

Réactif de l'Isoenzyme CK-MB



CARACTÉRISTIQUES DU PRODUIT

Stabilité	:	7 jours entre 2 et 8°C
Plage de mesure	:	Jusqu'à 1000 U/L
Nature de l'échantillon	:	Sérum
Méthode	:	Cinétique
Préparation du réactif	:	Ajouter le volume spécifié de tampon.

IVD

UTILISATION PRÉVUE

Ce réactif est prévu pour la quantification in vitro de la CK-MB (CK-2) dans le sérum humain.

INTERET CLINIQUE^{1,2}

La créatine kinase (ATP : créatine N-phosphotransférase, EC2.7.3.2) est une enzyme dimère composée de deux types de sous-unités monomères, M (musculaire) et B (cerveau). Les sous-unités se combinent pour former trois isoenzymes de CK distincts, CK-BB (CK-1), CK-MB (CK-2) et CK-MM (CK-3). CK-MM est la forme de CK prédominante dans le muscle squelettique. CK-BB se trouve dans le cerveau et le muscle lisse. CK-MB est présente sous une concentration élevée dans le myocarde (entre 14 et 42%) et à un moindre degré dans les muscles squelettiques. En l'absence de maladie, la majeure partie de l'activité de la CK dans le sérum est due à l'isoforme CK-MM.

Des lésions du myocarde, comme il s'en produit dans l'infarctus du myocarde aigu (AMI), augmentent les niveaux de l'isoforme CK-MB circulante. Typiquement les niveaux de CK-MB s'élèvent 4 à 6 heures après le déclenchement de la douleur thoracique, la crête survenant entre 12 et 24 heures et le retour à une ligne de base dans un délai de 48 heures. La détermination de la CK-MB se fait habituellement lors de l'admission et 6 heures, 12 heures, et 24 heures plus tard, elle est recommandée si un AMI est suspecté.

PRINCIPE DE LA METHODE

Il existe un certain nombre de méthodes pour séparer et quantifier la CK-MB par électrophorèse et immunoinhibition. Les méthodes par immunoinhibition présentent l'avantage de s'automatiser facilement. La méthode CK-MB de Thermo Scientific utilise une méthode d'immunoinhibition. Le réactif contient un mélange d'anticorps monoclonaux et de monomères CK-M et il inhibe donc totalement l'activité de CK-MM et la moitié de l'activité de CK-MB. L'activité de la sous-unité du monomère B de la CK-MB est mesurée, elle représente la moitié de l'activité de la CK-MB. La méthode suppose que l'activité de l'isoenzyme CK-BB dans le sérum est pratiquement nulle. Dans cette méthode, le sérum est ajouté à un réactif de la CK-NAC modifié qui contient l'anticorps anti M. Pendant l'incubation initiale, les réactions suivantes se produisent :

- CK-MM + anticorps → CK-MM inhibée
CK-MB + anticorps → 50% CK-MB inhibée
- CK-B inactivée → NAC → CK-B activée

L'activité de CK-B se détermine à l'aide de la séquence de réactions suivante :

- Phosphate de créatine + Mg-ADP $\xrightarrow{CK-B}$ Créatine + ATP
- ATP + Glucose \xrightarrow{HK} Glucose-6-phosphate + ATP
- G6P + NADPH⁺ $\xrightarrow{G6PDH}$ 6-GP + NADPH

L'adénylate kinase (Myokinase) est inhibée par l'AMP et la PⁱP⁵-diAP

- 2ADP + NADPH⁺ $\xrightarrow{AK} //$ AMP + ATP

Abréviations :

ADP	= Adénosine-5'-diphosphate
ATP	= Adénosine-5'-triphosphate
HK	= Hexokinase
G-6-P	= Glucose-6-phosphate
NADPH ⁺	= Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
G-6-PDH	= Glucose-6-phosphate deshydrogénase
6-PG	= 6-Phosphogluconate
NADPH	= NADP réduite
AMP	= Adénosine-5'-monophosphate
AK	= Adénylate Kinase
P ⁱ P ⁵ -diAP	= P ⁱ P ⁵ -Di(adénosine-5'-) pentaphosphate

COMPOSITION DU RÉACTIF

Ingrédients actifs

Mélange d'anticorps CK-monoclonaux humains suffisant pour inhiber jusqu'à 2000 U/L de CK-M à 37°C.

	Concentration
Imidazole acétate	100 mmol/L
AMP	5 mmol/L
NADP	2 mmol/L
P ⁱ P ⁵ -diAP	10 mmol/L
EDTA	2 mmol/L
Acétate de Mg	10 mmol/L
ADP	2 mmol/L
D-Glucose	20 mmol/L
NAC	20 mmol/L

SYMBOLES DE L'ÉTIQUETAGE DU PRODUIT

	Représentant Autorisé		Limites de température
	Utilisation en diagnostique in vitro		Utiliser jusque
	Numéro de lot		ATTENTION: Consulter les instructions d'utilisation
	Référence catalogue		Fabriqué par
	Consulter les instructions d'utilisation		Réactif A
	Réactif A		Réactif B

Phosphate de créatine	30 mmol/L
Hexokinase (levure)	>3 000 U/L
G-6-PDH (leuconostoc)	>2 000 U/L
Contient également des compléments et stabilisateurs inertes.	
pH 7,00 ± 0,2 à 20°C	

PRECAUTIONS: Ne pas ingérer. Eviter tout contact avec les yeux. En cas de débordements ou de coulures rincer les surfaces affectées à l'eau. Afin d'éliminer toutes traces de réactif, rincer avec de grandes quantités d'eau. La fiche de sécurité sur le Réactif de l'Isoenzyme CK-MB contient des informations plus détaillées. L'emballage de ce produit contient du caoutchouc naturel sec. Manipuler avec précaution les serrissages et les fioles en verre cassées, car les bords acérés peuvent blesser l'utilisateur.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Reconstituez le réactif A avec le volume de tampon, le réactif B, indiqué sur l'étiquette du flacon. Mélanger doucement jusqu'à dissolution.

STABILITÉ ET CONSERVATION

Avant utilisation:

Lorsqu'il est conservé réfrigéré à 2-8°C, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon ou du coffret.

Réactif reconstitué:

Stocké entre 2 et 8°C, le réactif est stable pendant au moins 7 jours.

Indications de la détérioration du réactif:

- Turbidité,
- Absorbance >0,7 à 340 nm (1cm); et/ou
- Impossibilité d'obtenir les valeurs de contrôle dans leur fourchette de tolérance.

PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS^{3,4}

Collecte: on recommande, en cas d'AMI probable, de collecter le sang pour la détermination de la CK-MB lors de l'admission puis après 6 heures, 12 heures et 24 heures. Le nombre minimal absolu d'échantillons est 2 obtenus 12 et 24 heures après le déclenchement des symptômes.

Sérum: Utilisation de sérum non-hémolysé.

Plasma: non recommandé. L'héparine, l'EDTA, les fluorures et les citrates inhibent l'activité de la CK.

Stockage: la CK est stable pendant 1 jour à 4°C. La stabilité peut varier légèrement en fonction de chaque sérum, elle dépend cependant de la distribution des isoenzymes et de l'état acide-base du patient. Pour un stockage plus long, congeler à -20°C.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Le cas échéant, des pipettes pour répartir précisément les volumes mesurés.
- Un analyseur de biochimie capable de maintenir une température constante (37°C) et de mesurer une absorbance à 340 nm.
- Consommables nécessaires au fonctionnement de l'analyseur, par ex.: cupules échantillon.
- Sérum de contrôle normal et pathologique.

PROCÉDURE DE DOSAGE

Les paramètres de système suivants sont recommandés. Des applications d'instruments individuelles sont disponibles sur demande auprès du groupe de support technique.

PARAMÈTRES DU SYSTÈME

Température	30 ° 87 °C
Longueur d'onde	340 nm (334, 365 nm)
Type de dosage	Taux/Cinétique
Direction	Augmentation
Échantillon: taux de réactif	1 : 20
p. ex.: Volume de l'échantillon	10 µL
Réactif Vol.	200 µL
Délai/Retard	300 secondes
Temps de lecture	300 secondes
Limites du blanc du réactif	Basse 0,0 AU
(340 nm, chemin optique de 1 cm)	Haute 0,7 AU
Linéarité	Jusqu'à 1000 U/L
(voir la section linéarité)	
Sensibilité Analytique	0,15 ΔmA/min par U/L
(340 nm, chemin optique de 1 cm)	

CALCULS

Les résultats sont calculés directement par l'analyseur selon la formule suivante:

Activité en U/L = ΔAbs/min x Facteur

$$\text{Facteur} = \frac{\text{TV} \times 1000}{6,3 \times \text{SV} \times \text{P}} \times 2$$

Où : TV = Volume total de la réaction en mL
 SV = Volume de l'échantillon en mL
 6,3 = Coefficient d'absorption millimolaire du NADH à 340 nm (Voir note 4).
 P = Longueur de chemin de cuvette en cm.
 2 = la multiplication de la valeur de CK-B par 2 donne une estimation de l'activité de la CK-MB.

Pourcentage de CK-MB :

$$\% \text{ activité CK-MB} = \frac{\text{CK-MB U/L}}{\text{Total CK U/L}} \times 100$$

Exemple : CK totale = 350 U/L
 CK-MB = 53 U/L

$$\% \text{ activité CK-MB} = \frac{53 \text{ U/L}}{350 \text{ U/L}} \times 100$$

% activité CK-MB = 15%

REMARQUES

- Les volumes de réactifs et d'échantillon peuvent être modifiés en respectant leur proportionnalité afin de s'adapter aux caractéristiques de chaque analyseur de biochimie.
- La CK totale doit être évaluée d'abord avec le réactif de la CK Thermo Scientific à flacon unique IFCC ou avec le réactif de la CK IFCC à deux flacons. Si la variation de l'absorbance est supérieure à 0,55/min, refaire le dosage avec un sérum dilué. Cependant, la fraction de volume du sérum dans le système de la réaction de la CK est critique. Les modifications de la fraction de volume, par exemple dans une dilution préalable de l'échantillon, ne produisent pas de modifications stoechiométriques dans le taux de réaction. Si une dilution est nécessaire, 150 mmol/L de NaCl sont recommandés. À une dilution de 1:2, une augmentation apparente de la CK au maximum de 10% peut être prévue^{6,8}. Sinon, un lot de sérum sans CK peut servir pour la dilution. Le sérum sans CK peut être produit en chauffant le sérum à 56°C pendant deux heures.
- La validité des résultats dépend de la précision de l'étalonnage de l'appareil, de la synchronisation et du contrôle de la température.
- Le coefficient d'absorption millimolaire du NADH à 334 nm = 6,18 et à 365 nm = 3,40.
- Conversion d'unité : U/L x 16,67 x 10⁻³ = µkat/L

CALIBRAGE

Non requis . Le taux de réaction est converti en U/L d'activité par un facteur de calcul. Voir la section Calcul du présent insert d'emballage.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Afin d'assurer un contrôle de qualité approprié, utiliser un contrôle normal et un contrôle pathologique au moins une fois toutes les huit heures, mais également dans les contextes suivants :

- Au moins une fois par jour ou conformément aux instructions du laboratoire.
- Lorsqu'un nouveau flacon de réactif est utilisée.
- Après une maintenance préventive ou le remplacement d'un des composants fondamentaux de l'analyseur.

Si les résultats de contrôle ne sortent pas dans leur fourchette de tolérance, procéder alors aux actions suivantes :

- Répéter les mêmes contrôles.
- Si les résultats sont encore , en dehors de leur fourchette de tolérance préparer un sérum de contrôle frais et recommencer le test.
- Si les résultats restent hors des limites sur un matériau de contrôle frais, répéter le test avec un réactif neuf.
- Si malgré ces opérations les résultats de contrôle restent en dehors de leur fourchette de tolérance, contactez notre service Applications.

LIMITES DE LA PROCEDURE

- Les études pour déterminer le niveau d'interférence de l'hémoglobine, de la bilirubine et de la lipémie ont été effectuées avec un analyseur de biochimie automatisé. Les résultats suivants ont été obtenus:
Hémoglobine: Les échantillons hémolysés doivent être évités pour minimiser l'interférence de l'adénylate kinase et d'autres réactions intermédiaires telles que l'ATP et la G-6-P.⁷
Bilirubine: Aucune interférence de la bilirubine jusqu'à 340 µmol/L (20 mg/dL).
Lipémie: aucune interférence avec la lipémie, mesurée comme triglycérides, jusqu'à 2,4 mmol/L (210 mg/dL).
- La CK-BB éventuellement présente dans le sérum est un facteur d'interférence potentielle dans ce système de dosage. Les études ont montré que la CK-BB n'apparaît que rarement dans le sérum⁸.
- Il a été également montré que des isoenzymes de CK atypiques interfèrent avec ce système de dosage. Une forme particulière, un complexe de CK-BB et d'immunoglobuline G (macro CK de type 1), se rencontre plus fréquemment chez les femmes âgées. La présence de CK atypiques ne diminue pas la valeur du système de dosage car le modèle des enzymes présente un état stable dans le temps. Dans le cas d'un AMI probable, les valeurs de CK-MB augmentent puis reviennent à des niveaux normaux en 48 heures⁹.
- Young DS a publié une liste complète de médicaments et de substances pouvant interférer avec ce dosage.⁹

VALEURS ATTENDUES^{10,11}

CK totale À 37°C Hommes <200 U/L Femmes <180 U/L
 À 30°C Hommes <130 U/L Femmes <113 U/L

CK-MB À 37°C <25 U/L
 À 30°C <16 U/L

% CK-MB Un taux de CK-MB de 6 à 25% est compatible avec un infarctus du myocarde aigu (voir la limitation 3).

Les valeurs indiquées ne représentent que la plage prévue pour cette méthode et ne sont que des indications. Il est recommandé à chaque laboratoire de vérifier sa plage ou de dériver un intervalle de référence pour la population qu'il sert.

MESURES

Les données suivantes ont été obtenues avec le réactif de la CK-MB sur un analyseur de biochimie automatisé.

IMPRÉCISION

L'imprécision a été évaluée avec deux niveaux de contrôle du commerce en respectant la procédure NCCLS EP5-T.¹²

Dans la session	NIVEAU I	NIVEAU II
Nombre de points de données	80	80
Moyenne (U/L)	37	156
SD (U/L)	1,7	2,5
CV (%)	4,6	1,6

D'un jour à l'autre	NIVEAU I	NIVEAU II
Nombre de points de données	80	80
Moyenne (U/L)	37	156
SD (U/L)	1,3	3,3
CV (%)	3,4	2,1

COMPARAISON DE METHODES

Des études comparatives ont été menées avec un autre réactif du commerce similaire comme référence. Des échantillons de sérum ont été dosés en parallèle et les résultats comparés par régression du moindre carré. Les statistiques suivantes ont été obtenues.

Nombre d'échantillons en double	66
Plage de mesures des échantillons	4 - 227 U/L
Moyenne des mesures (référence)	45 U/L
Moyenne des résultats de l'CK-MB	44 U/L
Pente	0,96
Coordonnées à l'origine	1,5 U/L
Coefficient de Corrélation	0,999

PLAGE DE MESURE

Effectué selon les recommandations, le dosage est linéaire jusqu'à 1000 U/L.

SPÉCIFICITÉ

Les études effectuées sur l'inhibition indiquent que le réactif de l'isoenzyme CK-MB inhibe efficacement plus de 99% de l'activité totale de la CK-MM dans un échantillon comprenant 2000 U/L de CK-MM.


SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

Utilisé selon les prescriptions, la sensibilité de ce dosage est de 0,15 ΔmV/min par U/L.

RÉFÉRENCES

- Bremmer FW. Cardiac disease and hypertension in "Clinical chemistry theory, analysis and correlation." Kaplan L and Pesce A (Ed) CV Mosby company, 1987.
- Chapman JF, Woodard LL and Silverman LM. Creatine kinase isoenzymes in Clinical Chemistry theory, analysis and correlation." Kaplan L and Pesce A (Ed) CV Mosby company, 1987.
- Bremer WF. Cardiac Disease and Hypertension in Clinical Chemistry theory, analysis and correlation." Kaplan L and Pesce A (Ed) CV Mosby company, 1987;28:500-501.
- Hørdér M., Elser R.C., Gerhardt W., et al. Journal of the IFCC 1989; 1:130-8.
- Strömme JH et al. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1976; 36:711-23.
- Stein W. CK-MB methods and clinical significance. Proceedings of the CK-MB symposium, Philadelphia, 1981; 61-74.
- Burtis CA, Ashwood ER, "Tietz textbook of Clinical Chemistry" Second Edition, 1994; 805.
- Mattenheimer H. CK-MB methods and clinical significance. Proceedings of the CK-MB symposium, Philadelphia, 1981; 51-59.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests. Third edition, 1990; 3: 120-22.
- Bais R, et al. Pathology 1988; 20:367-72.
- Henderson AR et al. Clin Chem. 1992; 38/7:1365-1370.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. User evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. NCCLS; 1984, NCCLS Publication EP5-T.

© 2008 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. ILab 600 is a registered trademark of Instrumentation Laboratory Company, Lexington, MA 02421. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

 Fisher Diagnostics
 a division of Fisher Scientific Company, LLC
 a subsidiary of Thermo Fisher Scientific Inc.
 Middletown, VA 22645-1905 USA
 Phone: 800-528-0494
 540-869-3200
 Fax: 540-869-8132

 MDCI Ltd.
 Arundel House
 1 Liverpool Gardens
 Worthing, West Sussex BN11 1SL UK

REF	Information Commandes	
	No de Catalogue	REAG A REAG B
	TR14314	20 x 5 mL 1 x 100 mL
	TL14301 (ILab 600)	20 x 20 mL 1 x 400 mL