

Reagente CK-NAC - Fiala Singola di IFCC

(Creatina chinasi, attivata da N-acetil cisteina)

SOMMARIO DEL PRODOTTO

Stabilità	:	7 giorni a 2-8°C
Intervallo lineare	:	Fino a 1500 U/L
Tipo di campione	:	Siero
Metodo	:	Cinetica
Preparazione reagente	:	Aggiunta del volume del tampone specificato.

IVD

USO PREVISTO

Questo reagente consente la determinazione quantitativa in vitro di CK (ATP: Creatina N-fosfotransferasi, EC 2.7.3.2) nel siero umano mediante sistemi manuali o automatici.

IMPORTANZA CLINICA

La creatina chinasi (CK) è un enzima dimerico composto da due tipi di subunità monomeriche, M (muscolare) e C (Cervello) che si combinano per formare tre isoenzimi CK distinti, CK-1 (CC), CK-2 (MC) e CK-3 (MM). La percentuale maggiore di attività totale della CK si trova nei muscoli scheletrici ed è costituita principalmente dall'isoforma CK-3. Altri tessuti con un livello relativamente elevato di CK includono il miocardio, costituito per il 40% circa dall'isoforma CK-2, il tratto gastrointestinale e il cervello dove predomina l'isoforma CK-1. Danni o disturbi a uno di questi tessuti come distrofia muscolare, infarto del miocardio e ictus provocheranno un aumento nel sangue del livello dell'enzima.

METODOLOGIA^{1,2,3}

Il reagente CK-NAC, IFCC a fiala singola si basa sui principi della procedura consigliata di IFCC.

La serie di reazioni interessata dal sistema di analisi è la seguente:

- 1) CK inattivato + NAC \longrightarrow CK riattivato
- 2) Creatina fosfato + Mg-ADP \xrightarrow{CK} ATP + Creatina
- 3) ATP + Glucosio \xrightarrow{HK} ADP + G-6-P
- 4) G-6-P + NADPH⁺ $\xrightarrow{G6PDH}$ 6-PG + NADPH + H⁺
- 5) 2ADP \xrightarrow{AK} // \longrightarrow AMP + ATP
(inibito da P¹P⁵-diAP e AMP)

1. Poiché la CK nel siero viene inattivata molto rapidamente, per garantire la completa attività catalitica occorre riattivare la molecola di CK tramite un composto di tiolo. Durante la prima fase, il campione viene incubato con il composto di tiolo N-acetil cisteina (NAC), che riattiva la molecola di CK riducendo rapidamente i composti di sulfidrilici ossidati nel sito attivo.
2. Nella seconda fase, il substrato di creatina fosfato avvia una serie di reazioni catalizzate. Nella prima di tali reazioni, la CK catalizza la formazione di ATP da creatina fosfato e ADP.
3. L'ATP formata alla fase 2 è utilizzata per formare glucosio-6-fosfato in una reazione catalizzata dall'esochinasi.
4. Il glucosio-6-fosfato prodotto alla fase 3 viene ossidato in 6-fosfogluconato e la NADP viene ridotta in NADPH in una reazione catalizzata dalla Glucosio-6-fosfato deidrogenasi.
5. AMP e P¹P⁵-Di(adenosina-5'-) pentaosfato (P¹P⁵-diAP) sono aggiunti per inibire l'attività dell'adenilato chinasi (miochinasi).

Abbreviazioni:

ADP	=	Adenosina-5'-difosfato
ATP	=	Adenosina-5'-trifosfato
HK	=	Esochinasi
G-6-P	=	Glucosio-6-fosfato
NADP ⁺	=	Nicotinamide Adenina Dinucleotide Fosfato
G-6-PDH	=	Glucosio-6-fosfato deidrogenasi
6-PG	=	6-fosfogluconato
NADPH	=	NADP ridotta
AMP	=	Adenosina-5'-monofosfato
AK	=	Adenilato chinasi
P ¹ P ⁵ -diAP	=	P ¹ P ⁵ -Di(adenosina-5'-)pentaosfato

COMPOSIZIONE DEL REAGENTE

Ingredienti attivi

AMP	5,25 mmol/L
NADP	2,2 mmol/L
P ¹ P ⁵ -diAP	10,5 µmol/L
EDTA	2,1 mmol/L
Mg ²⁺	11,6 mmol/L

Concentrazione

SIMBOLI DI ETICHETTATURA PRODOTTO

EC REP	Rappresentante autorizzato		Limite di temperatura
IVD	Per uso diagnostico in vitro		Usare entro/Data di scadenza
LOT	Codice/Numero lotto		AVVERTENZA. Consultare le istruzioni d'uso.
REF	Numero catalogo		Prodotto da
	Consultare le istruzioni d'uso		Reagente B
REAG A	Reagente A		Contiene mercurio

ADP	2,1 mmol/L
D-Glucosio	21 mmol/L
N-acetil-l-cisteina	21 mmol/L
Esochinasi (lievito)	>3000 U/L
G-6-PDH (Leuconostoc)	>2000 U/L
Imidazole Acetate	116 mmol/L
Creatina fosfato	31,5 mmol/L
pH 6,75 ± 0,1 a 20°C.	

AVVERTENZA: Non ingerire. Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. In caso di versamento, lavare l'area interessata con abbondante acqua. Contiene mercurio: smaltire in conformità con le normative locali e nazionali. Per maggiori informazioni, consultare la documentazione di sicurezza del reagente CK-NAC - Fiala Singola di IFCC. La confezione di questo prodotto contiene gomma naturale solida. Manipolare eventuali fiale di vetro rotte con cautela, in quanto i bordi taglienti possono ferire l'utilizzatore.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE

Ricostituire il reagente A con il volume del tampone, del reagente B, indicato sull'etichetta del flacone. Miscelare fino a dissolverlo.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Prima dell'uso:

Se conservato in frigorifero a una temperatura di 2-8°C il reagente è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla bottiglia e sull'etichetta della scatola del kit.

Reagente ricostituito:

Se conservato chiuso a una temperatura di 2-8°C il reagente è stabile per almeno 7 giorni.

Indicazioni del deterioramento del reagente:

- Torbidità.
- Assorbanza del reagente >0,6 AU a 340nm (1 cm percorso della luce) e/o;
- Mancato recupero dei valori di controllo nell'intervallo assegnato.

RACCOLTA E MANIPOLAZIONE CAMPIONI'

Siero: Utilizzare siero non emolizzato.

Plasma: Evitare l'uso di plasma contenente eparina. EDTA, citrato o fluoruro.

Conservazione: La CK è stabile per 1 giorno a 4°C. La stabilità può variare a seconda del siero e dipende dalla distribuzione dell'isoenzima e dallo stato della base acida del paziente.

STRUMENTAZIONE AGGIUNTIVA NECESSARIA NON FORNITA

- Se necessario, pipette per il dosaggio accurato dei volumi misurati.
- Un analizzatore chimico clinico in grado di mantenere la temperatura costante (37°C) e misurare l'assorbanza a 340 nm.
- Materiali di consumo specifici per l'analizzatore, ad es.: contenitore campioni.
- Materiale di controllo analizzato normale e anormale

PROCEDURA DI ANALISI

Si consiglia di attenersi ai seguenti parametri di sistema. Singole applicazioni strumentali sono fornite su richiesta dal Gruppo di assistenza tecnica.

PARAMETRI DI SISTEMA

Temperatura	37°C
Lunghezza d'onda primaria	340 nm (334, 365 nm)
Lunghezza d'onda secondaria	405nm
Tipo di analisi	Velocità/Cinetica
Direzione	Aumento
Campione: Rapporto reagente	1 : 20
ad es. Vol. campione	0,05 mL
Vol. reagente	1,0 mL
Ritardo	120 secondi
Tempo di lettura	3 minuti

Limiti Blank del Reagente (340nm, 1cm percorso della luce) Bassi 0,0 UA
 (340nm, 1cm percorso della luce) Altri 0,6 UA
 Linearità Fino a 1500 U/L
 (fare riferimento alla sezione Linearità)
 Sensibilità 0,30 ΔmA/min per U/L
 (340nm, 1cm percorso della luce)

CALCOLO

I risultati vengono solitamente calcolati automaticamente dallo strumento come segue:

Attività in U/L = ΔAbs/min x Fattore

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

Dove: TV = Volume di reazione totale in mL
 SV = Volume campione in mL
 6,3 = coefficiente di assorbanza millimolare di NADH a 340 nm (Vedere nota 4).
 P = Lunghezza di percorso della cuvetta in cm.

Esempio: ΔAbs/min = 0,027
 Fattore = 3333
 CK = 0,027 x 3333 = 90 U/L

NOTA

- I volumi di reagente e campione possono essere variati in proporzione per adattarsi ai diversi requisiti dello spettrofotometro
- Se la variazione dell'assorbanza è maggiore di 0,45/min, ripetere l'analisi con siero diluito. Tuttavia, la frazione di volume del siero nel sistema di reazioni di CK è critica. Cambiamenti della frazione di volume, come in caso di prediluizione del campione, non producono variazioni stoichiometriche nella velocità di reazione. Se è necessaria la diluizione, si consigliano 150 mmol/L di NaCl. A una diluizione di 1:2 è possibile un aumento evidente di CK fino al 10%.² In alternativa, è possibile utilizzare per la diluizione una riserva di siero libero di CK. Il siero libero di CK può essere prodotto riscaldando il siero a 56° C per due ore
- La validità dei risultati dipenderà da una accurata calibratura degli strumenti, la distribuzione dei tempi e il controllo della temperatura.
- Il coefficiente di assorbanza millimolare per NADH a 334 nm = 6,18 e a 365 nm = 3,40.
- Conversione unità: U/L x 16,67 x 10⁻³ = μkat/L

CALIBRAZIONE

Non necessaria. La velocità di reazione è convertita a U/L di attività mediante un fattore di calcolo. Fare riferimento alla sezione di calcolo di questo inserto.

CONTROLLO QUALITÀ

Per garantire un controllo qualità adeguato si consiglia di effettuare un controllo normale e anormale con valori analizzati come campioni sconosciuti:

- Almeno ogni otto ore.
- Quando si utilizza una nuova bottiglia di reagente.
- In seguito a manutenzione preventiva o sostituzione di un componente critico.

I risultati del controllo non rientranti nei limiti superiore o inferiore degli intervalli stabiliti indicano che il campione potrebbe essere fuori controllo.

In tali situazioni si consiglia di effettuare le seguenti azioni correttive:-

- Ripetere gli stessi controlli.
- Se i risultati dei controlli ripetuti non rientrano nei limiti, preparare del siero di controllo nuovo e ripetere la prova.
- Se i risultati del materiale appena controllato continuano a non rientrare nei limiti, ripetere il test con reagente appena preparato.
- Se i risultati risultano ancora fuori controllo, contattare l'Assistenza tecnica o il distributore locale.

LIMITAZIONI

- Sono stati condotti degli studi per determinare il livello di interferenza da emoglobina, bilirubina e lipemia su un analizzatore automatico di chimica clinica. I risultati ottenuti sono come segue:
Emoglobina: Evitare campioni emolizzati per minimizzare l'interferenza dell'adenilato chinasi e altre reazioni intermedie quali ATP e G-6-P.⁴
Bilirubina: Nessuna interferenza da bilirubina fino a 340 μmol/L (20 mg/dL).
Lipemia: Nessuna interferenza da lipemia, misurata come trigliceridi, fino a 2,8 mmol/L (250 mg/dL).
- Young DS⁵ ha pubblicato un elenco completo dei farmaci e delle sostanze in grado di interferire con questo saggio.

VALORI PREVISTI⁶

A 37° C	Maschi	≤200	(3,3 μkat/L)
	Femmine	≤180	(3,0 μkat/L)
A 30° C	Maschi	≤130	(2,1 μkat/L)
	Femmine	≤113	(1,9 μkat/L)

I valori indicati sono rappresentativi dell'intervallo previsto per questo metodo e hanno scopo unicamente di guida. Si consiglia ad ogni laboratorio di verificare questo intervallo o di procurare un intervallo di riferimento per la popolazione a cui si riferisce.⁷

*Risultati calcolati sulla base di una conversione di temperatura di 0,625 per 30° C. Thermo sconsiglia l'uso routinario dei fattori di conversione di temperatura.

PRESTAZIONI

I dati seguenti sono stati ottenuti utilizzando il reagente in fiala singola CK-NAC IFCC su un analizzatore chimico clinico automatico.

IMPRECISIONE

L'imprecisione è stata valutata per un periodo di 20 giorni utilizzando due livelli di controllo commerciale e seguendo la procedura NCCLS EP5-T.⁸

	LIVELLO I	LIVELLO II
Nel ciclo		
Numero di punti dati	80	80
Media (U/L)	134	393
SD (U/L)	4,3	5,2
CV (%)	3,2	1,3
Tra giorni	LIVELLO I	LIVELLO II
Numero di punti dati	80	80
Media (U/L)	134	393
SD (U/L)	5,2	16,3
CV (%)	3,9	4,1

PRECISIONE

Sono stati condotti degli studi utilizzando come riferimento un reagente CK-NAC simile reperibile sul mercato. I campioni di siero sono stati analizzati in parallelo e i risultati confrontati con regressioni al minimo quadrato. Le statistiche ottenute sono come segue:

Numero di coppie di campioni	60
Intervallo risultati campione	17 - 749 U/L
Media risultati metodo di rif.	148 U/L
Media dei risultati di CK-NAC	147 U/L
Pendenza	1,01
Intercetta	-1,15 U/L
Coefficiente di correlazione	0,999

LINEARITÀ

Quando condotta secondo le raccomandazioni, l'analisi è lineare fino a 1500 U/L.


SENSIBILITÀ

Quando condotta secondo le raccomandazioni, la sensibilità di quest'analisi è 0,30 ΔmA/min per U/L.

RIFERIMENTI

- Hörder M., Elser R.C., Gerhardt W., et al. Journal of the IFCC 1989; 1:130-8.
- Strömme JH., Theodorsen L., Hörder M., et al. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1976; 36:711-23
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Burtis CA and Ashwood ER (Eds). Second Edition, WB Saunders Company, 1994.
- Burtis CA, Ashwood ER, "Tietz textbook of Clinical Chemistry" Second Edition, 1994; 805.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests. Third Edition, 1990: 3:120-122
- Bais R, et al. Pathology 1988; 20:367-72.
- Wachtel M et al. Creation and Verification of Reference Intervals. Laboratory Medicine 1995; 26:593-7.
- National Committee of 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

Dati per nuovi ordini

N° Catalogo.	REAG A	REAG B
TR14110	20 x 10 mL	1 x 200 mL
TR14115	20 x 20 mL	2 x 200 mL
TR14103	10 x 50 mL	1 x 500 mL
TL14101 (ILab 600)	20 x 20 mL	1 x 400 mL