

Προβλεπόμενη χρήση

Η δοκιμασία Wako Autokit CH50 είναι Ανοσοδοκιμασία λιποσωμάτων (LIA) *in vitro* Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής δραστηριότητας του συμπληρώματος (CH50) στον ανθρώπινο ορό με αυτοματοποιημένη διαδικασία.

Περίληψη και εξήγηση της δοκιμασίας

Ο καταρράκτης του συμπληρώματος, που αποτελείται από ~ 20 πρωτεΐνες ορού, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσολογικό αμυντικό σύστημα του οργανισμού. Η δραστηριότητα του συμπληρώματος στους ανθρώπινους ορούς μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη διάγνωση πολλών ασθενειών. Κλινικά, η δραστηριότητα του συμπληρώματος αποτελεί άμεσο δείκτη των ανωμαλιών του συστήματος συμπληρώματος και διαφέρει από τα ανοσοδραστικά συστατικά του συστήματος. Η δραστηριότητα του συμπληρώματος έχει συσχετιστεί με το ενεργό στάδιο του συστηματικού ερυθματώδους λύκου, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της κρουσφαιριναιμίας-αγγειίτιδας, ορισμένων μορφών νεφρίτιδας και των κληρονομικών ανεπαρκειών του συστήματος του συμπληρώματος.¹ Πολυπλοκότερα, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη δοκιμασία για τη συνολική δραστηριότητα του συμπληρώματος βασίζεται στην αιμόλυση με τη μεσολάβηση του συμπληρώματος των ευαισθητοποιημένων σε αντισώματα ερυθροκυττάρων.² Στη μέθοδο αυτή, απαιτούνται κατάλληλες αραιώσεις ορού για τη μέτρηση της λύσης των κυττάρων-δεικτών. Έχει αναπτυχθεί μια απλούστερη μέθοδος, η οποία δεν απαιτεί αραιώσεις ορού.³

Ωστόσο, και οι δύο μέθοδοι είναι περίπλοκες και χρονοβόρες και τα αντιδραστήρια δεν είναι σταθερά λόγω της χρήσης ερυθροκυττάρων. Επιπλέον, είναι δύσκολο να αυτοματοποιηθεί μια δοκιμασία αιμολυτικού συμπληρώματος λόγω της ασταθούς φύσης της διασποράς των ερυθροκυττάρων.

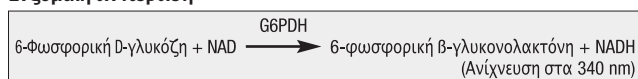
Τα λιποσώματα, τα οποία αποτελούνται από ομόκεντρα κελύφη λιπιδίων διπλοστοιβάδων που διαχωρίζονται από υδατικά διάκενα, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη μελέτη της ανοσολογικής βλάβης των κυτταρικών μεμβρανών με τη μεσολάβηση του συμπληρώματος.^{4,5} Μια ομοιογενής δοκιμασία για τη συνολική δραστηριότητα του συμπληρώματος που βασίζεται στην ανοσολογική λύση των λιποσωμάτων έχει αναφερθεί στο παρελθόν.⁶ Ο βαθμός λύσης των λιποσωμάτων προσδιορίζεται από τη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης που έχει εγκλωβιστεί και η διαδικασία, η οποία εκτελείται χειροκίνητα, δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε αυτοματοποιημένους εργαστηριακούς αναλυτές.

Η μέθοδος αυτή απαιτεί την προσθήκη πολλών αντιδραστηρίων σε λιπαρτικά αντιδραστήρια, μακρά διάρκεια αντίδρασης και τη χρήση αντισωμάτων που δεσμεύουν τα λιποσώματα, τα οποία ενδέχεται να προκαλέσουν συσσωμάτωση και καθίζηση των λιποσωμάτων στο παρασκευασμένο αντιδραστήριο.

Αναπτύξαμε μια αυτοματοποιημένη ομοιογενή δοκιμασία με βάση τα λιποσώματα για τη συνολική δραστηριότητα του συμπληρώματος στον ανθρώπινο ορό. Χρησιμοποιήσαμε έναν ομοιογενή πληθυσμό λιποσωμάτων μικρού μεγέθους (200 nm), τα οποία παρείχαν σταθερή διασπορά, και αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PDH, EC 1.1.1.49) ως εγκλωβισμένο ένζυμο (το βέλτιστο pH της G6PDH είναι ουδέτερο σε σύγκριση με αυτό της αλκαλικής φωσφατάσης). Χρησιμοποιώντας αυτά τα λιποσώματα αναπτύξαμε ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα δοκιμασίας της συνολικής δραστηριότητας του συμπληρώματος.⁷

Αρχή της μεθόδου

Όταν ένα δείγμα αναμιγνύεται με το λιποσώμα και το υπόστρωμα, τα αντισώματα στο αντιδραστήριο συνδυάζονται με τη δινιτροφαινόλη (DNP) στα λιποσώματα και στη συνέχεια τα συμπληρώματα στο δείγμα ενεργοποιούνται από το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος. Τα ενεργοποιημένα συμπληρώματα σπάζουν τη μεμβράνη του λιποσωμάτος. Το ένζυμο G6PDH, που περιέχεται στο λιποσώμα, αντιδρά με το NAD και την 6-φωσφορική γλυκόζη (G6P) στο αντιδραστήριο. Κατά τη διάρκεια αυτής της ενζυμικής αντίδρασης το NAD ανάγεται σε NADH. Ως αποτέλεσμα αυτής της αναγωγής, η απορρόφηση στα 340 nm αυξάνεται. Η αύξηση της απορρόφησης είναι ανάλογη της δραστηριότητας του συμπληρώματος στο δείγμα.

Αντιδράσεις**Ενζυμική αντίδραση****Προετοιμασία αντιδραστηρίων****Αντιδραστήριο 1: (R1)**

Χρησιμοποιήστε το λιπόσωμα (R1) όπως παρέχεται. Αυτό το διάλυμα είναι σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Αντιδραστήριο 2: (R2) + (R2a)

Ανασυστήστε μια φιάλη (για 20 ml) υποστρώματος (R2) με μια φιάλη (20 ml) αραιωτικού (R2a) για να προετοιμάσετε το διάλυμα υποστρώματος. Το διάλυμα υποστρώματος παραμένει σταθερό για 40 ημέρες στους 2-10 °C.

Αντιδραστήρια**Περιεχόμενο και συνθήκες αποθήκευσης**

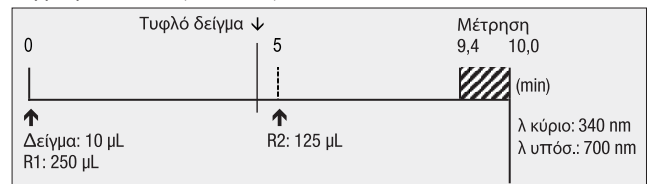
R1:	Λιπόσωμα	Αποθήκευση σε 2-10°C (Μην καταψύξετε)
R2:	Υπόστρωμα	Αποθήκευση σε 2-10°C
R2a:	Αραιωτικό	Αποθήκευση σε 2-10°C

Συστατικά

R1:	Λιπόσωμα	Περιέχει λιπόσωμα G6PDH	4 U/mL
R2:	Υπόστρωμα	Περιέχει αντίσωμα αντι-DNP, κατσίκα	24 mmol/L G6P 9 mmol/L NAD
R2a:	Αραιωτικό	Περιέχει μηλεϊνικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 5,0	5 mmol/l

Τυπική διαδικασία

Θερμοκρασία: 37 °C (Hitachi® 717)



Η παραπάνω τυπική διαδικασία είναι ένα παράδειγμα. Εφαρμογές οργάνων είναι διαθέσιμες εάν ζητηθούν.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

- Μόνο για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- Η χρήση και η εφαρμογή αυτής της δοκιμασίας προορίζεται μόνο για επαγγελματική χρήση. Ανατρέξτε στους αντίστοιχους εθνικούς και τοπικούς κανονισμούς και τη νομοθεσία.
- Να μην χρησιμοποιείται εσωτερικά σε ανθρώπους και ζώα.
- Χειριστείτε τα όργανα σύμφωνα με τα εγχειρίδια χρήσης υπό κατάλληλες συνθήκες.
- Μην αναμιγνύετε τα αντιδραστήρια από μία μονάδα δοκιμασίας με εκείνα μιας άλλης μονάδας δοκιμασίας που έχει διαφορετικό αριθμό παρτίδας.
- Μην χρησιμοποιείτε τα δοχεία και τα άλλα υλικά της συσκευασίας για σκοπούς διαφορετικούς από αυτούς που περιγράφονται στο παρόν.
- Η κλινική διάγνωση πρέπει να καθορίζεται με βάση τα κλινικά συμπτώματα και άλλα αποτελέσματα εξετάσεων από γιατρό.
- Αποθηκεύστε τα αντιδραστήρια υπό τις καθορισμένες συνθήκες. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα κάθε περιέκτη αντιδραστηρίου.
- Μετά το άνοιγμα των αντιδραστηρίων, συνιστάται η άμεση χρήση τους. Όταν τα ανοιγμένα αντιδραστήρια αποθηκεύονται, κλείστε τις φιάλες και διατηρήστε τις στις καθορισμένες συνθήκες.
- Δεδομένου ότι όλα τα δείγματα είναι δυνητικά μολυσματικά, θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τις κατάλληλες προφυλάξεις. Ανατρέξτε στα αντίστοιχα πρωτόκολλα ορθής εργαστηριακής πρακτικής για την πρόληψη της μετάδοσης λοίμωξης και χειριστείτε τα δείγματα σύμφωνα με τυχόν άλλους τοπικούς ή εθνικούς κανονισμούς που αφορούν τον ασφαλή χειρισμό τέτοιων υλικών.
- Εάν τα αντιδραστήρια έρθουν σε επαφή με το στόμα, τα μάτια ή το δέρμα, ξεπλύνετε αμέσως με μεγάλη ποσότητα νερού. Συμβουλευτείτε γιατρό εάν είναι απαραίτητο.
- Κατά την απόρριψη των αντιδραστηρίων, απορρίψτε τα σύμφωνα με τους τοπικούς ή εθνικούς κανονισμούς.

Πρόσθετες πληροφορίες (R1, R2a)

Το EUH208 περιέχει μείγμα 5-χλωρο-2-μεθυλο-2H-ισοθειαζολ-3-όνης και 2-μεθυλο-2H-ισοθειαζολ-3-όνης. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση.

Φυσικές ή χημικές ενδείξεις οσάθειας

Η παρουσία κατακρημνισμάτων στα αντιδραστήρια ή τιμές των ορών ελέγχου εκτός του αποδεκτού εύρους του κατασκευαστή μπορεί να αποτελούν ένδειξη οσάθειας του αντιδραστηρίου.

Όργανα

Το αντιδραστήριο έχει σχεδιαστεί για χρήση σε αυτοματοποιημένους αναλυτές που διατίθενται στο εμπόριο. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο λειτουργίας για μια περιγραφή της λειτουργίας και των προδιαγραφών του οργάνου. Τα πρότυπα απόδοσης για τα εναλλακτικά όργανα πρέπει να καθορίζονται από τον τελικό χρήστη.

Συλλογή και συντήρηση δειγμάτων**Χρησιμοποιήστε ορό ως δείγμα**

Συνιστάται η μέτρηση της δραστηριότητας του συμπληρώματος στο δείγμα αμέσως μετά τον διαχωρισμό του ορού. Εάν χρειάζεται, αποθηκεύστε τα δείγματα στους -70 °C ή χαμηλότερα. Το ασκορβικό οξύ, η χολερυθρίνη, η αιμοσφαιρίνη και η λιπική θολεροπότητα δεν έχουν σημαντική επίδραση στη μέτρηση.

Παρεχόμενα υλικά

Ανατρέξτε στην ενότητα "Αντιδραστήρια".

Απαιτούμενα αλλά όχι παρεχόμενα υλικά

- Αυτοματοποιημένος αναλυτής
- Βαθμονομητής CH50 (κωδικός αριθ: 997-43801)
- Έλεγχος συμπληρώματος (κωδικός αριθ: 991-43701)

Αποτελέσματα

Τα τελικά αποτελέσματα υπολογίζονται αυτόματα και εκτυπώνονται σε συγκέντρωση.

Βαθμονόμηση

Η δοκιμασία CH50 παράγει μια καμπύλη βαθμονόμησης με την απεικόνιση της απορρόφησης σε σχέση με τη συγκέντρωση. Συνιστάται να πραγματοποιείτε βαθμονόμηση τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα.

Ποιοτικός έλεγχος

Σε όλα τα κλινικά εργαστήρια συνιστάται ένα πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου. Για την παρακολούθηση της απόδοσης της διαδικασίας συνιστάται η ανάλυση υλικού ελέγχου τόσο στο φυσιολογικό όσο και στο μη φυσιολογικό εύρος με κάθε δοκιμασία. Οι τιμές που λαμβάνονται για τους ελέγχους πρέπει να εμπίπτουν στα αποδεκτά όρια του κατασκευαστή. Εάν πρόκειται να καθοριστούν τιμές για μη δοκιμασμένο υλικό ελέγχου, το εργαστήριο θα πρέπει να εξετάζει κάθε επίπεδο υλικού ελέγχου αρκετές φορές ώστε να προκύπτει έγκυρος μέσος όρος και αποδεκτό εύρος.

Περιορισμοί της διαδικασίας

- α) Το μετρήσιμο εύρος του Wako Autokit CH50 είναι 10-60 U/mL.
- β) Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ενδέχεται να μην είναι ακριβή εάν τα δείγματα έχουν αραιωθεί.

Αναμενόμενες τιμές

Ορός: 31,6-57,6 U/mL⁹

Οι αναμενόμενες τιμές υπολογίζονται από μια κανονική κατανομή τιμών. Από τα 880 άτομα επιλέχθηκαν 243 άτομα, τα οποία παρουσίασαν αποτελέσματα δοκιμασίας εντός των αναμενόμενων τιμών σε 12 βιοχημικές παραμέτρους. Τα δεδομένα αυτά πραγματοποιήθηκαν στην Ιαπωνία. (Εσωτερικά δεδομένα).

Δεδομένου ότι οι αναμενόμενες τιμές επηρεάζονται από την ηλικία, το φύλο, τη διατροφή, τη γεωγραφική θέση και άλλους παράγοντες, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει τις δικές του αναμενόμενες τιμές για τη διαδικασία αυτή.

Παρεμβατικές ουσίες

Οι συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος έως 50 mg/dL, οι συγκεντρώσεις αιμοσφαιρίνης έως 500 mg/dL και οι συγκεντρώσεις χοληρυθρίνης έως 40 mg/dL δεν έχουν σημαντική επίδραση στη δοκιμασία Autokit CH50.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Ορθότητα (WAKO-30R)

Αρ.	Αναμενόμενο (U/mL)	Παρατηρούμενο (U/mL)	Ανάκτηση (%)
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

Ακρίβεια (WAKO-30R)

Ακρίβεια εντός της εκτέλεσης

Αρ. εκτέλεσης	Αρ. δείγματος	Αντίγραφα	Μέσος όρος (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

Συνολική ακρίβεια

Επίπεδο συγκέντρωσης	Αρ. ημερών δοκιμασίας	Μέσος όρος (U/mL)	SD	CV (%)	S _{err}	S _r
χαμηλό	21	26,9	1,54	5,7	16,6	16,7
υψηλό	21	48,3	1,57	3,2	18,9	22,1

Τα δεδομένα συλλέχθηκαν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες NCCLS.

Ευαισθησία: Το ελάχιστο ανιχνεύσιμο επίπεδο CH50 εκτιμάται σε 10 U/mL.

Εξειδίκευση (WAKO-30R)

Μελέτη πρόσθετου

Ασκορβικό οξύ (mg/dL)	κανένα	10	20	30	40	50
CH50 (U/ml)	36,0	36,0	36,0	35,0	35,5	35,5

Χοληρυθρίνη (mg/dL)	κανένα	8	16	24	32	40
CH50 (U/ml)	35,0	36,0	36,0	36,0	37,0	37,0

Αιμοσφαιρίνη (mg/dL)	κανένα	100	200	300	400	500
CH50 (U/mL)	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	39,5

Αναφορές

1. Schur PH: Complement studies of sera and other biologic fluids. Hum Pathol 1983, 14: 338-42.
2. Mayer MM: Complement and complement fixation. Σε: Kabat EA, Mayer MM, εκδ. Experimental immunochemistry, 2nd ed. Springfield, IL: Charles C Thomas. 1967, 133-240.
3. 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.
4. Kinsky SC: Antibody-complement interaction with lipid model membranes. Biochim Biophys Acta 1972, 265: 1-23.
5. Akots G, Braman JC, Broeze RJ, Bowden DW: Rapid, homogeneous phase, liposome-based assays for total complement activity. Complement 1984, 1: 125-33.
6. 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.
7. Yamamoto S, Kubotsu K, Kida M, Kondo K, Matsuura S, Uchiyama S, Yonekawa O, Kanno T: Clin Chem 1995, 41: 586-90.
8. Fujio K, Nagao K, Shiraishi N. JPN J. Med Pharm Sci 2012; 67 (2): 291-5.

Πληροφορίες παραγγελίας

Κωδικός Αρ.	Προϊόν	Συσσκευασία
995-40801	Autokit CH50	R1: 2 x 20 mL R2: 1 x για 20 mL R2a: 1 x 20 mL
995-40802	Autokit CH50 Small	R1: 1 x 20 mL R2: 1 x για 11 mL R2a: 1 x 11 mL
997-43801	Βαθμονομητής CH50	CAL: 5 συγκ. x για 0,5 mL
991-43701	Έλεγχος συμπληρώματος	H: 10 x για 0,5 mL (υψηλό) L: 10 x για 0,5 mL (χαμηλό)