

**Utilidade**

O Autokit CH50 é um imunoenensaio *in vitro*, automatizado, baseado em liposomas para a determinação quantitativa da actividade total do complemento (CH50), em soro humano.

**Resumo e explicação do ensaio**

A série do complemento, integrada por, aproximadamente, 20 proteínas séricas, tem um papel importante no sistema imunológico. A actividade do complemento em amostras de soro revela informação importante para o diagnóstico de várias doenças. Clinicamente, a actividade do complemento é um indicador directo das anormalidades do sistema do complemento, ao contrário dos componentes imunoreagentes do sistema. A actividade do complemento pode ser relacionada com as fases activas do lupus eritematoso sistémico, artrite reumatóide, vasculite-crioglobulinemia, algumas nefrites e imunodeficiências congénitas.<sup>1</sup> Até ao momento, o ensaio mais utilizado para o complemento total é baseado na hemólise através de complemento de eritrócitos ricos em anticorpos.<sup>2</sup> Neste método são necessárias diluições apropriadas do soro para medir a lise das células indicadoras. Desenvolveu-se um método simples, que não requer diluições do soro.<sup>3</sup>

No entanto, ambos os métodos são complicados e laboriosos e os reagentes instáveis devido à utilização de eritrócitos. Além do mais, os sistemas hemolíticos são dificilmente automatizáveis devido à instabilidade das suspensões de eritrócitos.

Os liposomas, integrados por lâminas concêntricas de bi-capas lipídicas separadas por espaços aquosos, foram amplamente utilizados no estudo do dano produzido nas membranas celulares pelo sistema do complemento.<sup>4,5</sup>

Anteriormente tinha-se descrito um ensaio homogéneo para a actividade total do complemento baseado na imunólise dos liposomas. O grau de lise era determinado através da actividade da fosfatase alcalina englobada e o procedimento, que se realizava de forma manual, não podia ser aplicado aos auto-analisadores. Este método requeria a adição de vários reagentes aos tubos de reacção, um tempo de reacção prolongado e a utilização de anticorpos unidos aos liposomas, o que poderia provocar a agregação e sedimentação dos liposomas no reagente preparado.

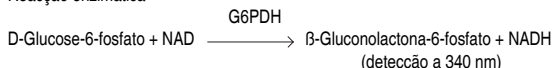
Recentemente, desenvolvemos um ensaio homogéneo automatizável, baseado em liposomas para a determinação da actividade do complemento total em soro. Utiliza-se uma população homogénea de liposomas de pequeno tamanho (200 nm), que proporcionam uma dispersão estável e glucose-6-fosfato-deshidrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) como enzima englobada (o pH óptimo da G6PDH é neutro ao contrário do da fosfatase alcalina). Utilizando estes liposomas, desenvolvemos um ensaio completamente automático para a determinação da actividade total do complemento.<sup>7</sup>

**Princípio do método**

Quando se mistura a amostra com os liposomas e o substrato, os anticorpos presentes no reagente combinam-se com o dinitrofenil (DNP) adicionado aos liposomas. O complexo antígeno-anticorpo activa o complemento presente na amostra do paciente. O complemento activado rompe a membrana do liposoma. O enzima G6PDH contido no liposoma reage com o NAD e a a glucose-6-fosfato (G6P) presentes no reagente. Durante a reacção enzimática o NAD reduz-se a NADH, aumentando a absorvância para 340 nm. O aumento da absorvância é proporcional à actividade do complemento na amostra.

**Reacção**

Reacção enzimática

**Reagentes****Composição e condições de conservação**

R1: Liposomas	2 Frascos x 20 ml	Conservar a 2-10° C. (Não congelar)
R2: Substrato	1 Frasco x para 20 ml	Conservar a 2-10° C.
R2a: Diluente	1 Frasco x 20 ml	Conservar a 2-10° C.
R1: Liposomas	de liposomas contendo G6PDH	4 unidades/ml
R2: Substrato	Anticorpo Anti-DNP (cabra)	24 mmol/l G6P 9 mmol/l NAD
R2a: Diluente	Tampão maleático, pH 5,0	10 mmol/l
<b>mistura de:</b>		
5-cloro-2-metil-2H-isotiazole-3-ona [N. CE 247-500-7] em 2-metil-2H-isotiazole-3-ona [N. CE 220-239-6] (3:1)		

Il reagente (R2a) contém compostos classificados de acordo com a Directiva 1999/45/CE.

**Símbolo de perigo e designação de perigo do produto:**

Xi: Irritante

**Frases R:**

R 43 Pode causar sensibilização em contacto com a pele.

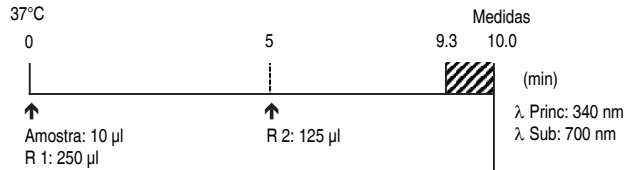
**Frases S:**

S 24 Evitar o contacto com a pele.  
S 37 Usar luvas adequadas.

**Standard procedure**

Hitachi®717

37°C



O procedimento padrão acima é um exemplo. As aplicações do instrumento estão disponíveis em cima do pedido.

**Advertências e medidas de precaução**

- Somente para uso *in vitro*.
- Este ensaio deve ser executado unicamente por pessoal técnico qualificado. Aplicam-se os regulamentos e as leis nacionais e regionais correspondentes.
- Inapropriado para uso interno em seres humanos ou animais.
- Para operar o equipamento, ter em atenção as indicações dadas no manual de instruções do fabricante!
- Não misturar ou utilizar os reagentes de dois lotes diferentes.
- Utilizar os recipientes e outros materiais apenas para os fins descritos para o ensaio.
- Este ensaio não deve ser a única base para a obtenção do diagnóstico clínico.
- Armazenar os reagentes sob as condições indicadas. Não utilizar os reagentes após a data de validade indicada na embalagem.
- Não recomendamos guardar os reagentes abertos por muito tempo. É favor fechar bem a embalagem depois de aberta e armazená-la à temperatura indicada.
- Todos os materiais que entraram em contacto com a amostra devem ser considerados como potencialmente infecciosos. O manejo de tais materiais deve estar de acordo com as directrizes das boas práticas de laboratório e ser executado de maneira a corresponder às determinações nacionais e internacionais.
- Evitar o contacto dos reagentes com a boca, os olhos e a pele! Em caso de contacto com a pele ou os olhos, lavar as partes afectadas com bastante água.
- Quando for descartar os reagentes, ter em atenção os regulamentos locais e nacionais correspondentes.

**Indícios de instabilidade física ou química**

A presença de precipitados nos reagentes, ou a obtenção de valores de soro controlo fora do estabelecido pelo fabricante pode ser uma indicação de instabilidade no reagente.

**Instrumentação**

O reagente foi desenhado para ser utilizado nos analisadores disponíveis no mercado. Consultar o manual de instruções para obter uma descrição da sua utilização e especificações. Os resultados obtidos em equipamentos alternativos devem ser estabelecidos pelo utilizador final.

**Obtenção e preparação da amostra**

Empregar soro como amostra. Recomenda-se medir a actividade do complemento imediatamente depois de ter separado o soro. Se for necessário, armazenar a amostra a -70°C, ou a temperatura inferior. O ácido ascórbico, a bilirrubina, a hemoglobina e a as amostras lipémicas turvas não têm um efeito significativo nos resultados.

**Materiais Fornecidos**

Ver o item „Reagentes“

**Materiais necessários mas não fornecidos**

Analisador automatizado  
Calibrador CH50 (Código Nº 997-43801)  
Controlo de Complemento (Código Nº 991-43701)

**Preparação dos reagentes****Reagente 1: (R1)**

Utilizar os liposomas (1) tal como são fornecidos. A solução é estável até à data de validade.

**Reagente 2: (R2) + (R2a)**

Reconstruir uma embalagem (para 20 ml) dos Substrato (R2) com uma embalagem (20 ml) de Diluente (R2a) para preparar a Solução Substrato. A Solução Substrato é estável durante 40 dias a 2-10° C

**Calibrador: CAL**

Aferir os 0,5 ml de água destilada ou desionizada para dissolver o conteúdo de cada calibrador. Uma vez reconstituído manter a solução em gelo e usá-la num período de 8 horas.

**Resultados**

Os resultados são calculados automaticamente e exprimem-se em unidades de concentração.

**Calibração**

O ensaio CH50 é calibrado com uma curva que representa a absorvância face à concentração. Recomenda-se que a calibração seja efectuada pelo menos uma vez por semana.

**Controlo de Qualidade**

Recomenda-se um programa de controlo de qualidade para todos os laboratórios clínicos. Para monitorizar o funcionamento da técnica é recomendável a análise de materiais de controlo em diversos intervalos normais e patológicos. Os valores obtidos devem estar entre os limites indicados pelo fabricante. Se o material de controlo não tem valores estabelecidos, o laboratório deverá realizar o número de análises necessárias para obter valores dentro de um intervalo aceitável.

**Limitações do procedimento**

O intervalo de medição do Autokit CH50 é de 10-60 U/ml.

**Valores esperados**

Soro: 23-46 U/ml.<sup>7</sup>

Já que os valores esperados são condicionados pela idade, sexo, dieta, localização geográfica e outros factores, cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo.

**Resultados analíticos****Exatidão (WAKO-30R)**

Nº	Esperado (U/ml)	Observado (U/ml)	Recuperação (%)
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

**Precisão (WAKO-30R)**

Teste preliminar de precisão. Precisão intra-ensaio

Processo #	Amostra #	Replicados	Média (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

**Precisão total**

Os dados foram recolhidos de acordo com as directivas NCCLS

Nível de concentração	# dias de ensaio	Média (U/ml)	SD	CV (%)	S <sub>w</sub>	S <sub>t</sub>
High	21	48,3	1,57	3,2	18,9	22,1
Low	21	26,9	1,54	5,7	16,6	16,7

**Sensibilidade:** o nível mínimo detectável de CH50 foi estimado em 10 U/ml.

**Especificidade (WAKO-30R)**

Estudo de adição

Ácido ascórbico (mg/dl)	None	10	20	30	40	50
CH50 (U/ml)	36,0	36,0	36,0	35,0	35,5	35,5

Hemoglobina (mg/dl)	None	8	16	24	32	40
CH50 (U/ml)	35,0	36,0	36,0	36,0	37	37

Hemoglobina (mg/dl)	None	100	200	300	400	500
CH50 (U/ml)	40	40	40	40	40	39,5

**Interferências**

Concentrações de ácido ascórbico até 50 mg/dl, hemoglobina até 500 mg/dl e bilirubina até 40 mg/dl não interferem de forma significativa com o Autokit CH50.

**Referencias**

- 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.

**Apresentação**

Código	Produto	Apresentação
995-40801	Autokit CH50	R1: 2 x 20 ml R2: 1 x para 20 ml R2a: 1 x 20 ml
997-43801	CH50 Calibrator	CAL: 5 Conc. x para 0,5 ml
991-43701	Complement Control	H: 10 x para 0,5 ml (High) L: 10 x para 0,5 ml (Low)