

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.¹ Até ao momento, o ensaio mais utilizado para o complemento total é baseado na hemólise através de complemento de eritrócitos ricos em anticorpos.² 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.³

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.^{4,5}

Anteriormente tinha-se descrito um ensaio homogéneo para a actividade total do complemento baseado na imunólise dos liposomas.⁶ O grau de lise era determinado através 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. 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.⁷

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 antígenoanticorpo 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 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



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.

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 mistura de: 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)	5 mmol/l

Este kit (R2a) contém componentes classificados da seguinte forma:

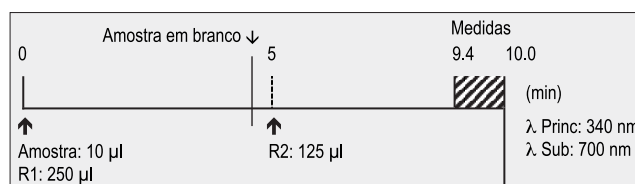
Classificação em conformidade com o Regulamento (CE) nº 1272/2008



- **Palavra-sinal Atenção**
- **Componentes determinantes para os perigos constantes do rótulo:**
Mistura de: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazole-3-ona [N. CE 247-500-7] and 2-metil-2H-isotiazole-3-ona [N. CE 220-239-6] (3:1).
- **Frases de perigo**
Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
- **Frases de prudência**
Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.
Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
Lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar.
SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes.
Tratamento específico (ver no presente rótulo).
Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com a legislação local/regional/nacional/internacional.

Procedimento padrão

Temperatura: 37° C (Hitachi® 717)



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 controle 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

Analizador automatizado

Calibrador CH50 (Código Nº 997-43801)

Controlo de Complemento (Código Nº 991-43701)

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.
- Os resultados do ensaio podem não ser exatos se se diluírem as amostras.

Valores esperados

Soro: 31,6-57,6 U/ml.⁸

Os valores esperados são calculados por uma distribuição de valor normal. 243 pessoas, mostrando os resultados de ensaio dentro dos valores esperados em 12 parâmetros bioquímicos, foram seleccionadas entre 880 pessoas. Estes dados foram realizados no Japão. (Dados internos).

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

Interferências

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

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)

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

Nível deconcentração	# dias de ensaio	Média (U/ml)	SD	CV (%)	S _w	S _t
baixo	21	26,9	1,54	5,7	16,6	16,7
alto	21	48,3	1,57	3,2	18,9	22,1

Os dados foram recolhidos de acordo com as directivas NCCLS.

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

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

Hemoglobina (mg/dl)	None	100	200	300	400	500
CH50 (U/ml)	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	39,5

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

Apresentação

Código	Produto	Apresentação
995-40801	Autokit CH50	R1: 2 x 20 ml R2: 1 x para 20 ml R2a: 1 x 20 ml
995-40802	Autokit CH50 Small	R1: 1 x 20 ml R2: 1 x para 11 ml R2a: 1 x 11 ml
997-43801	CH50 Calibrator	CAL: 5 Conc. x para 0,5 ml
991-43701	Complement Control	H: 10 x para 0,5 ml (alto) L: 10 x para 0,5 ml (baixo)