

#### Eigenschaften

Der Autokit CH50-Test ist ein automatisierter *in vitro*-Liposomen-Immunoassay (LIA) zur quantitativen Bestimmung der Komplement-Gesamtaktivität (CH50) im Humanserum.

#### Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Das Komplementsystem, das aus etwa 20 Plasmaproteinen besteht, spielt bei der Immunabwehr des Körpers eine wichtige Rolle. Die Komplementaktivität im Humanserum kann daher für die Diagnose vieler Erkrankungen wichtige Informationen liefern. Klinisch betrachtet fungiert die Komplementaktivität als direkter Indikator von Komplementsystemabnormalitäten und unterscheidet sich von den immunreaktiven Komponenten des Systems.<sup>1</sup> Die Komplementaktivität wurde mit der aktiven Phase von Systemischem Lupus Erythematoses (SLE), Rheumatischer Arthritis, Kryoglobulinämie-Vaskulitis, einigen Formen von Nephritis und angeborenen Störungen des Komplementsystems korreliert. Bislang basierte die Bestimmung der Komplement-Gesamtaktivität in der Regel auf der Komplement-vermittelten Hämolyse von Erythrozyten, die mit Antikörpern sensibilisiert worden waren.<sup>2</sup> Bei dieser Methode sind aber geeignete Serumverdünnungen für die Messung des Lysegrads der Indikatorzellen erforderlich, weshalb eine einfachere Methode ohne Serumverdünnungen entwickelt wurde.<sup>3</sup> Beide Methoden sind jedoch kompliziert und zeitaufwendig, und die Reagenzien aufgrund der Verwendung von Erythrozyten nicht haltbar. Außerdem ist es schwierig, einen hämolytischen Komplementtest zu automatisieren, da die Verteilung der Erythrozyten instabil ist.

Liposomen bestehen aus konzentrischen Schalen von Lipidbilayern, die durch wässrige Phasen getrennt sind, und wurden in Bezug auf die Komplement-vermittelte Immunschädigung von Zellmembranen intensiv untersucht.<sup>4,5</sup>

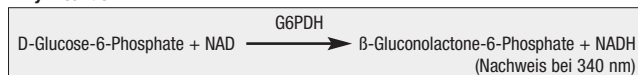
Ein homogener Test zur Bestimmung der Komplement-Gesamtaktivität, beruhend auf der Immunolyse von Liposomen, wurde bereits publiziert.<sup>6</sup> Das Ausmaß der Lyse der Liposomen wird anhand der Aktivität der eingeschlossenen Alkalischen Phosphatase ermittelt; das Verfahren erfolgt manuell und lässt sich nicht auf Analyseautomaten durchführen. Diese Methode erfordert die Zugabe vieler Reagenzien in die Reaktionsgefäße, eine lange Reaktionszeit und den Einsatz Antikörper-bindender Liposomen, die wahrscheinlich die Aggregatbildung und Sedimentation der Liposomen in dem vorbereiteten Reagenz induzieren. Wir haben einen automatischen homogenen Test zur Bestimmung der Komplement-Gesamtaktivität in Humanserum auf Liposomenbasis entwickelt. Dafür verwendeten wir eine homogene Population kleiner Liposomen (200 nm), die eine stabile Verteilung zeigte, und schlossen darin das Enzym Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) ein (das pH-Optimum der G6PDH liegt im Vergleich zur Alkalischen Phosphatase im neutralen pH-Bereich). Mit diesen Liposomen gelang uns die Entwicklung eines vollautomatischen Testsystems zur Bestimmung der Komplement-Gesamtaktivität.<sup>7</sup>

#### Testprinzip

Wird eine Patientenprobe mit den Liposomen und dem Substrat gemischt, binden die Antikörper aus dem Reagenz an die Dinitrophenylgruppe auf den Liposomen, und durch diesen Antigen/Antikörper-Komplex werden die Komplementkomponenten in der Probe aktiviert. Die aktivierten Komplementkomponenten brechen die Membran des Liposoms auf und setzen das Enzym G6PDH frei, das nun mit dem NAD und dem Glucose-6-Phosphat (G6P) des Reagenzes reagiert. Bei dieser enzymatischen Reaktion wird NAD zu NADH reduziert, was zu einem Absorptionsanstieg bei 340 nm führt. Dieser Absorptionsanstieg ist proportional zur Komplementaktivität in der Probe.

#### Reaktionen

##### Enzymreaktion



#### Reagenz-Vorbereitung

##### Reagenz 1: (R1)

Die Liposome (R1) werden gebrauchsfertig geliefert. Diese Lösung ist bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

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

Zur Vorbereitung der Substratlösung eine Flasche (für 20 ml) des Substrats (R2) mit einer Flasche (20 ml) des Diluents (R2a) rekonstituieren. Die Substratlösung ist bei 2–10 °C 40 Tage haltbar.

#### Reagenzien

##### Inhalt und Lagerungsbedingungen

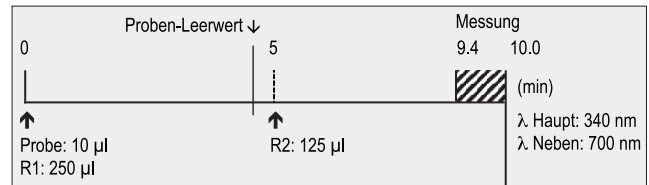
<b>R1:</b>	Liposomen	bei 2–10 °C lagern (Nicht einfrieren)
<b>R2:</b>	Substrat	bei 2–10 °C lagern
<b>R2a:</b>	Diluent	bei 2–10 °C lagern

##### Bestandteile

<b>R1:</b>	Liposomen	Enthält G6PDH	4 U/ml
<b>R2:</b>	Substrat	Enthält Anti-DNP-Antikörper (Ziege)	24 mmol/l G6P 9 mmol/l NAD
<b>R2a:</b>	Diluent	Enthält Maleatpuffer, pH 5,0	5 mmol/l

#### Standard-Verfahren

Temperatur: 37 °C (Hitachi® 717)



Das oben angegebene Testverfahren ist nur ein Beispiel. Diverse Geräteapplikationen sind auf Anfrage erhältlich.

#### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für *in vitro* Anwendungen.
- Die Anwendung dieses Tests ist ausschließlich ausgebildetem Fachpersonal vorbehalten. Es gelten die einschlägigen nationalen und regionalen Vorschriften und Gesetze.
- Nicht zur *in vivo* Anwendung bei Menschen und Tieren.
- Bei der Gerätebedienung bitte das Benutzerhandbuch des Herstellers beachten!
- Die Reagenzien zweier verschiedener Chargen dürfen nicht miteinander vermischt werden.
- Die Behälter und andere Materialien nur für den beschriebenen Testzweck verwenden.
- Die Erstellung einer klinischen Diagnose darf nur auf Grundlage der klinischen Symptomatik in Verbindung mit weiteren Testergebnissen durch einen Arzt erfolgen.
- Lagerung der Reagenzien unter den angegebenen Bedingungen. Reagenzien nach dem, auf der Packung angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Eine längere Aufbewahrung der angebrochenen Reagenzien wird nicht empfohlen. Nach dem Anbruch bitte wieder gut verschließen und unter den angegebenen Lagerbedingungen aufbewahren.
- Die Probematerialien müssen als potentiell infektiös behandelt werden. Der Umgang mit solchem Material sollte in Übereinstimmung mit den Leitlinien guter Laborpraxis und in einer Weise erfolgen, die den geltenden nationalen und internationalen Bestimmungen entspricht.
- Nicht an Mund, Augen, oder Haut bringen! Bei Kontakt mit der Haut oder den Augen umgehend mit viel Wasser spülen. Wenn eine Hautreizung auftritt, einen Arzt hinzuziehen.
- Bei der Entsorgung der Reagenzien sind die regionalen oder nationalen Vorschriften zu beachten.

#### Zusätzliche Angaben (R1, R2a)

EUH208 Enthält Maleinsäure, Gemisch aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

#### Physikalische und chemische Anzeichen von Instabilität

Befinden sich Präzipitate in den Reagenzien oder liefern die Kontrollseren Werte, die außerhalb des vom Hersteller angegebenen Bereichs liegen, kann dies ein Hinweis auf Reagenzinstabilität sein.

#### Geräte

Die Reagenzien sind zum Einsatz auf handelsüblichen Analyseautomaten. Die Geräteeinrichtungen und Spezifikationen sind dem entsprechenden Bedienungshandbuch zu entnehmen. Leistungsstandards auf Alternativgeräten müssen vom Endanwender etabliert werden.

#### Probengewinnung und -aufbewahrung

##### Serum als Probe verwenden.

Es wird empfohlen, die Komplementaktivität der Probe unmittelbar nach der Abtrennung des Serums zu bestimmen. Bei Bedarf können die Proben bei -70 °C oder niedriger gelagert werden. Ascorbinsäure, Bilirubin, Hämoglobin und durch Lipid bedingte Trübung haben keinen signifikanten Einfluss auf die Messung.

#### Gelieferte Materialien

Siehe Abschnitt mit der Überschrift „Reagenzien“.

#### Benötigte, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Analysegerät Automat

CH50-Kalibrator (Bestell-Nr.: 997-43801)

Qualitätskontrollmaterial (Bestell-Nr.: 991-43701)

#### Ergebnisse

Die Endergebnisse werden automatisch berechnet und in Konzentrationen angegeben.

#### Kalibrierung

Der CH50-Test erzeugt eine Kalibrierungskurve, bei der die Absorption gegen die Konzentration aufgetragen wird. Es wird empfohlen, mindestens eine Kalibrierung pro Woche durchzuführen.

#### Qualitätskontrolle

Eine Qualitätskontrollroutine wird allen klinischen Laboratorien empfohlen. Die Untersuchung von Kontrollseren mit Wertlagen sowohl innerhalb als auch außerhalb des Normbereichs wird für jeden Test zur Kontrolle der Leistung des Tests empfohlen. Die für die Kontrollen erzielten Werte müssen in die vom Hersteller angegebenen Bereiche fallen. Falls Werte für noch nicht getestetes Kontrollmaterial ermittelt werden müssen, soll das Labor vorab für jede Wertlage der Kontrollproben eine ausreichende Anzahl Bestimmungen ausführen, um Sollwerte für Mittelwert und Kontrollbereich zu ermitteln.

#### Grenzen des Verfahrens

- Der Messbereich vom Wako Autokit CH50 liegt bei 10–60 U/ml.
- Die Richtigkeit der Ergebnisse könnte durch eine Probenverdünnung beeinträchtigt werden.

#### Referenzbereich

Serum: 31,6–57,6 U/ml.<sup>8</sup>

Diese Daten sind auf der Grundlage einer Normalverteilung berechnet worden. Von 880 Teilnehmern wurden in Japan 243 Personen zur Berechnung der CH50 Normalwerte ausgewählt, die in weiteren 12 biochemischen Parametern ebenfalls Ergebnisse im Normalbereich aufwiesen.

Diese Daten liegen als interne Datenerhebung aus Japan vor. (Interne Daten) Da die Referenzwerte durch Alter, Geschlecht, Ernährung, lokales Umfeld und weitere Faktoren beeinflusst werden, sollte jedes Laboratorium seine eigenen Referenzwerte für diese Methode ermitteln.

#### Interferenzen

Ascorbinsäure hat bis zu einer Konzentration von 50 mg/dl, Hämoglobin bis zu einer Konzentration von 500 mg/dl und Bilirubin bis zu Konzentration von 40 mg/dl keinen signifikanten Einfluss auf den Autokit CH50-Test.

#### Leistungsmerkmale

##### Richtigkeit (WAKO-30R)

Nr.	Referenzwert (U/ml)	Messwert (U/ml)	Wiederfindung (%)
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

##### Präzision (WAKO-30R)

###### Präzision in der Serie

Lauf #	Probe #	Replikate	MW (U/ml)	SD	VK (%)
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

###### Gesamtpräzision

Konzentrationsbereich	# der Testtage	MW (U/ml)	SD	VK (%)	S <sub>w</sub>	S <sub>t</sub>
niedrig	21	26,9	1,54	5,7	16,6	16,7
hoch	21	48,3	1,57	3,2	18,9	22,1

Die Daten wurden gemäß den NCCLS-Richtlinien erhoben.

**Sensitivität:** Die Nachweisgrenze des CH50 Tests wurde zu 10 U/ml ermittelt.

##### Spezifität (WAKO-30R)

###### Aufstockungsuntersuchung

Ascorbinsäure (mg/dl)	keine	10	20	30	40	50
CH50 (U/ml)	36,0	36,0	36,0	35,0	35,5	35,5

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

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

#### Literatur

- 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.

#### Bestellinformation

Best.-Nr.	Produkt	Packung
995-40801	Autokit CH50	R1: 2 x 20 ml R2: 1 x für 20 ml R2a: 1 x 20 ml
995-40802	Autokit CH50 Small	R1: 1 x 20 ml R2: 1 x für 11 ml R2a: 1 x 11 ml
997-43801	CH50 Calibrator	CAL: 5 Konz. x für 0,5 ml
991-43701	Complement Control	H: 10 x für 0,5 ml (hoch) L: 10 x für 0,5 ml (niedrig)