

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD LÍTICA DEL COMPLEMENTO SÉRICO (CH50) EN ADULTOS COSTARRICENSES

Eugenia Mata y Bruno Lomonte*

Key Word Index: Hemolysis complement

RESUMEN

En el presente trabajo se estandariza un método simple y cuantitativo para la determinación de la actividad hemolítica (CH50) del complemento sérico. Con este método, se evalúa los niveles de complemento en una muestra de la población adulta costarricense, y a la vez, se introduce un método de control de calidad en dicha técnica. Los valores obtenidos en los adultos sanos estudiados (n=53) se distribuyeron en un ámbito entre 71 y 128 U/ml, con un promedio de 93 U/ml y una desviación estándar de 14 U/ml. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1986; 7(1):41 - 47].

INTRODUCCIÓN

El sistema de complemento (C) está constituido por un conjunto de proteínas séricas, capaces de activarse en forma de cascada ante ciertos estímulos, como parte de los mecanismos inespecíficos de inmunidad en los vertebrados (3, 29, 33). La activación del sistema puede ocurrir mediante dos vías diferentes. La vía alterna (30), filogenéticamente más antigua, es activada principalmente por polisacáridos de origen microbiano, mientras la vía clásica (de más reciente aparición) se inicia principalmente con el reconocimiento de complejos antígeno- anticuerpo (IgM, IgG₁ e IgG₃). Ambas formas de activación conducen a una vía efectora común (1, 10, 34, 35). Su acción es compleja, e incluye actividades tales como la promoción de la inflamación local, la facilitación de la fagocitosis y el ataque lítico hacia las membranas (6, 13, 25, 26). Volk (41) realizó una revisión bastante completa sobre la activación del sistema de C, las interacciones entre sus componentes, sus propiedades químicas y biológicas, su regulación y otros aspectos básicos de importancia.

La evaluación del C en el laboratorio, plantea una serie de dificultades que se originan en la

misma complejidad del sistema. La alta labilidad de sus componentes, la degradación de los mismos por factores reguladores, la amplificación enzimática que ocurre en algunos pasos de la cascada, son ejemplos de los factores que restringen las posibilidades de evaluar el C en una forma simple, cuantitativa y confiable (15, 21). Entre las alternativas metodológicas para la evaluación del C, se encuentran:

- Pruebas funcionales cuantitativas (CH50) que miden la capacidad lítica global de la vía clásica o la vía alterna, contra eritrocitos en suspensión (9, 11, 19, 21, 24).
- Pruebas funcionales cualitativas que evalúan la capacidad lítica global de la vía clásica o la vía alterna, contra eritrocitos en gel de agarosa (7, 9, 19, 21, 39).
- Pruebas funcionales cuantitativas de un componente particular (19, 24, 28, 36).
- Pruebas cuantitativas no funcionales de un componente particular, mediante técnicas inmunológicas como inmunodifusión radial, inmunoelectroforesis en cohete, o inmunonefelometría (9, 17, 19, 21).

El objetivo del presente trabajo es estandarizar un método simple y a la vez cuantitativo, para la determinación CH50 por la vía clásica. Con este método, evaluamos los niveles de complemento sérico en una muestra de la población adulta costarricense, introduciendo a la vez un método de control de calidad en dicha técnica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estandarización del método:

La técnica empleada se basa en el principio de las unidades hemolíticas CH50 de Mayer (24), descrita por Hudson y Hay (11), con algunas adaptaciones. Se recogió estérilmente sangre de carnero usando anticoagulante de Alsever; se dejó en reposo a 4° C por lo menos una semana antes de su uso, y se descartó en un plazo máximo de seis semanas. El mismo día de la prueba se lavó tres veces los eritrocitos (5 ml de sangre anticoagulada) con amortiguador de barbital (0,575 g de ácido dietilbarbitúrico, 0,376

* Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. San José - Costa Rica.

g de dietilbarbiturato sódico, 8,5 g de NaCl, 0,102 g de MgCl₂ · 6H₂O y 0,017 g de CaCl₂ por litro) a pH 7,6 ± 0,05. Luego se resuspendió los eritrocitos en 15 ml del amortiguador, para realizar el ajuste espectrofotométrico de la concentración. Para ésto se lisó 0,5 ml de la suspensión en 12,5 ml de agua destilada, y se leyó la absorbancia a 540 nm. Tomando como base que una lectura de 0,500 (en cubeta de 1 cm) equivale a un usado de suspensión al 6 por ciento de eritrocitos, se procedió a ajustar la suspensión original al 6 por ciento, corroborando siempre al final con un nuevo lisado.

La sensibilización de las células se realizó mezclando 15 ml de la suspensión anterior, 15 ml de amortiguador barbital, y 0,2 ml de hemolisina anti-eritrocito de carnero, producida en conejos (lote 2, Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica), durante 30 minutos a 37°C, para dar una dilución final de 1:300 de hemolisina (dilución original del reactivo 1:2 en glicerina). Cada suspensión de eritrocitos sensibilizados se preparó el mismo día de su utilización.

Se midió el C sérico en cincuenta y tres muestras de donadores del Banco de Sangre del Hospital Nacional de Niños y de personal de laboratorio (42 hombres y 11 mujeres), con edades entre los 18 y los 54 años (promedio 30 años). Las muestras se analizaron en un plazo máximo de dos horas, manteniéndolas a 4°C. El montaje de las mismas se realizó según el procedimiento que resume el Cuadro 1, a partir de una dilución de suero de 1:20 y trabajando cada una por duplicado. Se incubó los tubos 60 minutos a 37°C, mezclando cada 15 minutos. Se sumergieron luego en una bandeja de agua con hielo, y se les adicionó 3 ml de amortiguador barbital frío (4°C) a cada uno. Después de centrifugar 5 minutos a 500 g, se leyó la absorbancia de los

sobrenadantes a 540 nm, usando el amortiguador como blanco.

A la lectura de los tubos 1-5 se le restó la lectura del tubo 6, la cual no debe ser mayor de un 3 por ciento de hemólisis (9). Luego se calculó el grado de hemólisis (y) de cada tubo, dividiendo su absorbancia corregida entre la lectura del tubo 7. Con estos datos se graficó en papel logarítmico, el valor de y/1 -y (en la ordenada), correspondiente a cada volumen de suero, en ul. La recta se trazó sólo con valores de y/1 -y entre 0,1 y 10. Finalmente, se dividió 1000 entre los ul de suero correspondientes al valor y/1 -y de 1 (50% de lisis), para obtener el número de unidades hemolíticas 50% por ml de suero (U/ ml).

Control de calidad:

Se preparó una mezcla de 5 sueros normales, la cual se distribuyó en alícuotas de 0,2 ml. Estas se congelaron, se liofilizaron y se conservaron a 4°C, para ser usadas como suero control. Con los valores obtenidos para este suero en 20 determinaciones hechas en distintos días, se calculó el promedio y la desviación estándar, para trazar el gráfico de control. Se corrió un suero control, por duplicado, por cada lote de muestras analizadas.

Tipo de muestra y tiempo máximo para el análisis:

Aunque en todas las muestras evaluadas se utilizó suero, se hizo una comparación entre muestras de suero y de plasma-EDTA en cuatro individuos, con el fin de conocer si los resultados obtenidos con dichas muestras diferían.

Por otra parte, se hizo la determinación de CH₅₀ a cuatro muestras de suero mantenidas a 4°C durante diferentes tiempos (0, 3 y 6 horas). Todos los análisis fueron hechos por duplicado.

CUADRO 1

PROCEDIMIENTO DE MONTAJE DE LAS MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LÍTICA (CH₅₀) DEL COMPLEMENTO SÉRICO

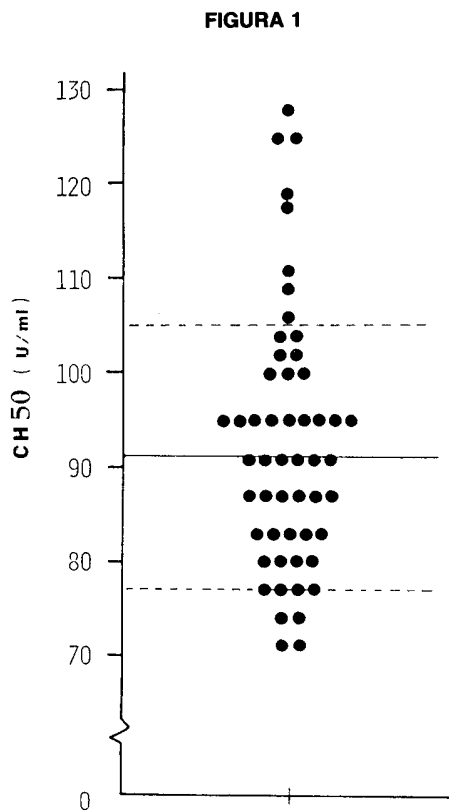
TUBO		1	2	3	4	5	6	7
Amortiguador	(ml)	1,1	1,05	1,0	0,9	0,8	1,2	1,2 (agua)
Suero 1:20 *	(ml)	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	—	—
EA**	(ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

* Las cantidades absolutas de suero correspondientes para graficar son 5 - 7,5 - 10 - 15 y 20 ul.

** Eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos.

RESULTADOS

Las curvas de hemólisis obtenidas mostraron una excelente linealidad. Los valores de CH50 de las 53 muestras analizadas se distribuyeron en un ámbito entre 71 y 128 U/ml, con un promedio de 93 U/ml y una desviación estándar de 14 U/ml (Figura 1).



Distribución de los valores de complemento hemolítico (CH50) sérico en 53 adultos sanos. Cada punto representa una determinación. Las líneas indican el promedio y la desviación estándar.

La comparación entre muestras de suero y plasma mostró una tendencia muy leve a dar valores más altos en plasma, obteniéndose diferencias de 1, 3, 4 y 9 U/ml, en los cuatro casos analizados.

En cuanto al tiempo transcurrido entre la obtención del suero y su análisis (manteniéndolo a 4°C) se observó fluctuaciones pequeñas en el valor CH50, sin un patrón definido (Figura 2).

Por último, el gráfico de control de calidad (Figura 3) mostró una amplia fluctuación del valor del suero control entre los distintos días, aunque los valores no salieron del límite de dos desviaciones estándar. Tampoco se dieron fenómenos de desplazamiento ni de tendencia (Figura 3). Una observación interesante fue el hallazgo de un donante de sangre, de 18 años, cuyo suero no mostró actividad hemolítica (0 U/ml) tanto por el método descrito, como por un método de hemólisis en gel de agarosa (9). Las determinaciones fueron repetidas, confirmándose los resultados. Sin embargo, no fue posible proseguir el estudio de este donador, por causas ajenas a nuestro control. Por considerarse anormal, este resultado no se incluyó en el conjunto de valores de referencia.

DISCUSIÓN

El presente método para la cuantificación de la actividad hemolítica del complemento, reúne una serie de características ventajosas para su utilización en rutina de laboratorio clínico

- Utiliza sólo cinco tubos por muestra, lo cual disminuye el trabajo.
- Las cinco concentraciones de suero utilizadas son obtenidas mediante diluciones directas, lo que evita la amplificación de la incertidumbre y la semicuantitatividad inherentes al uso de diluciones seriadas.
- El comportamiento lineal de la transformación logarítmica del gráfico es excelente con éste sistema. Esto origina a su vez, otras dos ventajas. En primer lugar, cualquier punto del gráfico entre 0,1 y 10 (y/1-y) que no concuerde con la línea, sugiere un posible error personal en la determinación, lo que permite auto-evaluarse. Por otro lado, aún con muestras en que se obtengan sólo dos puntos graficables, se tiene confiabilidad al calcular el valor CH50, tanto por interpolación como por extrapolación. A este respecto debe señalarse que el uso de gráficos de escala lineal (que generan curvas sigmoides), además de desaprovechar las ventajas señaladas en (c), proporciona valores de CH50 de menor exactitud (21); (ch) por último, la técnica no requiere de material de difícil adquisición.

Por otro lado, este método posee las limitaciones inherentes a las técnicas de CH50, tales como la relativamente baja sensibilidad para detectar disminuciones -a veces sustanciales- de uno o más componentes del sistema (9, 31) y la gran influencia que poseen pequeñas variaciones en pH, fuerza iónica, concentraciones de

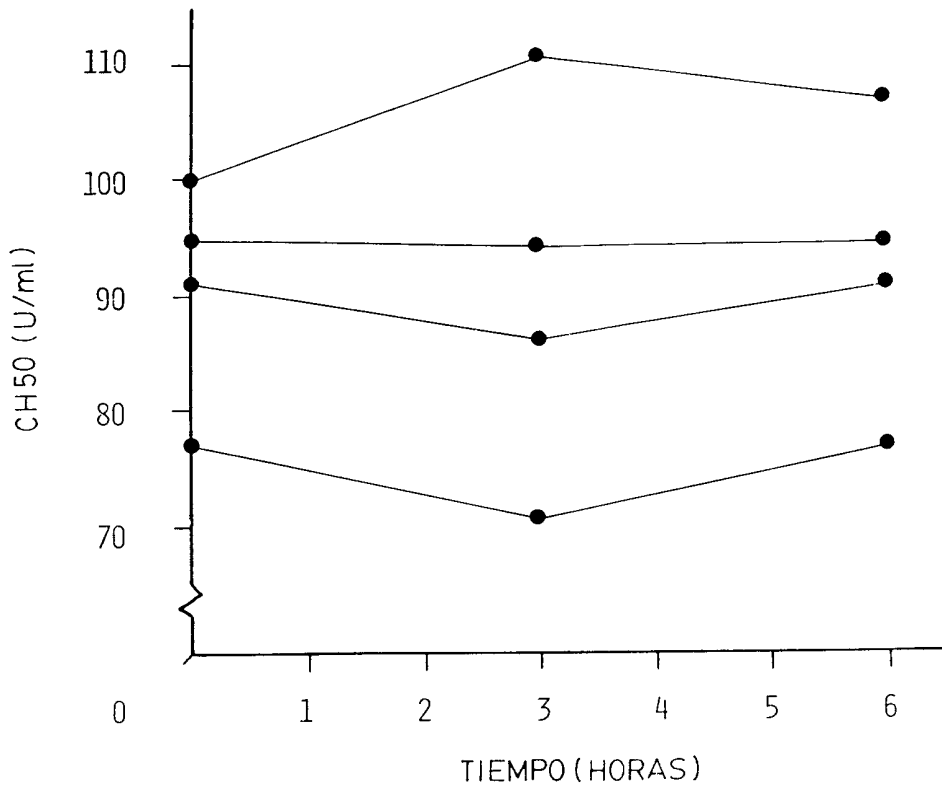


FIG. 2: Efecto del tiempo de conservación (a 4°C) sobre la actividad CH50 de 4 muestras de suero.

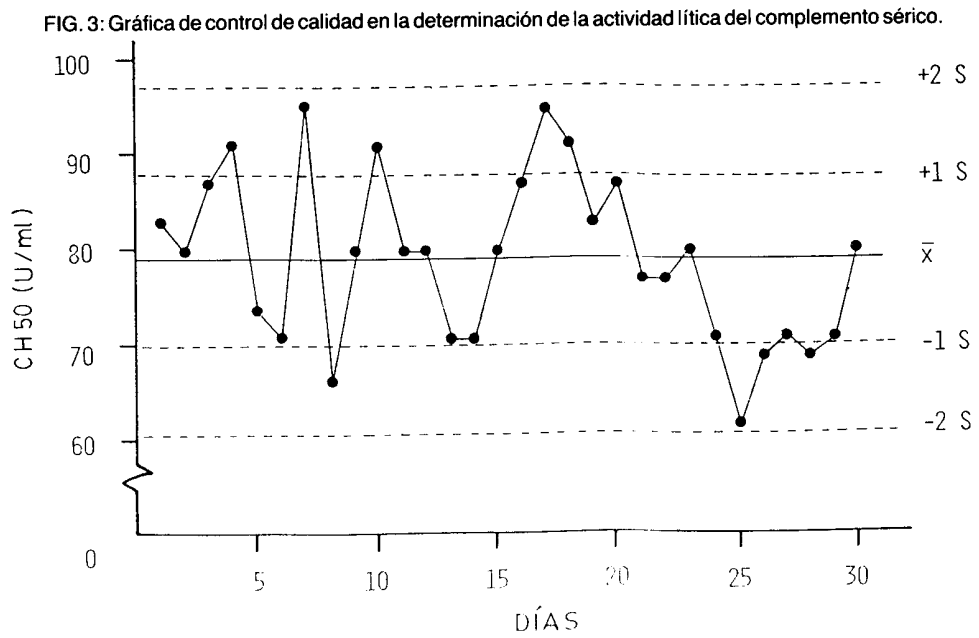


FIG. 3: Gráfica de control de calidad en la determinación de la actividad lítica del complemento sérico.

calcio y magnesio, número y fragilidad de los eritrocitos, tipo y cantidad de anticuerpos, temperatura y tiempo (9, 15). En general, la segunda desventaja puede minimizarse mediante una esmerada preparación de los reactivos y ejecución de la prueba, aunados a un sistema de control de calidad, mientras que la primera es una limitación inherente al método. Aún así, la determinación cuantitativa OH50 posee gran utilidad y valor funcional (9, 21, 23).

La importancia de la estandarización de ésta técnica queda ilustrada en el Cuadro 2, donde se observa la gran variabilidad de resultados que se obtiene con distintas modificaciones técnicas sobre el mismo fundamento metodológico. Esto obliga a estandarizar minuciosamente un procedimiento y establecer valores de referencia propios que permitan una adecuada interpretación de los resultados. Además, se ha señalado la importancia de contar con un control de calidad de esta determinación (31).

La comparación entre muestras de suero y de

plasma, así como entre muestras de suero cuantificadas a las 0, 3 y 6 horas (a 4°C), mostró que en general, las variaciones debidas a éstos factores son muy pequeñas y son menores que las fluctuaciones que puede tener una misma muestra analizada en distintos días. Es interesante la tendencia del plasma a dar valores ligeramente más altos que el suero, pues se ha descrito que en algunos pacientes, principalmente con enfermedades crónicas del hígado, se puede encontrar valores bajos de OH50 en suero, pero normales en plasma, por consumo durante la coagulación (12).

La importancia que posee la cuantificación del C funcional como ayuda diagnóstica y como evaluación del curso clínico, en enfermedades como el lupus eritematoso, la glomerulonefritis aguda postestreptocócica (18, 20, 27), la artritis reumatoide (2, 22), las hepatopatías, las septicemias, la endocarditis bacteriana subaguda (9), la vasculitis (23), la malaria (32), las leucemias (8) y muchas otras, hace necesario el con-

CUADRO 2

ALGUNOS VALORES DE REFERENCIA DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL COMPLEMENTO SÉRICO HUMANO (CH50) DESCRITOS EN LA LITERATURA

REFERENCIA	n	VALORES CH50 (U/ml)
Kohler y Müller-Eberhard (17)	25	39 ± 8 *
Kohler y ten Bonsel (18)	35	44 ± 6
Torisu <i>et al.</i> (40)	250	25,3–49,7 **
Sliwinsky y Zvaifler (37)	–	125 ± 25
Jordon <i>et al.</i> (14)	–	45 ± 8
Gewurz y Suyehira (9)	–	20–40
Inai <i>et al.</i> (12)	–	38,3–56,2
Koethe <i>et al.</i> (16)	–	89–132
Tannenbaum <i>et al.</i> (38)	50	200 ± 50
Wilson <i>et al.</i> (42)	12	65–107
Brown y Hobart (4)	–	180–360
Fong y Renaud (7)	–	100 ± 24
Lint (21)	–	20–40
Cunningham–Rundles y Cunningham–Rundles (5)	–	50–120
Fust <i>et al.</i> (8)	67	82,4 ± 18,3
Phanuphak <i>et al.</i> (32)	100	28 ± 6
Presente estudio	53	93 ± 14

* Promedio ± desviación estándar

** Ambito

tar con metodologías simples que se puedan ejecutar en prácticamente todos los laboratorios del país. Una solución que han propuesto diversos autores al problema de la gran cantidad de muestras para esta determinación, consiste en emplear una prueba semicuantitativa, a modo de tamizaje, mediante la técnica de hemólisis en gel. Las muestras que dan un valor bajo en dicho tamizaje se analizan nuevamente (con otra muestra) en forma cuantitativa por CH50 (7, 9,21). Los resultados preliminares en nuestro laboratorio y en otros (Drs. Olman Riggioni y Jorge Fonseca, comunicación personal) muestran las ventajas de dichas técnicas, al requerir de poco material y tiempo para analizar gran número de muestras. Dada su versatilidad, sería importante la estandarización y divulgación de los métodos de hemólisis en gel, para la evaluación semicuantitativa del complemento hemolítico humano.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las personas que donaron muestras para la realización de éste estudio, al personal del Banco de Sangre del Hospital Nacional de Niños y especialmente al Dr. César Bonilla E. por su amplia colaboración. Al personal del Instituto Clodomiro Picado y en especial al Sr. Abel Robles H. por su valiosa ayuda en materia de computación, a la Srta. Rocío Monge por el trabajo mecanográfico.

ABSTRACT

A simple and quantitative method for the measurement of hemolytic activity of complement (CH50) is proposed. With this method, we studied a sample of 53 healthy adults. Values obtained ranged between 71 and 128 U/ml, with a mean of 93 U/ml and a standard deviation of 14 U/ml. A method for quality control is introduced in the technique.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. The complement system. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York, 1983; 988-993.
2. Alpert, E., Isselbacher, K.J. y Schur, P.H. The pathogenesis of arthritis associated with viral hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 1971; 285:185-189.
3. Ballow, M. Phylogenetics and ontogenetics of the complement systems. *Comprehensive Immunology*. vol. 2: *Biological amplification systems in immunology*, Good, R.A. y Day, S.B., Eds. Plenum Medical Book Co., New York, 1977:183-204.
4. Brown, D. y Hobart, M.J. Complement and complement fixation tests *Techniques in Clinical Immunology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1977; 65-83.
5. Cunningham-Rundles, C. y Cunningham-Rundles, W.F. Immunodeficiency disorders. *Immunodiagnosis for Clinicians*, Grieco, M.H. y Meriney, D.K., Eds. Year Book Medical Publishers, Chicago, 1983; 336-364.
6. Eisen, H. Complement. *Microbiology*, Davis, B. Dulbecco, R., Eisen, H. y Ginsberg, H.S., Eds. Harper and Row. Publishers, Philadelphia, 1980; 452-466.
7. Fong, J.S.C. y Renaud, L. A hemolytic plate method for alternative pathway complement activity assay. *Amer. J. Clin. Path.* 1978; 69:156-160.
8. Füst, G., Czink, E., Minh, D., Miszalay, Z., Varga, L. y Hollan, S. Depressed classical complement pathway activities in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. exp. Immunol.* 1985; 60:489-495.
9. Gewurz, H. Y Suyehira, L.A. Complement. *Manual of Clinical Immunology*. Rose, N.R. y Friedman H., Eds. American Society for Microbiology, Washington, 1976; 36-47.
10. Hood, L.E., Weissman, I.L. y Wood, W.B. *Immunology*. The Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park, 1978; 46-56.
11. Hudson, L. y Hay, F.C. *Practical Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1976:134-139.
12. Inai, S., Kitamura, H., Fujita, T., Kojima, J. y Nagaki, K. Differences between plasma and serum complement in patients with chronic liver disease. *Clin. exp. Immunol.* 1976, 25:403-409.
13. James, K. Complement: activation, consequences, and control. *Am. J. Medical Technol.* 1982; 48:735-742.
14. Jordon, R.E., Mc. Duffie, F.C., Good, R.A. y Day, N.K. Diffuse normolipemic plane xanthomatosis. An abnormal complement component profile. *Clin. exp. Immunol.* 1974; 18: 407-415.
15. Kent, J.F. y Fife, E.H. Precise standardization of reagents for complement fixation. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1963; 12:103-116.
16. Koethe, S.M., Casper, J.T. y Rodey, G.E. Alternative complement pathway activity in sera from patients with sickle cell disease. *Clin. exp. Immunol.* 1976; 23:56-60.
17. Kohler, P.F. y Müller-Eberhard, H.J. Immunochemical quantitation of the third, fourth and fifth components of human complement: concentration in the serum of healthy adults. *J. Immunol.* 1967; 99:1211-1216.
18. Kohler, P.F. y ten Bonsel, A. Serial complement component alterations in acute glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. exp. Immunol.* 1969; 4:191-202.
19. Lachmann, P.J. y Hobart, M.J. Complement technology. *Handbook of experimental immunology*, vol. 1: *Immunochimistry*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1978; 5 A.1.
20. Lewis, E.J., Carpenter. C.B. y Schur, PH. Serum complement component levels in human glomerulonephritis. *Ann. Internal Med.* 1971; 75:555-560.

21. Lint, T.F. Laboratory detection of complement activation complement deficiencies. *Am. J. Medical Technol.* 1982; 48:743-748.
22. Lundh, B., Hedberg, H. y Laurell, A.B. Studies of the third component of complement in synovial fluid from arthritic patients. I immunochemical quantitation and relation to total complement. *Clin exp. Immunol.* 1970; 6:407-411.
23. Luskin, A. T. Alterations of complement components in disease. *Am. J. Medical Technol.* 1982; 48:749-756.
24. Mayer, M.M. Complement and complement fixation. *Experimental Immunochemistry*. kabat, E.A. y Mayer, M.M., Eds. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, 1961; 133-240.
25. Mayer, M. The complement system. *Sci. Am.* 1973; 229:54-66.
26. Mayer, M.M. Membrane damage by complement. *The Johns Hopkins Medical Journal* 1981; 148:243-258.
27. Meri, S. Complement activation by circulating serum factors in human glomerulonephritis. *Clin. exp. Immunol.* 1985; 59:276-284.
28. Ngan, B.Y., Gelfand, E.W. y Minta, J.O. A simple one-step hemolytic assay for C2 with C2-deficient human serum. *J. Immunol.* 1977; 118:736-741.
29. Organización Mundial de la Salud. Nomenclature of complement. *Bull. Wld. Health Org.* 1969; 39:935-938.
30. Organización Mundial de la Salud. Nomenclature of the alternative activating pathway of complement. *J. Immunol.* 1981; 127:1261-1262.
31. Organización Mundial de la Salud. Uso y abuso de ocho procedimientos de diagnóstico muy difundidos en inmunología clínica. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 1983:94:83-102.
32. Phanuphak, P., Hanvanich, M., Sakulramrung, R., Moollaor, P., Sitprija, V. y Phanthumkosol, D. Complement changes in falciparum malaria infection *Clin. exp. Immunol.* 1985; 59:571-576.
33. Podack, E. R. y Tschopp, J. Membrane attack by complement *Molec. Immunol.* 1984; 21:589-603.
34. Roitt, I.M. y Lehner, T. *Immunology of oral diseases*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1980; 138-148.
35. Roitt, I.M. *Essential Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1984; 164-169.
36. Salihi, A.A., Joisel, F. y Fontaine, M. Sensitive one-step hemolytic assays of the fourth (C4) and fifth (C5) components of the human complement system. *Ann. Immunol. Inst. Pasteur* 1982; 133 c: 299-307.
37. Sliwinski, A.j. y Zvaifler, N.J. Decreased synthesis of the third component of complement (C3) in hypocomplementemic systemic lupus erythematosus. *Clin. exp. Immunol.* 1972; 11:21-29.
38. Tannenbaum, H., Rocklin, R. E. Schur, P.H. y Sheffer, A.L. Immune function in sarcoidosis. Studies on delayed hypersensitivity, B and T lymphocytes, serum immunoglobulins and serum complement components. *Clin. exp Immunol.* 1976; 26:511-519.
39. Thompson, R.A. y Rowe, D.S. Immune haemolysis in agar: demonstration of the protective action of antibodies. *Immunology* 1967; 13:411-420.
40. Torisu, M., Yokoyama, T., Kohler, P.F., Durst, A.L. Martineau, G., Schroter, G., Amemiya, H., Groth, C.G. y Starzl, T.E. Serum complement after orthotopic transplantation of the human liver. *Clin. exp. Immunol.* 1972; 12:21-30.
41. Volk, V. Complement and Complement Fixation. *Essentials of Medical Microbiology*. J.B. Lippincot Company. Philadelphia, 1982; 233-247.
42. Wilson, M.R., Arroyave, C.M., Nakamura, R.M., Vanghan, J.H. y Tan, E.M. Activation of the alternative complement pathway in systemic lupus erythematosus. *Clin. exp. Immunol.* 1976; 26:11-20.