

## Sada pro automatické testování CH50/Sada pro automatické testování CH50 (malá)

Lipozomální imunoanalýza *in vitro*

Pro kvantitativní stanovení celkové aktivity komplementu v lidském séru

HP 995-40801  
0324D1

## Zamýšlené použití

Test Wako Autokit CH50 je lipozomální imunoanalýza (LIA) *in vitro* pro kvantitativní stanovení celkové aktivity komplementu (CH50) v lidském séru pomocí automatizovaného postupu.

## Shrnující vysvětlení testu

Komplementová kaskáda, skládající se z ~20 sérových proteinů, hraje důležitou roli v imunitním obranném systému těla. Komplementová aktivita v lidských sérech může poskytnout důležité informace při diagnostice mnoha onemocnění. Z klinického hlediska je komplementová aktivita přímým indikátorem abnormalit komplementového systému a liší se od imunoreaktivních složek systému. Výskyt komplementové aktivity byl korelována s aktivním stádiem systémového lupus erythematos, revmatoidní artritidy, kryoglobulinemické vaskulitidy, některými formami nefritidy a dědičnými deficity komplementového systému.<sup>1</sup> Dříve byl nejběžněji používaný test pro celkovou aktivitu komplementu založen na komplementu – zprostředkovaná hemolýza erytrocytů senzibilizovaných protilátkami.<sup>2</sup> Při této metodě jsou k měření lýzy indikátorových buněk nezbytná vhodná ředění séra. Byla vyvinuta jednodušší metoda, která nevyžaduje ředění séra.<sup>3</sup>

Obě metody jsou však složité a časově náročné a reagenty nejsou stabilní z důvodu použití erytrocytů. Navíc je obtížné automatizovat hemolytický test komplementu z důvodů nestabilní povahy disperze erytrocytů.

Lipozomy, sestávající z soustředných obalů lipidových dvojitých vrstev oddělených vodnými mezifázovými, byly široce používány ke studiu komplementem zprostředkovaného imunitního poškození buněčných membrán.<sup>4,5</sup> Již dříve byl popsán homogenní test pro celkovou komplementovou aktivitu založený na imunitní lýze lipozomů.<sup>6</sup> Stupeň lýzy lipozomů se určuje ze zachycené aktivity alkalické fosfatázy a postup, který se provádí ručně, nelze aplikovat na automatizované laboratorní analyzátoři.

Tato metoda vyžaduje přidání mnoha reagentů do reakčních maziv, dlouhý reakční čas a použití protilátek vázajících lipozomy, které by mohly vyvolat agregaci a sedimentaci lipozomů v připravené reagentce.

Vyvinuli jsme automatizovaný homogenní test na bázi lipozomů pro celkovou komplementovou aktivitu v lidském séru. Použili jsme homogenní populaci lipozomů o malé velikosti (200 nm), která poskytla stabilní disperzi, a glukózo-6-fosfátdehydrogenázu (G6PDH, EC 1.1.1.49) jako zachycený enzym (optimální pH G6PDH je neutrální ve srovnání s alkalickou fosfatázou). Pomocí těchto lipozomů jsme vyvinuli plně automatizovaný testovací systém pro celkovou komplementovou aktivitu.<sup>7</sup>

## Princip metody

Když je vzorek smíchan s lipozomem a substrátem, protilátky v reagentce se spojí s dinitrofenylem (DNP) na liposomech a následně jsou komplexy ve vzorku aktivovány komplexem antigen-protilátka. Aktivované komplexy naruší membránu lipozomu. Enzym, G6PDH, obsažený v lipozomu, reaguje s NAD a glukózo-6-fosfátem (G6P) v reagentce. Během této enzymatické reakce se NAD redukuje na NADH. V důsledku této redukce se zvyšuje absorpance při 340 nm. Nárůst absorpance je úměrný komplementové aktivitě ve vzorku.

## Reakce

## Enzymová reakce



## Příprava reagentce

## Reagentce 1: (R1)

Použijte liposom (R1) tak, jak je dodán. Tento roztok je stabilní až do data expirace.

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

Rekonstituujte jednu lahvičku (na 20 ml) substrátu (R2) jednou lahvičkou (20 ml) ředidla (R2a), abyste připravili roztok substrátu. Substrátový roztok je stabilní po dobu 40 dní při 2-10 °C.

## Reagentce

## Obsah a podmínky skladování

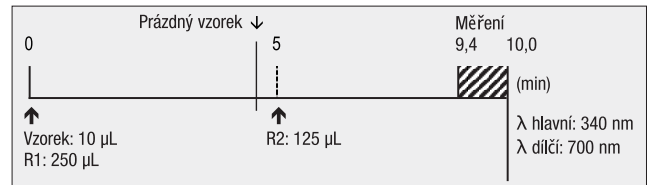
R1:	Liposom	Skladujte při 2-10 °C (nezmrazovat)
R2:	Substrát	Skladujte při 2-10 °C
R2a:	Ředidlo	Skladujte při 2-10 °C

## Ingredience

R1:	Liposom	Obsahuje liposom G6PDH	4 U/ml
R2:	Substrát	Obsahuje anti-DNP protilátka, kozi	24 mmol/l G6P 9 mmol/l NAD
R2a:	Ředidlo	Obsahuje maleátový pufr, pH 5,0	5 mmol/l

## Standardní postup

Teplota: 37 °C (Hitachi® 717)



Výše uvedený standardní postup slouží jako příklad. Aplikace s přístroji jsou k dispozici na vyžádání.

## Varování a bezpečnostní opatření

- Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Použití a aplikace tohoto testu je vyhrazena pouze pro profesionální použití. Dodržujte příslušné národní a místní předpisy a legislativu.
- Nesmí se používat vnitřně u lidí a zvířat.
- Přístroje obsluhujte podle pokynů návodu k obsluze a za vhodných podmínek.
- Nemíchejte reagentce z jedné testovací jednotky s reagentciemi z jiné testovací jednotky, která má jiné číslo šarže.
- Nádoby a jiné materiály v balení nepoužívejte k jiným účelům, než jaké jsou zde popsány.
- Klinická diagnóza musí být stanovena s klinickými příznaky a dalšími výsledky testů lékařem.
- Reagentce skladujte za určených podmínek. Nepoužívejte reagentce po datu expirace uvedeném na štítku každé nádoby s reagentciemi.
- Po otevření reagentcí je doporučeno okamžitě je použít. Při skladování otevřených reagentcí uzavřete lahvičky a uchovávejte je za specifikovaných podmínek.
- Vzhledem k tomu, že všechny vzorky jsou potenciálně infekční, mělo by se s nimi zacházet s náležitou opatrností. Pro zabránění přenosu infekce se řiďte příslušnými protokoly správné laboratorní praxe a zacházejte se vzorky v souladu s jakýmkoli dalšími místními nebo národními předpisy týkajícími se bezpečného zacházení s takovými materiály.
- Pokud se reagentce dostanou do kontaktu s ústy, očima nebo kůží, okamžitě je promyjte velkým množstvím vody. V případě potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
- Při likvidaci reagentcí postupujte v souladu s místními nebo národními předpisy.

## Dodatečné informace (R1, R2a)

EUH208 obsahuje směs 5-chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu. Může vyvolat alergickou reakci.

## Fyzikální nebo chemické příznaky nestability

Přítomnost precipitátů v reagentcích nebo hodnoty kontrolních sér mimo přijatelné rozmezí výrobce může být známkou nestability reagentcí.

## Přístroje

Reagentce je navržena pro použití v komerčně dostupných automatických analyzátořích. Popis provozu přístroje a příslušné specifikace naleznete v návodu k obsluze. Výkonové normy pro alternativní přístrojové vybavení musí stanovit koncový uživatel.

## Sběr a konzervace vzorků

## Jako vzorek použijte sérum

Je doporučeno měřit komplementovou aktivitu ve vzorku ihned po separaci séra. V případě potřeby skladujte vzorky při teplotě -70 °C nebo nižší. Kyselina askorbová, bilirubin, hemoglobin a lipemický zákal nemají na hodnoty měření významný vliv.

## Dodávané materiály

Viz část s názvem „Reagentce“.

## Potřebný, ale nedodávaný materiál

- Automatizovaný analyzátor
- Kalibrátor CH50 (kód č.: 997-43801)
- Kontrola komplementu (kód č.: 991-43701)

## Výsledky

Konečné výsledky jsou automaticky vypočítány a vytištěny v koncentraci.

## Kalibrace

Test CH50 vytváří kalibrační křivku vnesením závislosti absorpance na koncentraci. Kalibraci se doporučuje provádět alespoň jednou týdně.

## Kontrola kvality

Program kontroly kvality se doporučuje pro všechny klinické laboratoře. Při monitorování výkonu postupu se doporučuje provedení analýzy kontrolního materiálu v normálním i abnormálním rozsahu u každého testu. Získané hodnoty pro kontroly by měly spadat do přijatelných rozsahů určených výrobcem. Pokud mají být stanoveny hodnoty pro neanalyzovaný kontrolní materiál, laborať by měla testovat každou hladinu kontrolního materiálu tolikrát, aby byla schopna určit platný průměr a přijatelné rozmezí.

## Sada pro automatické testování CH50/Sada pro automatické testování CH50 (malá)

Lipozomální imunoanalýza *in vitro*

Pro kvantitativní stanovení celkové aktivity komplementu v lidském séru

**Omezení postupu**

- a) Měřitelný rozsah Sady pro automatické testování Wako CH50 činí 10-60 U/ml.  
b) Výsledky testu nemusí být přesné, pokud jsou vzorky naředěny.

**Očekávané hodnoty**Sérum: 31,6–57,6 U/ml.<sup>8</sup>

Očekávané hodnoty jsou vypočteny běžným rozdělením hodnot. Z 880 osob bylo vybráno 243 osob, které vykazovaly výsledky testu v rámci očekávaných hodnot ve 12 biochemických parametrech. Tyto údaje byly získány v Japonsku. (Interní údaje).

Jelikož očekávané hodnoty jsou ovlivněny věkem, pohlavím, stravou, geografickou polohou a dalšími faktory, měla by si každá laboratoř stanovit vlastní očekávané hodnoty pro tento postup.

**Interferující látky**

Koncentrace kyseliny askorbové do 50 mg/dl, koncentrace hemoglobinu do 500 mg/dl a koncentrace bilirubinu do 40 mg/dl nemají na test prováděný Sadou pro automatické testování CH50 významný vliv.

**Výkonové charakteristiky****Přesnost (WAKO-30R)**

Č.	Očekávaná hodnota (U/ml)	Pozorovaná hodnota (U/ml)	Obnovitelnost (%)
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

**Přesnost (WAKO-30R)****Přesnost v rámci cyklu**

Č. cyklu	Č. vzorku	Replikáty	Průměr (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

**Celková přesnost**

Hladina koncentrace	Počet dní testu	Průměr (U/ml)	SD	CV (%)	S <sub>w</sub>	S <sub>t</sub>
nízká	21	26,9	1,54	5,7	16,6	16,7
vysoká	21	48,3	1,57	3,2	18,9	22,1

Údaje byly shromážděny podle pokynů orgánu NCCLS.

**Čitlivost:** Minimální detekovatelná hladina CH50 se odhaduje na 10 U/ml.

**Specifická (WAKO-30R)****Přídavná studie**

Kyselina askorbová (mg/dl)	–	10	20	30	40	50
CH50 (U/ml)	36,0	36,0	36,0	35,0	35,5	35,5
Bilirubin (mg/dl)	–	8	16	24	32	40
CH50 (U/ml)	35,0	36,0	36,0	36,0	37,0	37,0
Hämoglobin (mg/dl)	–	100	200	300	400	500
CH50 (U/ml)	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	39,5

**Reference**

- 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.

**Informace k objednávkě**

Číslo kódu	Výrobek	Balení
995-40801	Sada pro automatické testování CH50	R1: 2 x 20 ml R2: 1 x pro 20 ml R2a: 1 x 20 ml
995-40802	Sada pro automatické testování CH50 (malá)	R1: 1 x 20 ml R2: 1 x pro 11 ml R2a: 1 x 11 ml
997-43801	Kalibrátor CH50	KAL: 5 konc. x pro 0,5 ml
991-43701	Kontrola komplementu	V: 10 x pro 0,5 ml (vys.) L: 10 x pro 0,5 ml (nizk.)

Výrobce:

**FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH**

Fuggerstr. 12 · 41468 Neuss · Germany

Telephone: +49 2131 311 272 · Fax: +49 2131 311 110

diagnostics\_wkeu@fujifilm.com · www.wako-chemicals.de

**Wako**