

#### Finalità d'uso

Il test Autokit CH 50 è un saggio immunoliposomico (liposom immunoassay = LIA) *in vitro* automatizzato per la determinazione quantitativa dell'attività complementare totale (CH50) nel siero umano.

#### Riassunto e spiegazione del test

Il sistema complementare composto da circa 20 proteine plasmatiche svolge un ruolo importante nella difesa immunologica del corpo. L'attività complementare nel siero umano può fornire quindi informazioni importanti per la diagnosi di molte malattie. Dal punto di vista clinico l'attività complementare funge da indicatore diretto di anomalie di sistemi complementari e si distingue dai componenti immunoreattivi del sistema. L'attività complementare è stata correlata con la fase attiva di lupus eritematoso sistemico (SLE), artrite reumatica, vasculite-crioglobulinemia, alcune forme di nefrite e anomalie congenite del sistema complementare.<sup>1</sup> Finora la determinazione dell'attività complementare totale era basata normalmente sull'emolisi complemento-mediata di eritrociti sensibilizzati con anticorpi.<sup>2</sup> Per misurare la lisi degli indicatori con questo metodo erano però necessarie diluizioni adeguate del siero ed è stato quindi sviluppato un metodo più semplice senza diluizione del siero.<sup>3</sup>

Entrambi i metodi sono comunque complicati e dispendiosi ed i reagenti non sono inalterabili a causa dell'impiego di eritrociti. Oltretutto, l'automatizzare di un test del complemento emolitico si è rivelata difficile per l'instabilità della distribuzione degli eritrociti.

I liposomi sono composti da gusci concentrici di bilayer lipidici (doppio strato lipidico) separati da fasi acquose e sono stati esaminati intensamente in relazione al danneggiamento immunitario complemento-mediato delle membrane cellulari.<sup>4,5</sup>

Un test omogeneo per la determinazione dell'attività complementare totale, basata sul reagente lisante (immunolyse) dei liposomi, è già stata pubblicata.<sup>6</sup> L'entità della lisi dei liposomi viene determinata in base all'attività della fosfatasi alcalina incorporata. La procedura viene effettuata manualmente e non è possibile eseguirla in dispositivi di analisi automatica. Questo metodo richiede l'aggiunta di molti reagenti nelle provette, un lungo tempo di reazione e l'impiego di liposomi che si legano agli anticorpi e che, probabilmente, inducono la formazione di aggregati e la sedimentazione dei liposomi nel reagente preparato. Abbiamo sviluppato un test automatico ed omogeneo per la determinazione dell'attività complementare totale nel siero umano a base di liposomi. A questo scopo abbiamo utilizzato una popolazione omogenea di liposomi (200 nm) che ha mostrato una distribuzione stabile, e abbiamo inglobato l'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH, EC 1.1.1.49) (il pH ottimale del G6PDH è situato nel campo neutro rispetto alla fosfatasi alcalina). Questi liposomi ci hanno consentito di sviluppare un sistema di test automatico per la determinazione dell'attività complementare totale.<sup>7</sup>

#### Principio del test

Se il campione del paziente viene mescolato con i liposomi ed il substrato, gli anticorpi dal reagente si uniscono al gruppo dinitrofenile dei liposomi, e questo complesso antigene/anticorpo attiva i componenti complementari nel campione. I componenti complementari attivati rompono la membrana dei liposomi e liberano l'enzima G6PDH che reagisce con il NAD (nicotinamide adenindinucleotide) e il glucosio-6-fosfato (G6P) della sostanza reagente. In questa reazione enzimatica il NAD viene ridotto a NADH (forma ridotta di nicotinamide adenindinucleotide) che provoca un incremento dell'assorbimento a 340 nm. Questo incremento dell'assorbimento è proporzionale all'attività del complemento nel campione.

#### Reazioni

##### Reazione enzimatica



#### Preparazione del reagente

##### Reagente 1: (R1)

I liposomi (R1) vengono forniti pronti per l'uso. Questa soluzione è inalterabile fino alla data di scadenza indicata.

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

Per la preparazione della soluzione di substrato ricostituire un flacone (per 20 mL) del substrato (R2) con un flacone (20 mL) del diluente (R2a). La soluzione di substrato si conserva 40 giorni ad una temperatura di 2-10 °C.

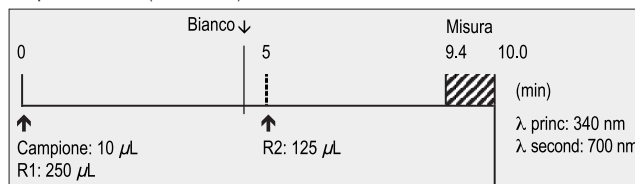
#### Reagenti

##### Contenuto e condizioni di stoccaggio

<b>R1:</b>	Liposomi	2 flaconi x 20 mL	Conservare a 2-10 °C (Non congelare)
<b>R2:</b>	Substrato	1 flacone x per 20 mL	Conservare a 2-10 °C
<b>R2a:</b>	Diluent	1 flacone x 20 mL	Conservare a 2-10 °C
<b>R1:</b>	Liposomi	Contiene G6PDH	4 unità/mL
<b>R2:</b>	Substrato	Contiene anticorpi anti-DNP, (capra)	24 mmol/L G6P 9 mmol/L NAD
<b>R2a:</b>	Diluyente	Contiene tampone maleato pH 5,0	5 mmol/L

#### Metodo standard

Temperatura: 37 °C (Hitachi® 717)



Questa è la procedura standard. Diverse applicazioni per gli apparecchi sono disponibili su richiesta.

#### Avvertenze e precauzioni

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- L'uso e l'applicazione di questo test è riservata esclusivamente a personale specializzato in possesso di formazione specifica. Far riferimento alle norme ed alle leggi vigenti a livello nazionale e locale.
- Non può essere usato *in vivo* sull'uomo o su animali.
- Per l'uso delle apparecchiature si prega di seguire il manuale operativo del costruttore in condizioni appropriate.
- Non mescolare i reagenti con numeri di lotto diversi.
- Utilizzare i contenitori e i materiali solo allo scopo descritto per questa procedura.
- Questa analisi non dovrà costituire l'unico fattore determinante per la definizione di una diagnosi clinica.
- Conservare i reagenti alle condizioni indicate. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sulle etichette di ogni flacone di reagente.
- Si sconsiglia la conservazione prolungata dei reagenti aperti. Dopo l'apertura, richiuderli bene e conservarli alla temperatura indicata.
- In ogni caso, dato che nessun metodo, può offrire una completa sicurezza in merito all'assenza di agenti infettivi, questi prodotti dovrebbero essere trattati seguendo le medesime precauzioni di sicurezza cui bisogna attenersi quando si trattano altri materiali potenzialmente infettanti.
- Se i reagenti vengono a contatto con la bocca, gli occhi o la pelle, lavare via immediatamente con acqua abbondante. Rivolgersi ad un medico se necessario.
- Per lo smaltimento dei reagenti, attenersi alla normativa regionale e nazionale.

#### Ulteriori dati (R1,R2a)

EUH208 Contiene miscela di: 5-cloro-2-metil-2 H-isotiazol-3-one; 2-metil-2H-isotiazol-3-one. Può provocare una reazione allergica.

#### Indizi fisici e chimici di instabilità

La presenza di precipitati nei reagenti oppure il rilevamento nei sieri di controllo di valori esterni al campo indicato dal produttore può segnalare un'instabilità dei reagenti.

#### Dispositivi

I reagenti sono previsti per l'uso nei dispositivi comuni di analisi automatica. Per le regolazioni e le specifiche del dispositivo fare riferimento al relativo manuale tecnico. Gli standard di prestazioni su dispositivi alternativi devono essere stabiliti dall'utente finale.

#### Prelievo e conservazione dei campioni

##### Utilizzare il siero come campione.

Si consiglia di determinare l'attività complementare del campione immediatamente dopo la separazione del siero. In caso di necessità è possibile immagazzinare i campioni a -70 °C o ad una temperatura inferiore. L'acido ascorbico, la bilirubina, l'emoglobina e l'intorbidamento causato da lipidi non influenzano significativamente la misurazione. (vedi Prestazioni).

#### Materiali forniti

Vedi sezione con il titolo „Reagenti“.

#### Materiali necessari ma non contenuti nella fornitura normale

Dispositivo di analisi automatica  
Calibratore CH50 (n. ordinazione: 997-43801)  
Materiale per il controllo della qualità (n. ordinazione: 991-43701)

#### Risultati

I risultati finali vengono calcolati automaticamente e indicati in concentrazioni.

#### Calibratura

Il test CH50 crea una curva di calibratura con indicazione dell'assorbimento rispetto alla concentrazione. Si consiglia di eseguire almeno una calibratura alla settimana.

#### Controllo della qualità

Si raccomanda a tutti i laboratori clinici di eseguire il controllo della qualità. Si consiglia l'esame di sieri di controllo con coefficienti di valori all'interno e all'esterno del campo normale per ogni test in modo da controllare la prestazione del test stesso. I valori ottenuti per i controlli devono rientrare nei campi indicati dal produttore. In caso di rilevamento di valori di materiale di controllo non ancora testato, il laboratorio deve innanzitutto eseguire un numero sufficiente di definizioni per ogni coefficiente di valori dei campioni di controllo per determinare i valori nominali della media e del campo di controllo.

### Saggio immunoliposomico *in vitro*

Per la determinazione dell'attività Complementare Totale nel Siero umano



#### Limiti del metodo

- a) L'intervallo di misura dell'Autokit Wako CH50 è 10-60 U/mL.  
b) Se i campioni sono diluiti, i risultati del test potrebbero non essere accurati.

#### Campo di riferimento

Siero: 31,6-57,6 U/mL.<sup>8</sup>

L'intervallo di riferimento è stato calcolato in base ad una distribuzione normale dei valori. Su un totale di 880 soggetti ne sono stati selezionati 243 che presentano valori compresi negli intervalli di riferimento in relazione a 12 parametri biochimici. Questo studio è stato effettuato in Giappone. (Dati interni).

Siccome i valori di riferimento sono influenzati da età, sesso, alimentazione, ambiente locale e altri fattori, ogni laboratorio dovrebbe determinare i propri valori di riferimento per questo metodo.

#### Sostanze interferenti

L'acido ascorbico fino ad una concentrazione di 50 mg/dL, l'emoglobina fino ad una concentrazione di 500 mg/dL e la bilirubina fino ad una concentrazione di 40 mg/dL non hanno alcun influsso significativo sul test Autokit CH50.

#### Prestazioni

##### Esattezza (WAKO-30R)

N.	Valore di riferimento (U/mL)	Valore misurato (U/mL)	Rintracciabilità (%)
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

##### Precisione (WAKO-30R)

###### Precisione nella serie

Esec. #	Campione #	Replicati	VM (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

###### Precisione complessiva

Camp di concentrazione	# giorni de test	VM (U/mL)	SD	CV (%)	S <sub>w</sub>	S <sub>r</sub>
basso	21	26,9	1,54	5,7	16,6	16,7
alto	21	48,3	1,57	3,2	18,9	22,1

I dati sono stati rilevati conformemente alle direttive NCCLS.

**Sensibilità:** Il limite di riscontro del test CH50 è stato rilevato a 10 U/mL.

##### Specificità (WAKO-30R)

###### Esame di accrescimento

Acido ascorbico (mg/dL)	nessuno	10	20	30	40	50
CH50 (U/mL)	36,0	36,0	36,0	35,0	35,5	35,5
Bilirubina (mg/dL)	nessuno	8	16	24	32	40
CH50 (U/mL)	35,0	36,0	36,0	36,0	37,0	37,0
Emoglobina (mg/dL)	nessuno	100	200	300	400	500
CH50 (U/mL)	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	39,5

#### Letteratura

- 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.

#### Presentaciones

N. ordinazione	Prodotto	Conditionnement
995-40801	Autokit CH50	R1: 2 x 20 mL R2: 1 x per 20 mL R2a: 1 x 20 mL
995-40802	Autokit CH50 Small	R1: 1 x 20 mL R2: 1 x per 11 mL R2a: 1 x 11 mL
997-43801	CH50 Calibrator	CAL: 5 conc. x per 0,5 mL
991-43701	Complement Control	H: 10 x per 0,5 mL (alto) L: 10 x per 0,5 mL (basso)