

AVALIAÇÃO DO MÉTODO AUTOMATIZADO DE IMUNOENSAIO HOMOGÉNEO BASEADO EM LIPOSOMAS PARA DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE TOTAL DO COMPLEMENTO

CARLA MANUELA SILVA, MARIA PIEDADE RAMOS

Serviço de Patologia Clínica. Laboratório de Imunologia. Hospital Garcia de Orta. Almada

RESUMO/SUMMARY

A Secção de Imunologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Garcia de Orta, avaliou uma nova técnica automatizada, o imunoensaio homogéneo baseado na lise de liposomas (L.I.A.), para determinar a *actividade* total do complemento, recentemente comercializado pela Wako (Osaka, Japan), (CH50 WAKO). Utilizando soros obtidos de dadores voluntários saudáveis, determinámos os valores de referência na nossa população adulta, para o parâmetro CH50 e fizemos o estudo da precisão intrasérie, precisão intersérie, da exactidão, do *carry-over* e da linearidade do novo método.

Palavras-chave: *complemento (CH50), liposomas, "imunoensaio"*.

ASSESSMENT OF AN AUTOMATED HOMOGENEOUS LIPOSOME-BASED IMMUNOASSAY SYSTEM FOR TOTAL COMPLEMENT ACTIVITY.

The Immunology department of Garcia de Orta Hospital, has evaluated a new automated homogeneous liposome-based immunoassay (L.I.A.), for measuring total complement activity, which has become recently commercially available from WAKO (Osaka, Japan), (CH50 WAKO). Serum samples from 100 healthy voluntary donors were assayed, with liposome-based assay. The reference values in our adult population concerning CH50 were established. Within-run and between-run precision, accuracy, carry-over and the linearity of the new method were also assessed.

Key words: *complement (CH50), liposome, immunoassay*

INTRODUÇÃO

O sistema do complemento é um complexo conjunto de proteínas plasmáticas que têm uma função importante no sistema de defesa imunológico¹.

O sistema do complemento pode ser activado através da via clássica ou da via alterna. Ambas conduzem à

formação do complexo de ataque da membrana (MAC), o qual rompe as membranas celulares e conduz à morte da célula.

A avaliação do sistema do complemento pode ser feita em duas vertentes:

- Avaliação funcional:

- Teste do complemento hemolítico total^{2,3} (CH50, método moroso em tubo).
- CH100 (placa de gel com eritrócitos sensibilizados).
- CH50 - L.I.A. método automatizado baseado na lise de liposomas (método em estudo).

- Avaliação quantitativa:

- Doseamentos de componentes do complemento, entre os quais o C3 e o C4 (método imunoquímico - nefelometria).

Actualmente, a maior utilidade do teste de actividade total do complemento é a detecção de deficiências e níveis diminuídos do complemento sérico.

A medição do aumento do complemento, que se associa a situações de inflamação e necrose, tem uma aplicação clínica limitada. Com efeito, nestas situações estão presentes elevações de várias proteínas de fase aguda (incluindo algumas do sistema do Complemento), que dispõem de métodos de avaliação mais simples.

A medição da diminuição do complemento é importante no estudo de deficiências hereditárias, como no angioedema hereditário, no diagnóstico e tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, como o Lupus Eritematoso Sistémico, em que há activação e consequente consumo do complemento.

O método clássico usado para determinar a *actividade* total do complemento é o CH50 (complemento hemolítico total)^{2,3}; contudo, não é automatizado e os reagentes não são estáveis pelo uso de eritrócitos. Por isso, o método de rotina no nosso Laboratório para avaliação funcional do complemento é o CH100. Em 1995, a Wako Pure Chemical Industries Lda. desenvolveu *in vitro* o imunoensaio de liposomas que usa um procedimento automatizado, para a determinação quantitativa da *actividade* do complemento no soro humano. Este estudo foi feito na população japonesa.²

Além de ensaiar este método propusemo-nos estudar os valores de referência na nossa população.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo utilizámos 100 amostras de soros de doadores voluntários (52 homens de idades compreendidas entre os 21 e os 61 anos e 48 mulheres de idades compreendidas entre os 22 e os 72 anos). Os valores das determinações obtidas situaram-se entre 32-64 U/mL para as mulheres e entre 30-63 U/mL para os homens. Os valores de referência na população saudável situaram-se entre 32-63 U/mL.

Sempre que possível, efectuámos para cada amostra o doseamento do C3 e C4 utilizando o método imunoquímico

(nefelometria), rejeitando as amostras cujos valores estavam aumentados, uma vez que pretendíamos saber os valores de referência numa população saudável.

Utilizámos um *imunoensaio* automatizado *homogéneo*, baseado na lise de liposomas sensibilizados por um imunocomplexo DNP-anti DNP, para medir a *actividade* total do complemento^{2,3}.

A lise dos liposomas causada pela *actividade* do complemento foi detectada espectrofotometricamente, a partir da actividade da G6PDH (glucose 6 fosfato desidrogenase).

Foi adoptado um sistema de dois reagentes, um reagente contendo uma população homogénea de pequenos liposomas (200 nm) marcados com DNP e contendo o enzima G6PDH e outro contendo Ac anti DNP, NAD e G6P (glucose 6 fosfato) (Figura 1).

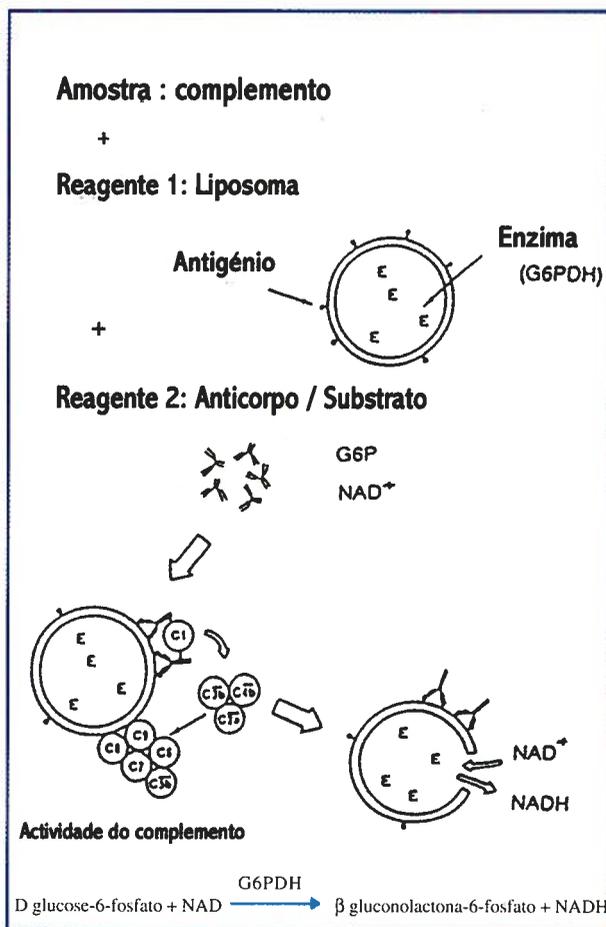


Fig. 1 - Princípio do ensaio baseado na lise de liposomas.

Foi usado um autoanalisador múltiplo (Hitachi 917), com um tempo de reacção total de 10 min. em todos os ensaios.

Uma amostra de soro (10 mL) e 250 mL de reagente 1 (liposomas marcados com DNP equivalentes a 5 nmol/L de lípidos em 60 nmol/L de Tris-HCl, pH 8,0 e 145 nmol/L de NaCl), foram pipetados numa cuvete de reacção. Após 5 min., 125 mL de reagente 2 (Ac anti DNP em 10 nmol/L de malato-NaOH contendo 145 nmol/L NaCl, 1,5 nmol MgCl₂, 0,45 nmol/L CaCl₂, 24 nmol/L G6P e 9 nmol/L NAD⁺, pH 5,5), foram adicionados à cuvete.

Esta mistura de reacção foi incubada durante mais 5 min. Durante estes últimos 5 min., os liposomas marcados com DNP foram sensibilizados com Ac anti DNP.

Depois, os liposomas sensibilizados foram lisados libertando o enzima G6PDH, que actua sobre a G6P e o NAD⁺ reduzindo este último em NADH.

Como resultado desta redução, a absorvância a 340 nm aumenta.

Este aumento de absorvância é proporcional à actividade total do complemento na amostra e é medido em dois c.d.o. (340 e 700 nm).

Foi testada a gaussianidade da distribuição dos resultados, com os testes do Qui- quadrado e Kolmogorov-Smirnov.

RESULTADOS

Foi feita a análise estatística das 100 determinações obtidas, aplicando o teste do χ^2 *chi square* e de Kolmogorov-Smirnov, para comparação entre distribuições de probabilidade. O teste do Qui-quadrado foi efectuado com 7 e 11 classes. Apresentamos um gráfico expondo a frequência relativa (barras) e probabilidade da classe, admitindo uma distribuição gaussiana e efectuado com 11 classes (Figura 2). Para cada uma das classes definidas

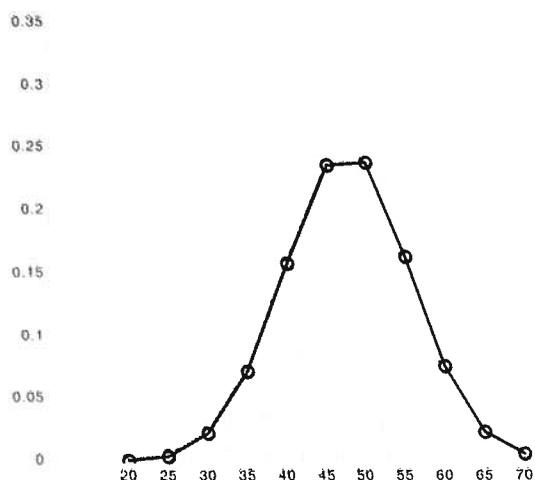


Fig. 2 - Frequência relativa (barras) e probabilidade da classe admitindo uma distribuição gaussiana. Resultados para 11 classes.

conta-se o número de resultados em cada classe e calcula-se o correspondente valor esperado. Estes valores mostram-se graficamente na figura, normalizados pela dimesão da amostra (isto é divididos por 100). A amostra considerada, relativa aos resultados do teste CH50, satisfaz os testes de gaussianidade do Qui-quadrado e de Kolmogorov-Smirnov com nível de significância de 5%. As estimativas BLUE⁴ (melhores estimativas lineares não polarizadas) da média e do desvio padrão da distribuição são, respectivamente $\mu = 47,62$ U/mL e $s = 7,88$ U/mL. Os valores de referência para o ensaio CH50 na nossa população situaram-se entre 32-63 U/mL e foram estabelecidos com o valor da média mais ou menos dois desvios padrões.

Efectuámos o estudo da precisão intersérie, (10 determinações), constituindo duas "pool" (alta CH50 > 45U/mL e baixa CH50 < 20U/mL) com as amostras testadas (Quadro 1).

Quadro 1 - Estudo da precisão

CH 50 U/mL							
Imprecisão inter série "Pool" alta		"Pool" baixa		Imprecisão intra série Controlo alto		Controlo baixo	
Média	Cv %	Média	Cv %	Média	Cv %	Média	Cv %
50,5	5,2	17,9	4,9	49,2	1,9	26,7	1,9

Com os dois níveis de controlo, alto e baixo, foi efectuado o estudo da precisão intrasérie (dez determinações) (Quadro I).

Verificou-se uma exactidão suficiente com o controlo alto e com o controlo baixo (diferença em % variando entre 4,2 e 11%, com ambos os controlos).

O estudo da linearidade foi feito utilizando diluições de cada um dos controlos referidos com soro fisiológico.

A linearidade foi avaliada comparando os valores medidos e valores teóricos (valores corrigidos de diluições calculadas das concentrações das amostras). Uma curva linear foi obtida em cada caso. (Figura 3).

Carry-over – foi avaliado no Hitachi 917, processando uma "aliquota" de uma amostra com actividade alta do complemento seguida por três sucessivas *aliquotas* de uma amostra com baixa actividade do complemento.

Este ensaio foi efectuado apenas três vezes, pois foi o possível, não se verificando a ocorrência de *carry-over*. (Quadro II).

Foi previamente efectuada a calibração, no início do estudo, usando cinco níveis de calibradores.

De acordo com o fabricante, não encontramos interferência nas determinações com amostras hemolisadas ou ictericas.

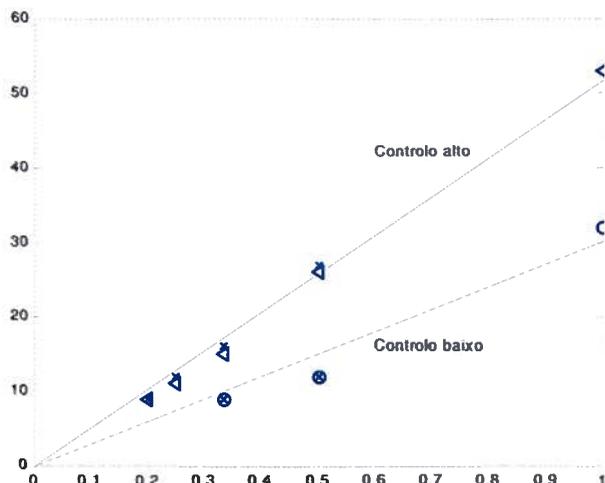
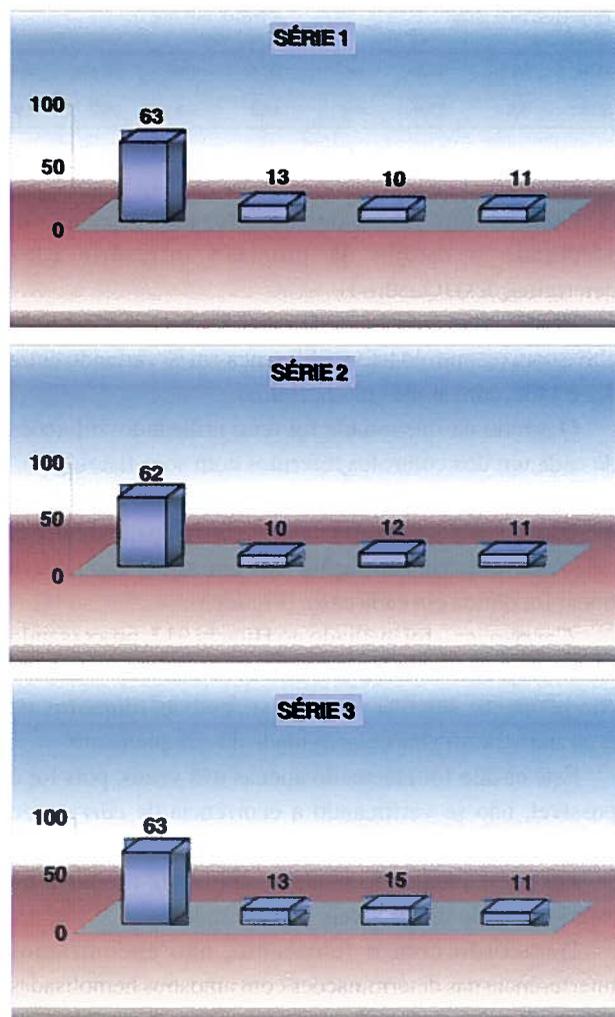


Fig. 3 - Estudo da linearidade
Diluições seriadas dos controlos baixo (o) e alto (D) com soro fisiológico

Quadro II - Estudo de carry-over



DISCUSSÃO

Desempenhando a cascata do complemento um importante papel no sistema de defesa imunológica do organismo, a determinação da actividade do complemento no soro humano pode fornecer importante informação no diagnóstico e follow-up de doenças inflamatórias, auto imunes e infecciosas^{5,6}.

Até à pouco, o método de Mayer modificado, (CH50) usado em laboratórios clínicos para detectar a actividade do complemento revelou-se instável, moroso e complicado, pois envolve eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpo, necessita de diluição da amostra de soro e de um processo de centrifugação².

No nosso laboratório é utilizado um método manual o CH100 (placa de gel com eritrócitos sensibilizados) para determinar a actividade hemolítica total do complemento. Neste método, as placas de gel de agarose contêm eritrócitos de carneiro sensibilizados com um anticorpo (de coelho anti eritrócitos de carneiro); estes têm um período curto de estabilidade. Após a aplicação das amostras, em número limitado, o período de incubação é longo (6 a 18 horas) e a leitura visual dos halos de difusão é difícil. O cálculo dos resultados a partir da construção de uma curva de calibração é demorado. O método é moroso.

Fizemos a avaliação do método automatizado baseado na lise de liposomas (L.I.A.), por ser um método que possibilita a execução de um número elevado de determinações com rapidez de obtenção de resultados. Os reagentes são suficientemente estáveis e podem ser utilizados até 40 dias após a abertura².

A imprecisão encontrada foi de 5,2 % para amostras com actividade alta do complemento.

A imprecisão intrasérie para os controlos altos tem o valor de 1,9 % e para os controlos baixos de 1,9 %.

Relativamente ao estudo da linearidade, o limite de detecção mínimo de 10 U/mL referido pelo fabricante parece aceitável, tendo em conta que o valor mais baixo detectável no nosso estudo foi de 5 U/mL.

Ao avaliar este novo método do CH50, (actividade total do complemento) propusemo-nos determinar os valores de referência para a nossa população os quais foram de 32-63 U/mL, sem diferenças estatísticas significativas relacionadas com o sexo⁷. Os valores de referência fornecidos pelo fabricante são de 23-46 U/mL, e foram obtidos na população japonesa.

Conclui-se que a utilização do método CH50 (L.I.A.), baseado na lise de liposomas, apresenta as vantagens de ter procedimento completamente automatizado, reagentes estáveis por longo período e possibilitar a execução de um número elevado de testes com rapidez na obtenção de resultados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a João Manuel Laje Miranda Lemos, Prof. Associado Agregado do Departamento de Eng^a Electrotécnica do I.S.T., a análise estatística dos resultados do teste CH50 através dos testes do χ^2 e de Kolmogorov-Smirnov.

Agradecemos também a Maria Isabel Pereira Carvalho, Assistente Hospitalar Graduada, responsável pela Secção de Bioquímica, que nos disponibilizou o equipamento (Hitachi 917), o que tornou possível a execução dos tes-

BIBLIOGRAFIA

1. PALMA CARLOS AG, PALMA CARLOS ML: Manual de Imunologia. 1^o Fascículo. Lisboa 1989; 74-79

2. SACHIKO Y, KAZUHISA K, MASAOKI K et al: Automated homogeneous liposome-based assay system for total complement activity. *Clinical Chemistry* 1995; 41/4: 586-590

3. GICLAS PC. Complement tests. In: ROSE NR, CONWAY de MACARIO E, FOLDS JD, CLIFFORD LANE H, NAKAMURA RM, eds. *Manual of clinical laboratory immunology*, 5th ed. Washington, D.C. : ASM Press, 1997: 181-6

4. LABROUSSE C: Testes Estatísticos. Rés. 1983

5. BOWDEN DW, RISING M, AKOTS G, MYLES A, BROEZE RJ: Homogeneous, liposome-based assay for total complement activity in serum. *Clinical Chemistry* 1986; 32:275-8

6. BARTON F, HAYNES, ANTHONY S FAUCI: Introduction to the immune system. In: FAUCI, BRAUNWALD, ISSELBACHER, et al: *Principles of Internal Medicine. Harrisons* 1998; 14th ed: 1771-72

7. SEBASTIÁN GAMBARO MA, LIRON HERNÁNDEZ FJ, FERENTES-ARDERIN X: Intra and inter individual biological variability data bank. *Eur J Clin Biochem* 1997;35: 845- 52



Hospital Garcia de Orta. Almada