

REF 10226-4 4 x 28 ml/7 ml

REAGENTE PER CREATINCHINASI-MB (CKMB)

Flaconi contenenti ciascuno 28 ml di reagente R1 e 7 ml di reagente R2.

USO PREVISTO

Il reagente per creatinichinasi-MB EasyRA è indicato per la misurazione quantitativa dell'enzima creatinichinasi-MB (CKMB) nel siero e plasma umani utilizzando l'analizzatore chimico MEDICA EasyRA® in laboratori clinici. I dosaggi di creatinichinasi-MB trovano applicazione nella diagnosi e nella cura dell'infarto miocardico e di malattie muscolari quali distrofia muscolare tipo Duchenne progressiva. Solo per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale.

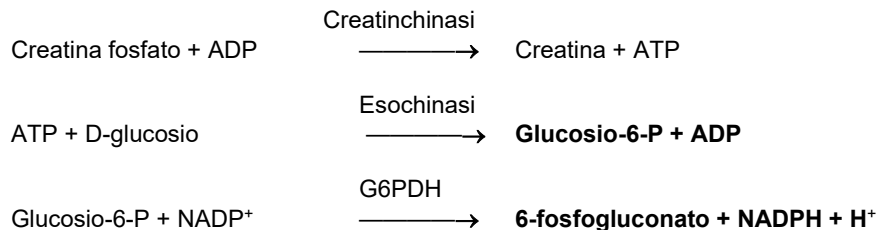
RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

La creatinichinasi (CK) ha una struttura molecolare dimerica composta da subunità M e B ed esiste nella forma degli isoenzimi MM, MB e BB.¹ Le subunità M e B sono immunologicamente distinte. La creatinichinasi-MM e la creatinichinasi-MB sono distribuite principalmente nei muscoli scheletrici e nel muscolo cardiaco, rispettivamente, mentre la creatinichinasi-BB è presente per lo più nel cervello e nei tessuti composti da muscolatura liscia.² La determinazione dell'attività della creatinichinasi-MB nel siero è un elemento importante nella diagnosi dell'ischemia miocardica, ad esempio nell'infarto miocardico acuto, nella miocardite ecc.^{3,4} La creatinichinasi-MB è rilevabile nel sangue circa 3-8 ore dopo l'insorgenza dei sintomi cardiaci e può rimanere rilevabile per un tempo prolungato, secondo il decorso della condizione.³

Una creatinichinasi-MB elevata non è specifica per l'IM (infarto miocardico) e può essere rilevata in altri stati patologici. Valori elevati di creatinichinasi-MB devono essere interpretati congiuntamente alla presentazione clinica e all'anamnesi.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

In questa procedura l'attività della creatinichinasi è misurata in presenza di un anticorpo al monomero creatinichinasi-M. Tale anticorpo inibisce le subunità M di creatinichinasi-MM e creatinichinasi-MB, consentendo così la determinazione dell'unità B di creatinichinasi-MB (presupponendo l'assenza di creatinichinasi-BB). La concentrazione catalitica della creatinichinasi-B, che corrisponde alla metà della concentrazione della creatinichinasi-MB, è determinata a partire dalla velocità di formazione del NADPH, misurata a 340 nm, utilizzando la serie seguente di reazioni:



L'attività della creatinichinasi-MB si ottiene moltiplicando l'attività della creatinichinasi-B per due.

REAGENTI

Reagente tampone per CK-MB (R1):

Tampone imidazolo (pH 6,3)	50 mmol/l
Glucosio	20 mmol/l
N-acetil-L-cisteina	20 mmol/l
Magnesio acetato	10,0 mmol/l
NADP	2,0 mmol/l
EDTA	2,0 mmol/l
Esochinasi	5,0 kU/l
LDH	1,5 kU/l
Sodio azide	<0,1%
Anticorpi monoclonali (murini) verso la CK-M umana, capacità di inibizione	

Reagente substrato per CK-MB (R2)

Tampone imidazolo (pH 9,0)	50 mmol/l
Creatina fosfato	150 mmol/l
ADP	10 mmol/l
AMP	20 mmol/l
Diadenosina pentafosfato	50 µmol/l
Glucosio-6-PDH	20 kU/l
Sodio azide	<0,1%

PRECAUZIONI

- 1 Seguire sempre buone prassi di sicurezza di laboratorio quando si maneggiano reagenti di laboratorio. (CLSI, GP17-A2).
- 2 Questo materiale contiene sodio azide come conservante. Evitare l'ingestione o il contatto con pelle e mucose. In caso di contatto con la pelle, lavare l'area interessata con abbondante acqua. In caso di ingestione o di contatto con gli occhi, consultare immediatamente un medico. Per informazioni su rischi, pericoli e sicurezza fare riferimento alle schede di sicurezza (SDS).
- 3 Come per qualunque altra procedura di test diagnostico, i risultati devono essere interpretati alla luce dei risultati prodotti da altri test e dello stato clinico del paziente.
- 4 Non utilizzare cuvette lavate.

ISTRUZIONI PER LA MANIPOLAZIONE, LA CONSERVAZIONE E LA STABILITÀ DEL REAGENTE

Il reagente viene fornito pronto all'uso. Il reagente in confezione chiusa si mantiene stabile fino alla data di scadenza presente sull'etichetta se conservato a una temperatura di 2-8 °C. Il reagente rimane stabile on-board nel vano reagenti refrigerato nell'analizzatore EasyRA per il numero di giorni programmati sul chip RFID del flacone del reagente. Non usare il reagente qualora questo si presenti torbido od opaco o nel caso in cui non riesca a recuperare i valori noti di controllo del siero.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI/STABILITÀ

È necessario usare siero e plasma puliti non emolizzati. È possibile utilizzare plasma proveniente da sangue raccolto con litio-eparina come anticoagulante. Centrifugare ed eliminare il siero/plasma appena possibile dopo la raccolta. La creatinichinasi-MB serica/plasmatica è stabile per 3 giorni a una temperatura di 2-8°C.

PROCEDURA

Materiale fornito

Flacone di reagente per creatinichinasi-MB Medica, REF 10226

Ulteriore materiale necessario

Materiale di controllo disponibile in commercio

Flacone per analisi colorimetrica di precisione Medica, REF 10764

Flacone di detergente Medica – Chimica e ISE, REF 10660 o

Flacone di detergente Medica – Chimica, REF 10661

Istruzioni per l'uso

Il reagente viene fornito pronto all'uso. Rimuovere il tappo e collocare il reagente nel piatto reagenti dell'analizzatore EasyRA situato nell'area reagenti. La stabilità on-board (massimo 30 giorni) è programmata sul chip RFID del flacone del reagente.

Nota: Verificare che non sia presente schiuma nella parte interna del collo del flacone dopo aver rimosso il tappo e aver collocato il flacone sull'analizzatore. Qualora fosse presente schiuma, rimuoverla con un tampone o una pipetta monouso prima di eseguire il test. Usare pipette monouso o tamponi diversi per i reagenti R1 e R2.

Calibrazione

Non applicabile.

Controllo qualità

Si consiglia di eseguire due livelli di controllo del siero umano (normale e anomalo) con l'analisi quotidianamente, ogni volta che vengono eseguiti i test di un paziente e il lotto di reagenti cambia. Il mancato raggiungimento dell'intervallo corretto di valori nel test del materiale di controllo può essere indice di deterioramento del reagente, malfunzionamento dello strumento o errori procedurali. Quando viene utilizzato il materiale di controllo qualità, il laboratorio deve inoltre attenersi alla normativa locale, nazionale e federale in materia di controllo di qualità.

Risultati

Dopo aver completato l'analisi, l'analizzatore chimico Medica EasyRA calcola la concentrazione di creatinichinasi-MB dal cambiamento di assorbanza al minuto, dal volume del campione, dal volume di reazione totale, dalla lunghezza di 0,6 cm del cammino ottico e dalla assorbività molare di 6,22.

$$\text{CK-MB (U/L)} = \text{CK-B (U/L)} \times 2 = (\Delta A/\text{Min}) \times \frac{(\text{Volume totale } (\mu\text{l}) \times 1000) \times 2}{(\text{Assorbività molare} \times \text{lungh. cammino ottico (cm)} \times \text{vol. campione } (\mu\text{l}))}$$

Un'unità/litro (U/l) di attività della creatinchinasi-B è la quantità di enzima che ossida una $\mu\text{mol/l}$ di NADP al minuto.

Valori attesi⁶

L'intervallo di riferimento dell'attività della creatinchinasi-MB sull'analizzatore EasyRA è inferiore a 24 U/l.^{7,8} Tale intervallo è stato convalidato da Medica secondo CLSI C28-A3c. Si consiglia a ciascun laboratorio di stabilire il proprio intervallo di valori attesi, in quanto esistono differenze tra strumenti, laboratori e popolazioni locali.

Limiti procedurali (ad es. se il campione è al di sopra dell'intervallo di misura)

Usare esclusivamente campioni di siero o plasma non emolizzati.

Se il cambiamento di assorbanza al minuto ($\Delta A/\text{min}$) è superiore a 0,003, corrispondente a circa 100 U/l, l'analizzatore lo contrassegna con "SD" (deplezione substrato). I cambiamenti di assorbanza superiori a questo valore sono al di sopra dell'intervallo lineare del test. Se l'icona di "Riesecuzione" viene selezionata, è possibile che il campione venga ritestato utilizzando un quinto (1/5) del volume del campione. I risultati del test rieseguito vengono calcolati tenendo conto dell'uso di volumi inferiori del campione. In tal modo l'intervallo accettabile del test della creatinchinasi-MB viene esteso a 500 U/l.

Caratteristiche di prestazione⁹

Intervallo accettabile

L'intervallo accettabile è compreso tra 5 e 100 U/l. L'intervallo esteso è compreso tra 5 e 500 U/l quando viene usato un quinto del campione (fattore di diluizione 1:4).

Imprecisione/Correlazione (CLSI, EP9-A2)

La tabella seguente elenca i dati ottenuti in un confronto del reagente per creatinchinasi-MB Medica (Y) su un analizzatore EasyRA con la prestazione di un reagente per creatinchinasi-MB approvato dalla FDA (X) sull'analizzatore Stanbio Sirus®*. I dati di seguito illustrati rappresentano le singole determinazioni del siero ottenute sull'analizzatore EasyRA rispetto alla media dei valori replicati ottenuti sul dispositivo approvato dalla FDA.

SIERO	Numero di campioni	41	Intervallo dei campioni	6 – 100 U/l
	Pendenza	0,9869	Intercetta y	0,4702
	Coefficiente di correlazione	0,9961	Equazione di regressione	$0,9869 \times X + 0,4702$

* Sirus è un marchio registrato di [Stanbio Laboratory LLP](#) di 1261 North Main St. Boerne, TX 78006 (USA)

I dati di seguito illustrati rappresentano le singole determinazioni per il plasma (Li-eparina) rispetto alla media di due valori del siero replicati ottenuti sull'analizzatore EasyRA. Tutti i parametri di test sono identici.

PLASMA	Numero di campioni	57	Intervallo dei campioni	5 – 96 U/l
	Pendenza	0,9797	Intercetta y	1,4523
	Coefficiente di correlazione	0,9945	Equazione di regressione	$0,9797 \times X + 1,4523$

Imprecisione (CLSI, EP5-A2)

Le misurazioni duplicate di ciascuno dei tre livelli di materiale di controllo qualità sono state analizzate due volte al giorno per 20 giorni. Da questi dati sono state determinate sia la precisione intra-serie che quella totale.

Imprecisione intra-serie:			Imprecisione totale:		
Livello QC	Intra-serie SD	Intra-serie CV	Livello QC	Imprecisione totale SD	Imprecisione totale CV
U/l	U/l	%	U/l	U/l	%
94	0,9	0,9	94	1,7	1,8
30	0,7	2,4	30	0,9	3,0
14	0,6	3,9	14	0,8	5,5

Linearità (CLSI, EP6-A)

Lineare da 5 a 100 U/l, basata sulla regressione lineare $Y = 1,0009 \cdot X - 0,2291$

Limite di vuoto:	1,7 U/l	(CLSI, EP17-A)
Limite di rilevamento:	2,9 U/l	(CLSI, EP17-A)
Limite di quantificazione:	5,0 U/l	(CLSI, EP17-A)

Sostanze interferenti (CLSI, EP7-A)

Le interferenze inferiori al 10% sono state classificate come "non significative".

L'emoglobina interferisce anche a concentrazioni minime. Non utilizzare campioni emolizzati.

Con livelli fino a 25 mg/dl di bilirubina non sono state riscontrate interferenze significative.

Con livelli fino a 775 mg/dl di trigliceridi non sono state riscontrate interferenze significative (usando Intralipid*).

Con livelli fino a 30 mg/dl di acido ascorbico non sono state riscontrate interferenze significative.

**Intralipid* è un marchio registrato di Pharmacia AB, Clayton, NC (USA).

Young fornisce un elenco di medicinali e altre sostanze che interferiscono con i test chimici clinici^{10,11}.

Nota: la procedura può sovrastimare i valori dell'attività della creatinchinasi-MB se l'attività dell'isoenzima creatinchinasi-BB nel siero è elevata. L'attività della creatinchinasi-BB di norma è assente nel siero di individui sani e pazienti affetti da infarto miocardico⁷. Deve essere sospettata la presenza di una forma macro di creatinchinasi-BB nel campione se l'attività della creatinchinasi-MB misurata con la presente procedura rappresenta oltre il 20% dell'attività totale della creatinchinasi.

RIFERIMENTI

- 1 Dawson, D.M. et al., *Biochem Biophys. Res. Comm* 21:346 (1965).
- 2 Neumeir, D., *Tissue Specific Distribution of Creatine Kinase Isoenzyme*, Lang, Editor, Springer Verlag, New York, 1981, 85-109.
- 3 Rozenman Y, Gotsman MS. The earliest diagnosis of acute myocardial infarction. *Annu Rev Med* 1994;45:31-44.
- 4 Adams JE, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury: Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? *Circulation* 1993;88:750-763.
- 5 D'Souza, J.P., et al., *Clin. Biochem* 11, 204 (1978).
- 6 Stein, W., *Strategie der klinisch-chemischen Diagnostik des frischen Myokardinfarkts*. *Med Welt* 1985;36:572-7.
- 7 Klein G, Berger A, Bertholf R et al. Abstract: Multicenter Evaluation of Liquid Reagents for CK, CK-MB and LDH with Determination of Reference Intervals on Hitachi Systems. *Clin Chem* 2001; 47:Suppl. A30.
- 8 Thomas L, Müller M, Schumann G, Weidemann G et al. Consensus of DGKL and VDGH for interim reference intervals on enzymes in serum. *J Lab Med* 2005;29:301-308.
- 9 Dati in archivio presso Medica.
- 10 Young DS. *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests*. 2nd ed. Washington, DC. AACC Press; 1997.
- 11 Young, DS., Pestaner, L.C., Gibberman, V.; *Effects of drugs on clinical laboratory tests*. *Clin Chem* 21: 246D, 1975.

Parametri dell'analisi EasyRA (CKMB)

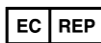
Lunghezza d'onda primaria (nm)	340
Lunghezza d'onda secondaria (nm)	405
Tipo di reazione	Enzima (0)
Direzione di reazione	Aumento
Bianco reagente	No
Bianco campione	No
Primo intervallo max. camb. assorb.	0,003
Tempo di reazione	9,3 min
Intervallo di calibrazione (massimo)	N/D
Stabilità on-board del reagente	30 giorni

Siero/Plasma

Volume del campione (µl)	8,0
Volume del diluente (µl)	20
Volume del reagente R1 (µl)	160
Volume del reagente R2 (µl)	40
Posizioni decimali (valori predefiniti)	0
Unità (valori predefiniti)	U/l
Fattore di diluizione	1:4 (1/5 del campione utilizzato per estendere l'intervallo di misurazione)
Linearità	5 – 100 U/l
Assorbività molare	6,22



Medica Corporation, 5 Oak Park Drive
Bedford, Massachusetts 01730-1413 USA



Emergo Europe, Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem, The Netherlands