαιρίνη και η θάλλωση που προκαλεί η λιπιδαιμία δεν επηρεάζουν σημαντικά τη μέτρηση.

Υλικά που διατίθενται

Ανατρέξτε στο κεφάλαιο με τον τίτλο «Αντιδραστήρια».

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν διατίθενται

Αναλυτής.
CH50 Βαθμονομητής (Κωδικός Νο. 997-43801).
Υλικά Ποιοτικού Ελέγχου (Κωδικός Νο. 991-43701).

Παρασκευή αντιδραστηρίων**Αντιδραστήριο 1: (R1)**

Χρησιμοποιήστε το λιπόσωμα (R1) όπως χορηγείται. Το διάλυμα αυτό είναι σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Αντιδραστήριο 2: (R2) + (R2a)

Ανασυστήστε ένα φιαλίδιο (για 20 mL) υποστρώματος (R2) με ένα φιαλίδιο (20 mL) διαλύτη (R2a) για να παρασκευάσετε το διάλυμα υποστρώματος. Το διάλυμα υποστρώματος είναι σταθερό για 40 ημέρες στους 2-10°C

Βαθμονομητής: CAL

Ανασυστήστε ένα φιαλίδιο (για 0.5 mL) κάθε βαθμονομητή CH50 με 0.5 mL απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού. Διατηρείστε τον ανασυστημένο βαθμονομητή στον πάγο και χρησιμοποιήστε τον μέσα στην ίδια μέρα.

Αποτελέσματα

Τα τελικά αποτελέσματα υπολογίζονται αυτόματα και τυπώνονται οι συγκεντρώσεις.

Βαθμονόμηση

Η δοκιμασία CH50 παράγει μία καμπύλη βαθμονόμησης κάνοντας γραφική παράσταση της απορρόφησης ως προς τη συγκέντρωση. Συνιστάται η διενέργεια βαθμονόμησης τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα.

Ποιοτικός έλεγχος

Ένα πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου συνιστάται για όλα τα κλινικά εργαστήρια. Η ανάλυση του υλικού ελέγχου τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε παθολογικά εύρη με κάθε δοκιμασία συνιστάται για την παρακολούθηση της απόδοσης της διαδικασίας. Οι τιμές που λαμβάνονται από τα υλικά ελέγχου θα πρέπει να βρίσκονται μέσα στα αποδεκτά εύρη που ορίζονται από τον κατασκευαστή. Αν πρόκειται να τεκμηριωθούν τιμές για υλικά ελέγχου που δεν έχουν εξεταστεί, το εργαστήριο θα πρέπει να εξετάζει κάθε επίπεδο του υλικού ελέγχου αρκετές φορές για να εξαχθεί ένας αξιόπιστος μέσος όρος και ένα αποδεκτό εύρος.

Περιορισμοί της διαδικασίας

Το μετρήσιμο εύρος του Wako Autokit CH50 είναι 10-60 U/mL.

Αναμενόμενες τιμές

Ορός: 23-46 U/mL.⁷

Καθώς οι αναμενόμενες τιμές επηρεάζονται από την ηλικία, το φύλο, τη διαίτα, τη γεωγραφική θέση και άλλους παράγοντες, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να ορίζει τις δικές του αναμενόμενες τιμές για τη διαδικασία αυτή.

Χαρακτηριστικά λειτουργίας**Ακρίβεια (WAKO-30R)**

No.	Αναμενόμενη (U/mL)	Παρατηρούμενη (U/mL)	Διόρθωση (%)
1	27.1	31.0	114.4
2	36.5	40.0	109.6
3	47.3	47.0	99.4
4	54.6	53.5	98.0

Ακρίβεια (WAKO-30R)

Προκαταρκτική εξέταση ακρίβειας- Ακρίβεια εντός κύκλου

Κύκλος #	Δείγμα #	Αντίγραφο	Μέση τιμή (U/mL)	SD	CV (%)
1	1	21	49.5	0.5	1.10
1	2	21	25.9	0.3	1.35
2	1	21	46.2	0.5	1.14
2	2	21	27.9	0.3	1.05

Συνολική ακρίβεια

Τα δεδομένα συλλέχθηκαν σύμφωνα με τις βασικές αρχές του NCCLS

Συγκέντρωση Επίπεδο	# ακμασίας Ημέρες	Μέση τιμή (U/mL)	SD	CV (%)	S _{wr}	S _T
Υψηλό	21	48.3	1.57	3.2	18.9	22.1
Χαμηλό	21	26.9	1.54	5.7	16.6	16.7

Ευαισθησία: Το ελάχιστο επίπεδο CH50 που μπορεί να ανιχνευθεί υπολογίζεται σε 10 U/mL.

Ειδικότητα (WAKO-30R)

Πρόσθετη μελέτη

Ασκορβικό οξύ (mg/dL)	Καθόλου	10	20	30	40	50
CH50 (U/mL)	36.0	36.0	36.0	35.0	35.5	35.5

Χολερυθρίνη (mg/dL)	Καθόλου	8	16	24	32	40
CH50 (U/mL)	35.0	36.0	36.0	36.0	37	37

Χολερυθρίνη (mg/dL)	Καθόλου	100	200	300	400	500
CH50 (U/mL)	40	40	40	40	40	39.5

Παρεμβολές

Οι συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος έως 50 mg/dL, αιμοσφαιρίνης έως 500 mg/dL και χολερυθρίνης έως 40 mg/dL δεν επηρεάζουν σημαντικά τη δοκιμασία Autokit CH50.

Βιβλιογραφία

- Schur PH : Complement studies of sera and other biologic fluids. Hum Pathol 1983; **14** : 338 - 42.
- Mayer MM : Complement and complement fixation. In : Kabat EA, Mayer MM, eds. Experimental immunochemistry, 2nd ed. Springfield, IL: Charles C Thomas. 1967; 133 - 240.
- Kitamura H, Inai S, Nagaki K : A simple procedure for the titration of total hemolytic complement activity. Jpn J Clin. Chem. 1983; **12** : 143 - 7.
- Kinsky SC : Antibody-complement interaction with lipid model membranes. Biochim Biophys Acta 1972; **265** : 1 - 23.
- Akots G, Braman JC, Broeze RJ, Bowden DW : Rapid, homogeneous phase, liposome-based assays for total complement activity. Complement 1984; **1** : 125-33.
- Bowden DW, Rising M, Akots G, Myles A, Broeze RJ : Homogeneous liposome-based assay for total complement activity in serum. Clin. Chem. 1986; **32** : 275 - 8.
- Yamamoto S, Kubotsu K, Kida M, Kondo K, Matsuura S, Uchiyama S, Yonekawa O, Kanno T : Clin. Chem. 1995; **41** : 586 - 90.

Πληροφορίες για παραγγελίες

Κωδικός No.	Προϊόντα	Συσκευασία
995-40801	Autokit CH50	R1: 2 x 20 mL R2: 1 x για 20 mL R2a: 1 x 20 mL
997-43801	CH50 Calibrator	CAL: 5 conc. x για 0,5 mL
991-43701	Complement Control	H: 10 x για 0,5 mL (High) L: 10 x για 0,5 mL (Low)