

Utilisation

Le coffret Autokit CH50 est un test *in vitro* par Liposome Immunoessai (LIA) pour la détermination quantitative de l'activité du complément total (CH50) dans le sérum humain, à l'aide d'une méthode automatisée.

Résumé clinique et présentation du dosage

La cascade du complément, formée de ~ 20 protéines sériques, joue un rôle important dans le système de défense immunitaire de l'organisme. L'activité du complément mesurée dans le sérum humain peut fournir des informations essentielles pour le diagnostic d'un grand nombre d'affections. Sur le plan clinique, l'activité du complément est un indicateur direct des anomalies du système du complément, et se différencie des composants immunoréactifs du système. On a établi une corrélation entre l'activité du complément et la phase active du lupus érythémateux disséminé, de la polyarthrite rhumatoïde, la cryoglobulinémie-vasculite, certaines formes de néphrite, et des anomalies congénitales du système du complément.¹ Auparavant, la méthode la plus couramment utilisée pour déterminer l'activité du complément total reposait sur l'hémolyse complément-dépendante d'hématies sensibilisées.² Cette technique nécessitait d'effectuer des dilutions appropriées du sérum pour mesurer la destruction des cellules indicatrices. Une méthode plus simple, ne demandant pas de dilution du sérum, a été développée.³

Cependant, ces deux méthodes restent compliquées et longues, et les réactifs à base d'érythrocytes sont instables. De plus, il est difficile d'automatiser le dosage hémolytique du complément en raison du caractère instable de la suspension d'érythrocytes. Les liposomes, formés de vésicules concentriques de bi-couches de lipides séparées par des compartiments aqueux, ont été largement utilisés pour étudier la destruction immuno complément-dépendante des membranes cellulaires.^{4,5}

Une méthode en phase homogène basée sur la destruction des liposomes a été rapportée précédemment pour la détermination de l'activité du complément total.⁶ Le niveau de destruction des liposomes est mesuré par l'activité de la phosphatase alcaline encapsulée. La méthode, manuelle, ne peut pas être adaptée aux analyseurs automatiques des laboratoires.

La méthode nécessite l'addition de plusieurs réactifs dans le tube de dosage, une durée de réaction importante, ainsi que l'utilisation d'anticorps combinés aux liposomes et susceptibles d'induire une auto-agrégation et une sédimentation des liposomes dans le mélange réactionnel. Nous avons développé une méthode aux liposomes automatisée et en phase homogène pour la détermination de l'activité du complément total dans le sérum humain. Nous utilisons une population homogène de liposomes de petite taille (200 nm), qui donnent une suspension stable, et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH, EC 1.1.1.49) comme enzyme encapsulée (le pH optimum de la G6PDH est neutre par rapport à celui de la phosphatase alcaline). A l'aide de ces liposomes, nous avons développé une méthode entièrement automatisée pour la mesure de l'activité du complément total.⁷

Principe de la méthode

Quand un échantillon est mélangé avec le liposome et le substrat, les anticorps du réactif se combinent avec le dinitrophényl (DNP) des liposomes et les compléments de l'échantillon sont activés par le complexe antigène-anticorps. Les compléments activés rompent la membrane du liposome. L'enzyme G6PDH contenue dans le liposome réagit avec le NAD et le glucose 6-phosphate (G6P) du réactif. Au cours de la réaction enzymatique, le NAD est réduit en NADH. Suite à cette réduction, l'absorbance à 340 nm augmente. L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à l'activité du complément de l'échantillon.

Réactions

Réaction enzymatique



Préparation du réactif

Réactif 1: (R1)

Utiliser tel quel le Liposome (R1). La solution est stable jusqu'à la date de péremption.

Réactif 2: (R2) + (R2a)

Reconstituer un flacon (pour 20 ml) de Substrat (R2) avec un flacon (20 ml) de Diluant (R2a) pour préparer la Solution Substrat. La Solution Substrat est stable pendant 40 jours à 2 - 10 °C.

Réactifs

Contenus et conditions de conservation

R1 :	Liposome	Conservé à 2 - 10 °C (Ne pas congeler)
R2 :	Substrate	Conservé à 2 - 10 °C
R2a :	Diluant	Conservé à 2 - 10 °C

Composants

R1 :	Liposome	Contient du liposome G6PDH	4 U/ml
R2 :	Substrate	Contient des anticorps anti-DNP, de chèvre	24 mmol/l G6P 9 mmol/l NAD
R2a :	Diluant	Contient du tampon maléate, pH 5,0 Mélange contenant : 5-chloro-2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [no CE 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [no CE 220-239-6] (3:1)	5 mmol/l

Ce kit (R2a) contient des composants classés comme suit :

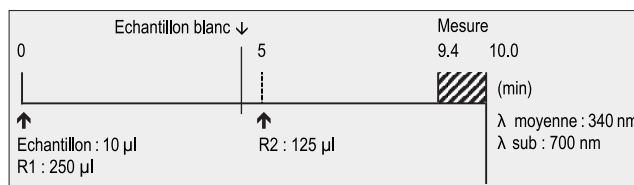
Classification selon le règlement (CE) n° 1272/2008



- **Mention d'avertissement Attention**
- **Composants dangereux déterminants pour l'étiquetage :**
Mélange de 5-chloro-2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [no CE 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [no CE 220-239-6] (3:1).
- **Mentions de danger**
Peut provoquer une allergie cutanée.
- **Conseils de prudence**
Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.
En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.
Laver les vêtements contaminés avant réutilisation.
EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau et au savon.
Traitement spécifique (voir sur cette étiquette).
Éliminer le contenu/réceptif conformément à la réglementation locale/régionale/ nationale/internationale.

Mode opératoire standard

Température : 37 °C (Hitachi® 717)



Ce mode opératoire standard est un exemple. Des adaptations pour automates sont disponibles sur demande.

Avertissements et précautions d'emploi

- Utilisation exclusive pour diagnostic *in vitro*.
- L'utilisation et l'adaptation de ce dosage sont réservées aux professionnels. Se référer à la législation en vigueur et aux réglementations locales ou nationales.
- A ne pas utiliser *in vivo* chez l'homme ou l'animal.
- Le fonctionnement des analyseurs doit se faire dans les conditions appropriées et selon les instructions du manuel de l'appareil.
- Ne pas mélanger les réactifs de lots différents.
- Ne pas utiliser les réactifs pour un quelconque usage autre que celui décrit ici.
- Un diagnostic clinique ne doit être posé par un médecin que sur base de la symptomatologie clinique en relation avec d'autres résultats de tests.
- Conserver les réactifs selon les conditions indiquées. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption mentionnée sur l'étiquette de chaque emballage.
- Après ouverture, il n'est pas recommandé de conserver longtemps le réactif. Pour conserver le réactif après ouverture, boucher le flacon et le garder à la température indiquée.
- Les échantillons d'origine humaine doivent être considérés comme potentiellement infectieux et être traités en conséquence. La manipulation de tels échantillons doit se faire en concordance avec les directives des bonnes pratiques de laboratoire pour la prévention des transmissions d'agents infectieux et en respectant les dispositions réglementaires nationales et internationales en vigueur.
- En cas de contact avec la bouche, les yeux ou la peau, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.
- L'élimination des réactifs doit se faire selon les exigences réglementaires nationales ou régionales en vigueur.

Signes physiques ou chimiques d'instabilité

La présence de précipités dans les réactifs ou des valeurs de sérums de contrôle en dehors du domaine fourni par le fabricant peuvent signifier une instabilité du réactif.

Instruments

Le réactif peut être utilisé sur les analyseurs automatiques présents sur le marché. Consulter le manuel opératoire de l'appareil, son descriptif et ses spécifications. Les performances standards obtenues sur d'autres instruments doivent être établies par l'utilisateur.

Recueil et conservation de l'échantillon

Utiliser le sérum comme échantillon.

Il est recommandé de mesurer l'activité du complément dans l'échantillon aussitôt après la séparation du sérum. Si nécessaire, conservez les échantillons à -70 °C ou en dessous. L'acide ascorbique, la bilirubine, l'hémoglobine et la turbidité lipémique n'ont pas d'influence significative sur la mesure.

Matériels fournis

Consulter le paragraphe « Réactifs ».

Matériels nécessaires mais non fournis

Analyseur automatique

Calibrateur CH50 (Référence No. : 997-43801)

Matériel de contrôle de qualité (Référence No. : 991-43701)

Résultats

Les résultats finaux sont calculés automatiquement et imprimés en concentration.

Calibration

Pour le test CH50, la courbe de calibration est obtenue en reportant les mesures d'absorbance par rapport à la concentration. Il est recommandé d'effectuer la calibration au moins une fois par semaine.

Contrôle de qualité

Il est recommandé à tous les laboratoires de biologie clinique de réaliser un programme de contrôle de qualité. Il est recommandé d'analyser un sérum de contrôle dans les domaines normaux et pathologiques avec chaque mesure afin d'en suivre la performance. Les valeurs obtenues pour les contrôles doivent toutes se situer dans les limites acceptables indiquées par le fabricant. Si des valeurs doivent être établies pour des matériels de contrôle non titrés, le laboratoire doit tester chaque niveau de matériel de contrôle un nombre de fois suffisant pour établir une valeur moyenne valable et une échelle de valeurs aux limites acceptables.

Limites de la méthode

- Le domaine de mesure de l'Autokit CH50 Wako est de 10 - 60 U/ml.
- Il est possible que les résultats d'analyse ne sont pas exacts si les échantillons sont dilués.

Valeurs attendues

Sérum : 31,6 - 57,6 U/ml.⁹

Ces valeurs attendues ont été retenues à partir d'une distribution de valeurs normales obtenues sur 243 sérums sélectionnés sur 880, au regard de 12 paramètres biochimiques significatifs.

Sachant que les valeurs attendues sont influencées par l'âge, le sexe, l'alimentation, la situation géographique et d'autres facteurs, chaque laboratoire est encouragé à établir ses propres valeurs de référence pour cette méthode.

Interférences

Des concentrations en acide ascorbique jusqu'à 50 mg/dl, en hémoglobine jusqu'à 500 mg/dl et en bilirubine jusqu'à 40 mg/dl n'ont pas d'influence significative sur le dosage Autokit CH50.

Etude de la performance

Exactitude (WAKO-30R)

No.	Attendue (U/ml)	Mesurée (U/ml)	Recouvrement (%)
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

Precision (WAKO-30R)

Précision intra-série

Série #	Echantillon #	Répétition	Moyenne (U/ml)	DS	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

Précision totale

Concentration Niveau	# d'essais Jours	Moyenne (U/ml)	DS	CV (%)	S _w	S _r
bas	21	26,9	1,54	5,7	16,6	16,7
haut	21	48,3	1,57	3,2	18,9	22,1

Les données sont fournies selon les normes NCCLS.

Sensibilité : La limite de détection inférieure de CH50 est estimée à 10 U/ml.

Spécificité (WAKO-30R)

Etude de surcharge

Acide Ascorbique (mg/dl)	sans	10	20	30	40	50
CH50 (U/ml)	36,0	36,0	36,0	35,0	35,5	35,5

Bilirubine (mg/dl)	sans	8	16	24	32	40
CH50 (U/ml)	35,0	36,0	36,0	36,0	37,0	37,0

Hémoglobine (mg/dl)	sans	100	200	300	400	500
CH50 (U/ml)	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	39,5

Références bibliographiques

- 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.
- Fujio K, Nagao K, Shiraiishi N. JPN J. Med Pharm Sci 2012 ; **67** (2) : 291-5.

Information commerciale

Réf. catalogue	Produit	Conditionnement
995-40801	Autokit CH50	R1 : 2 x 20 ml R2 : 1 x pour 20 ml R2a : 1 x 20 ml
995-40802	Autokit CH50 Small	R1 : 1 x 20 ml R2 : 1 x pour 11 ml R2a : 1 x 11 ml
997-43801	CH50 Calibrator	CAL : 5 conc. x pour 0,5 ml
991-43701	Complement Control	H : 10 x pour 0,5 ml (haut) L : 10 x pour 0,5 ml (bas)