



Reactivo CH50 Optilite

Para uso diagnóstico *in vitro*

Código de producto: NK095.OPT

Producto fabricado por:
The Binding Site Group Ltd., 8 Calthorpe Road, Edgbaston, Birmingham, B15 1QT, UK
www.bindingsite.co.uk

The Binding Site Group Limited Sucursal en España
Bruc 72 2ª planta, 08009 Barcelona, España
Teléfono 902027750
Fax: 902027752
e-mail: info@bindingsite.es
web: www.bindingsite.es

Optilite es una marca registrada de The Binding Site Group Limited (Birmingham, Reino Unido) en ciertos países.



1 APLICACIÓN

El reactivo CH50 Optilite tiene como objetivo la cuantificación *in vitro* de la actividad clásica del complemento (CH50) en suero humano y plasma EDTA usando el analizador Optilite de Binding Site como ayuda en el diagnóstico de trastornos inmunológicos, en especial los que se asocian con deficiencias de componentes del complemento. El resultado del test se debe tener en cuenta junto con otras determinaciones clínicas y de laboratorio.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La cascada del complemento comprende más de 20 proteínas séricas que forman parte del sistema inmunitario innato. El complemento actúa de varias maneras para ayudar a eliminar organismos invasores, siendo su función principal la lisis de las bacterias mediante la formación del complejo de ataque a membrana (MAC). La complejidad de las interacciones de la cascada del complemento implica que la funcionalidad del MAC no necesariamente se ve inferida por niveles aparentemente normales de cada uno de los componentes del complemento. Por ello el método tradicional para determinar en suero la actividad total del complemento es el análisis CH50, basado en la hemólisis de eritrocitos sensibilizados con anticuerpos, con mediación del complemento.¹ Sin embargo este método puede ser complicado, exige mucho tiempo y la estabilidad de los reactivos es limitada. El ensayo de CH50 para uso en SPAPLUS minimiza estos problemas al analizar directamente la función del MAC, y determinar así la actividad total del complemento (CH50). Se ha establecido una correlación de la actividad del complemento con la etapa activa del lupus sistémico eritematoso, artritis reumatoide, algunas formas de nefritis, y deficiencias hereditarias del sistema del complemento.^{2,3,4}

3 PRINCIPIO

Los liposomas, que contienen glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) suelen mimetizar los microorganismos invasores. Al añadir la muestra, los anticuerpos del reactivo se combinan con grupos de dinitrofenil en la superficie de los liposomas. El complejo que aparece como resultado activa el complemento en la muestra, que lisa el liposoma, liberando G6PDH para reaccionar con la glucosa-6-fosfato y NAD en el reactivo. Se puede medir por turbidimetría el cambio en la absorbancia, que es proporcional a la actividad del complemento en la muestra. Al compararlo con una curva de calibración se obtiene un valor para la muestra de paciente desconocido.⁵

4 REACTIVOS

- 4.1 **Reactivo liposoma:** Reactivo líquido que contiene liposoma G6PDH
- 4.2 **Sustrato:** En forma liofilizada, contiene anticuerpo anti-DNP (cabra), 24 mmol/L G6P y 9 mmol/L NAD
- 4.3 **Diluyente para sustrato:** Reactivo líquido que contiene 10 mmol/L de maleato de buffer (pH 5.0)

5 PRECAUCIONES

El diluyente para sustrato CH50 Optilite (D095.OPT) es irritante al contacto con los ojos y la piel. Posibles efectos en la salud:

- Al contacto con los ojos: puede causar irritación, enrojecimiento e hinchazón.
- Al contacto con la piel: puede causar irritación y erupciones en la piel (dermatitis).
- Al inhalar: Las concentraciones altas en vapor irritan los ojos, nariz, garganta y pulmones.
- Al ingerir: Puede causar dolor abdominal.

Evite el contacto con la piel y use guantes adecuados al manipular el sustrato.

El presente producto debe ser utilizado por personal especializado. Se recomienda observar estrictamente el procedimiento indicado. No se garantizan resultados válidos obtenidos utilizando parámetros diferentes a los indicados.

6 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El pack de reactivos no abierto debe conservarse a 2-8°C y se puede usar hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja. NO CONGELAR. El reactivo liposoma R1 y el sustrato reconstituido R2 pueden conservarse, sin proteger, hasta 30 días en el analizador Optilite, siempre y cuando se deje encendido el interruptor de alimentación (situado en la parte posterior del panel izquierdo).

7 OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras deben proceder de extracciones venosas y, en caso de plasma, hay que separarlo lo más rápidamente posible. La sangre se ha de dejar que coagule de modo natural y separar el suero lo antes posible para prevenir la hemólisis. Se recomienda determinar la actividad del complemento en las muestras inmediatamente después de la separación del suero. Para periodos largos, se recomienda conservar las muestras a -70°C o temperatura inferior. No congelar y descongelar los sueros más de una vez. Evitar el uso de muestras lipémicas, hemolizadas o contaminadas por microbios, o de muestras que contengan altos niveles de ácido ascórbico o de partículas. Es responsabilidad de cada laboratorio el uso de todas las referencias disponibles y/o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad específicos para su laboratorio.

8 METODOLOGÍA

8.1 Material suministrado

- 8.1.1 1 x 20mL Optilite CH50 Liposome Reagent (Reactivo CH50 Optilite)
- 8.1.2 1 x 11mL Optilite CH50 Substrate (Sustrato CH50 Optilite)
- 8.1.3 1 x 11mL Optilite CH50 Substrate Diluent (Diluyente para sustrato CH50 Optilite)
- 8.1.4 1 x Optilite CH50 Liposome Bottle R1 (botella para Reactivo liposoma CH50 R1 Optilite)
- 8.1.5 1 x Optilite CH50 Substrate Bottle R2 (botella para Reactivo liposoma CH50 R2 Optilite)

8.2 Materiales necesarios no suministrados con el kit

- 8.2.1 NK095.OPT: Calibrador CH50 Optilite
- 8.2.2 NK095.OPT: CH50 Controles Optilite
- 8.2.3 Diluyente 1 Optilite: código de producto IK709
- 8.2.4 Equipamiento de laboratorio para la recolección y preparación de muestras (probetas para las muestras, centrífuga, etc.).
- 8.2.5 Analizador Optilite completamente equipado.
- 8.2.6 Las instrucciones actuales de funcionamiento del analizador: Manual de funcionamiento Optilite, código INS700.OPT

8.3 Preparación de los reactivos

- 8.3.1 **Reactivo liposoma:** añadir 20mL de reactivo liposoma R1 en la botella para reactivo liposoma (R1).
- 8.3.2 **Sustrato:** preparar la solución de sustrato reconstituyendo 11mL de sustrato R2 con 20mL de diluyente para sustrato R2a y mezclar con cuidado por inversión. Asegúrese de que el sustrato esté completamente reconstituido antes de añadirlo en la botella para sustrato (R2).

Antes de cargar, mezclar por inversión evitando la formación de espuma o burbujas que podrían interferir en el momento de la aspiración del reactivo.

8.4 Procedimiento de la prueba

El usuario deberá estar familiarizado con el equipo Optilite antes de realizar la prueba. Preparar el equipo según el manual del fabricante y el protocolo de prueba introducido tal y como se describe a continuación.

8.5 Rango de medida

El rango de medición aproximado del ensayo se indica en la siguiente tabla:

Dilución del analizador Optilite	Rango aproximado (U/mL)
1+1	12,5 – 100 U/mL

9 CONTROL DE CALIDAD

Se deben analizar al menos dos niveles de material de control adecuado (NQ095.OPT) una vez al día como mínimo. Además, se deben analizar controles tras la calibración, con cada nuevo vial de reactivo y tras el mantenimiento específico o los pasos de resolución de problemas descritos en el Manual de funcionamiento de Optilite.

El análisis de control se debe realizar de acuerdo a los requerimientos reglamentarios y el procedimiento estándar de cada laboratorio.

Las concentraciones de los controles suministrados están indicadas en el certificado de control de calidad que acompaña al kit (QCcertQ95.OPT). Los resultados obtenidos sólo pueden aceptarse si los resultados de los controles entran dentro del $\pm 20\%$ de las concentraciones indicadas.

En caso de que un control dé un resultado fuera del rango y se haya empleado una curva de calibración almacenada, se recomienda calibrar de nuevo el test. Si aún después de la nueva calibración estuviera fuera de rango, deberá verificarse el instrumento y los parámetros programados. Si no se solucionara el problema, rogamos se dirijan al soporte técnico de su proveedor.

10 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 10.1 Los ensayos turbidimétricos no son adecuados para la medida de muestras con niveles elevados de complejos inmuno circulantes (CIC's), o para muestras hemolizadas o altamente lipémicas, debido al impredecible grado de dispersión inespecífica que pueden generar estas muestras. Resultados inesperados deben confirmarse mediante un método alternativo.
- 10.2 No debe realizarse el diagnóstico ni iniciarse un tratamiento basándose únicamente en la medida de CH50, deben tenerse en cuenta también la historia clínica y resultados de otras pruebas de laboratorio.
- 10.3 No se ha validado el uso de muestras pediátricas en este ensayo.

11 VALORES ESPERADOS

Los rangos indicados se han obtenido a partir de un número limitado de muestras y son únicamente orientativos. Los valores esperados pueden variar en función de la edad, sexo, tipo de muestra, dieta y localización geográfica. Cada laboratorio debe verificar la

transmisibilidad de los valores esperados a la población a analizar y, si es necesario, establecer su propio rango de referencia.

Intervalos de referencia en adultos

Estos intervalos de referencia se obtuvieron mediante la determinación de las concentraciones de CH50 del suero de donantes adultos sanos del Reino Unido y plasma EDTA de donantes de sangre de Estados Unidos, con este ensayo en un SPAPLUS. Los intervalos de referencia se calcularon mediante datos estadísticos paramétricos y representan al 95 % central de la población.

	Número (n)	Media (U/mL)	Mediana (U/mL)	Rango percentil 95 (U/mL)
CH50 en suero	120	68,37	68,70	41,68-95,06
CH50 en plasma EDTA	120	46,091	45,135	31,713 - 71,365

12 CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

12.1 Precisión

Se llevó a cabo un estudio siguiendo la CLSI *Evaluation of Precision Performance of Clinical Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline* (CLSI Documento EP5-A2). El estudio se realizó durante 21 días laborables, con dos ensayos por día. Un usuario valoró cinco muestras distintas utilizando tres lotes distintos de reactivo en tres analizadores.

Resumen de precisión CH50									
	Media (U/mL)	Intra-ensayo		Inter-ensayo		Inter día		Total	
		SD	CV %	SD	CV %	SD	CV %	SD	CV %
Nivel 1	19,23	0,92	4,8	0,64	3,3	1,12	5,8	1,59	8,3
Nivel 2	30,22	1,12	3,7	1,18	3,9	0,67	2,2	1,76	5,8
Nivel 3	40,34	0,59	1,5	0,75	1,9	1,49	3,7	1,77	4,4
Nivel 4	51,35	0,71	1,4	0,65	1,3	1,51	2,9	1,79	3,5
Nivel 5	78,72	1,64	2,1	1,76	2,2	2,44	3,1	3,43	4,4

Se completó un estudio de precisión intra-ensayo con muestras de plasma EDTA:

Resumen de precisión			
	Valor medio (U/mL)	Intra-ensayo	
		Desviación estándar	Variación conc. %
Nivel 1	19,05	0,63	3,3
Nivel 2	35,25	1,00	2,8
Nivel 3	69,31	0,78	1,1

12.2 Estudio comparativo

Se realizó un estudio comparativo analizando 197 muestras de suero (incluyendo 76 muestras con niveles de analito dentro del intervalo de referencia) con el reactivo CH50 de Optilite y otro ensayo alternativo disponible en el mercado. El análisis de regresión Passing Bablok generó los siguientes resultados:

$$y = 1,09x - 3,06 \text{ (U/mL)} \quad (y = \text{Optilite}; x = \text{analizador prediado})$$

coeficiente de correlación $r = 0,975$ (calculado por regresión lineal)

Se realizó un estudio comparativo analizando 106 muestras de suero EDTA (incluyendo 67 muestras con niveles de analito dentro del intervalo de referencia) con el reactivo CH50 de Optilite y otro ensayo alternativo disponible en el mercado. El análisis de regresión Passing & Bablok generó los siguientes resultados:

$$y = 1,00x + 0,66 \text{ (U/mL)} \quad (y = \text{Optilite}; x = \text{analizador prediado})$$

coeficiente de correlación $r = 0,982$ (calculado mediante regresión lineal)

12.3 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LoQ) de este ensayo se define como el punto inferior del rango de medición, 12,5 U/mL. El estudio de validación del LoQ se basó en el documento CLSI EP17-A *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation*.

12.4 Linealidad

El estudio de linealidad se basó en el documento CLSI document *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline* (EP6- A). La linealidad de este ensayo se confirmó analizando una serie de diluciones de muestras de suero y plasma EDTA para cubrir el rango de 12,5 - 100 U/mL para la dilución 1+1 del analizador Optilite con una desviación de linealidad de $\leq 10,0$ % para el suero y $\leq 20,0$ % para el plasma EDTA.

12.5 Sustancias interferentes

Se realizó un estudio siguiendo el documento CLSI EP7-A2: *Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline* (Documento CLSI EP7-A2). Se analizaron una muestra de suero normal, una muestra de suero con valor cercano al punto de decisión médica y una muestra de suero anormal. No se observaron interferencias significativa en los ensayos con intralipido (250mg/dL), triglicéridos (1000mg/dL), bilirrubina (200mg/L), hemoglobina (5g/L) o ácido ascórbico (0,5g/L).

No hay constancia de interferencia significativa con fármacos de uso habitual. Varias publicaciones ofrecen más información al respecto (Ref. 6).

13 BIBLIOGRAFIA

- Mayer MM. Complement and complement fixation. In Kabat EA, Mayer MM, ed. *Experimental immunochemistry*, 2nd ed. Springfield, IL: Charles C Thomas, 1967: 133-240.
- Pickering M. C and Walport M. J. (2000). Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 39: 133-141.
- Berger S.P and Daha M.R. (2007). Complement in glomerular injury. *Semin Immunopathol*, 29: 375-384.
- Wen L, Atkinson J.P and Giclas P.C. (2004). Clinical and laboratory evaluation of complement deficiency. *J. Allergy Clin Immunol* 113(4): 585-593.
- Yanamoto S, Kubotsu K, Kida M, Kondo K, Matsuura S, Uchlyama S, Yonekawa O, Kanno T (1995). Automated homogeneous liposome-based assay system for total complement activity. *Clin Chem*, 41: 586-90.
- Young D. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests*, 5th ed. AACCC Press, 2000.