

Kit per la determinazione della creatinichinasi nel siero o plasma Metodo cinetico ottimizzato DGKC-IFCC*

*Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie - International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

PRINCIPIO

La creatinichinasi (CK) catalizza la reazione tra creatinfosfato ed ADP, con formazione di creatina e ATP. Quest'ultima, in presenza di glucosio ed esochinasi (HK), viene ritrasformata in ADP e glucosio-6-fosfato che, con l'intervento della glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G6P-DH) dà luogo al glucosio-6-fosfogluconato e il NADP⁺ è ridotto a NADPH. Misurando la variazione di estinzione, dovuta alla riduzione del NADP⁺ in NADPH, si calcola l'attività della CK nel campione.

REATTIVI - Concentrazione iniziale

- R1** Tampone imidazolo pH 6.7 125 mmol/l; esochinasi (HK) ≥ 6800 U/l; magnesio acetato 12.5 mmol/l; glucosio-D 25 mmol/l; EDTA 2.02 mmol/l; NADP 2.52 mmol/l; N-acetilcisteina (NAC) 25 mmol/l
- R2** G6P-DH ≥ 8800 U/l; creatinfosfato 250 mmol/l; ADP 15.2 mmol/l; AMP 25 mmol/l; diadenosina fosfato 103 mmol/l;

CAMPIONI

- Siero non emolizzato o plasma con eparina.

Note

- Conservare i campioni al riparo dalla luce e a 2-8°C al massimo per 7 giorni.
- L'attività della CK decresce del 10% dopo un giorno a 2-5°C o dopo un'ora a 15-25°C.

VALORI DI RIFERIMENTO

Siero - plasma [U/l]	25°C	30°C	37°C
Adulti: Donne	10 - 70	15 - 110	24 - 170
Uomini	10 - 80	15 - 125	24 - 195
Bambini: Neonati	192 - 494	300 - 770	468 - 1200
≤ 5 giorni	80 - 288	125 - 450	195 - 700
< 6 mesi	17 - 136	27 - 212	41 - 330
> 6 mesi	10 - 94	15 - 147	24 - 229

I valori di riferimento sono da considerarsi indicativi in quanto ogni laboratorio dovrebbe ricercare quelli della popolazione su cui opera. I risultati del test dovrebbero essere interpretati unitamente alle informazioni derivanti dalle valutazioni cliniche del paziente.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Conservare il kit a 2-8°C. Non congelare i reattivi.
- Dopo l'apertura, i flaconi **R1** e **R2** sono stabili fino alla data di scadenza indicata se chiusi immediatamente dopo il prelievo, protetti da contaminazione, evaporazione, luce diretta e conservati alla temperatura corretta.
- Stabilità della soluzione di lavoro (**R1 + R2**): 21 giorni a 2-8°C o 5 giorni a temp. ambiente (15-25°C).

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

I reattivi sono liquidi e pronti all'uso. Per l'utilizzo come monoreattivo (procedimento "campione starter") aggiungere ogni 4 ml del reattivo **R1**, 1 ml del reattivo **R2**.

Togliere i reattivi dal frigo solo il tempo necessario per il loro utilizzo e richiuderli subito dopo.

NOTE

- Il kit con la presente metodica deve essere utilizzato in manuale. Per l'utilizzo in automatico consultare le applicazioni specifiche.
- Valutare attentamente i risultati se l'estinzione del reattivo di lavoro è ≥ 1.60 a 340 nm o in presenza di particolato and torbidità..
- Evitare di esporre i reattivi alla luce diretta, contaminazione ed evaporazione.
- I volumi indicati nel procedimento possono essere variati proporzionalmente.
- In caso di reclamo o di richiesta del controllo di qualità del presente kit, indicare il numero di lotto riportato sulla confezione o, in alternativa, il numero di lotto dei singoli componenti.

MATERIALI AUSILIARI

Materiali necessari non contenuti nel kit: soluzioni diluenti, vetreria e monouso, sistemi di dosaggio e misurazione, calibratori per la taratura degli strumenti.

CONTROLLO DI QUALITÀ

È necessario eseguire i controlli ad ogni utilizzo del kit e verificare che i valori ottenuti siano inclusi nell'intervallo di riferimento riportato nelle istruzioni d'uso.

Sieri consigliati:

REF 20350 Precise Norm REF 20360 Precise Path

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

Il prodotto non è classificato come sostanza pericolosa (DLg. N.285 art.28 Legge n.128 del 1998). La concentrazione totale dei componenti è inferiore ai limiti riportati dalle Direttive 67/548/CEE e 88/379/CEE e successive modifiche sulla classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose. È consigliabile tuttavia maneggiare il prodotto con cautela secondo le norme di buona pratica di laboratorio.

SMALTIMENTO RIFIUTI

Il prodotto deve essere smaltito secondo le locali normative in materia di gestione dei rifiuti.

PROCEDIMENTO

Lunghezza d'onda λ: 340 (334 o 365) nm
 Temperatura di lavoro 37°C (25° o 30°C)
 Cammino ottico 1 cm
 Tipo di reazione cinetica (in incremento)

Portare i reattivi a 15-25°C prima del loro utilizzo.

Azzerare lo strumento contro acqua distillata.

- PROCEDIMENTO MONOREATTIVO "campione starter"

REATTIVO DI LAVORO	BIANCO	CAMPIONE
ACQUA DISTILLATA	1000 µl	1000 µl
CAMPIONE	20 µl	--
	--	20 µl

Agitare e dopo 2 min. di incubazione leggere l'assorbanza (tempo zero). Effettuare almeno altre tre letture a distanza di 60 sec. Calcolare la variazione media di estinzione per minuto (ΔE/min).

- PROCEDIMENTO BIREATTIVO "substrato starter"

REATTIVO R1	BIANCO	CAMPIONE
ACQUA DISTILLATA	800 µl	800 µl
CAMPIONE	20 µl	--
	--	20 µl

Mescolare poi incubare a 37°C per circa 2 min., quindi aggiungere:
REATTIVO R2 200 µl
 Agitare e dopo 1 min. leggere l'estinzione. Effettuare almeno tre letture a distanza di 60 sec. Calcolare la variazione di estinzione media per minuto (ΔE/min).

CALCOLO

$$CK [U/l] = \Delta A/min \times 8095$$

Il fattore e le prestazioni del reattivo sono riferite a 37°C e 340 nm.

PRESTAZIONI DEL REATTIVO

Interferenze

I trigliceridi non interferiscono sino alla concentrazione di 7 mmol/l.
 L'emoglobina non interferisce sino alla concentrazione di 50 mg/dl.
 Il glucosio non interferisce sino alla concentrazione di 70 mg/dl.

Linearità

La reazione è lineare sino alla concentrazione di 2000 U/l (intervallo 2.2-2000U/l).. Campioni superiori devono essere diluiti con soluzione fisiologica. Moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

Sensibilità: 1 U/l = 0.0012 ΔA/min.

Precisione "intra-Assay" (NELLA SERIE)

Determinata su diversi controlli (N-H, Normal-High). Risultati ottenuti:

MEDIA [U/l]	N = 147	H = 494
D.S.	1.23	3.60
C.V.%	0.84	0.73

Precisione "inter-Assay" (FRA LE SERIE)

Determinata per diversi controlli (N-H, Normal-High). Risultati ottenuti:

MEDIA [U/l]	N = 145	H = 485
D.S.	2.91	8.97
C.V.%	2.01	1.85

Correlazione

Un metodo equivalente preso a riferimento ha dato il coefficiente di correlazione r = 0.9995.

BIBLIOGRAFIA

Stein, W. "Creatine kinase (total activity), creatine kinase isoenzymes and variants". In: Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; p. 71-80, (1998).
 Recommendations of the German Society for Clinical Chemistry. "Standardization of methods for the estimation of enzyme activities in biological fluids: Standard method for the determination of creatine kinase activity". J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 15, 255-60, (1977).
 Moren, L.G., Clin. Chem., 23, 1569 (1977).
 Kaplan, L.A., Pesce, A..J.: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).

SIMBOLOGIA



Consultare istruzioni per l'uso



Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79/CE)



Limiti temperatura di conservazione



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Fabbricante

Kit for measurement of creatin kinase in serum or plasma Kinetic optimized method DGKC-IFCC*

*Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie - International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

PRINCIPLE

Creatin kinase (CK) catalyzes reaction between creatine phosphate and ADP, giving creatine and ATP. This one, in presence of glucose and hexokinase (HK) is transformed into ADP and glucose-6-phosphate which, with glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6P-DH) intervention, forms glucose-6-phosphogluconate while NADP⁺ is reduced to NADPH. The CK activity in the sample is calculated measuring the absorbance variation, due to the reduction of NADP⁺ into NADPH.

REAGENTS

R1 Imidazole buffer pH 6.7 125.0 mmol/l; hexokinase (HK) ≥ 6800 U/l; magnesium acetate 12.5 mmol/l; D-glucose 25.0 mmol/l; EDTA 2.02 mmol/l; NADP 2.52 mmol/l; diadenosine phosphate 10.0 mmol/l; N-acetyl-cysteine (NAC) 25.0 mmol/l
R2 G6P-DH ≥ 8800 U/l; creatine phosphate 250 mmol/l; ADP 15.2 mmol/l; AMP 25.0 mmol/l; di-Adenosine-5-pentaphosphate 103 mmol/l.

CAMPIONI

- Serum free of hemolysis or heparin plasma.

Note

- Store the samples protected from light at 2-8°C for 7 days (maximum).
 - The CK activity is stable for 7 days at 2-8°C or 30 days at -20°C.

REFERENCE VALUES

Serum - plasma [U/l]	25°C	30°C	37°C
Adults: Women	10 - 70	115 - 110	24 - 170
Men	10 - 80	15 - 125	24 - 195
Children: Babies	192 - 494	300 - 770	468 - 1200
≤ 5 days	80 - 288	125 - 450	195 - 700
< 6 months	17 - 136	27 - 212	41 - 330
> 6 months	10 - 94	15 - 147	24 - 229

References values are considered indicatives since each laboratory should establish references ranges for its own patient's population. The analytical results should be evaluated with other information coming from patient's clinical story.

STORAGE AND STABILITY

- Store the kit at 2-8°C. Do not freeze the reagents.
 - After opening, the vials **R1** and **R2** are stable up to the expiry date if recapped immediately and protected from contamination, evaporation, direct light, and stored at the correct temperature.
 - Working solution stability (**R1+ R2**): 21 days at 2-8°C or 5 days at room temperature (15-25°C).

PREPARATION OF REAGENTS

Reagents are liquid and ready to use. About using as monoreagent (sample-starter procedure) add to every 4 ml of **R1** reagent, 1 ml of **R2** reagent. In case of 3 ml package use 2.5 ml of **R1** and 0.5 ml of **R2**.
 Keep out the reagents from refrigerator only for the use and recap them immediately.

NOTE

- The kit, according to this method, must be used in manual procedures. About automatic using follow specific applications.
 - Evaluate carefully the results if working reagent absorbance is ≥ 1.60 at 340 nm or in presence of particles and turbidity.
 - Avoid direct light, contamination and evaporation.
 - The volumes in the procedure can be changed proportionally.
 - In case of complaint or quality control request, refer to the lot number on the package or the lot number on the singles vials.

AUXILIARY EQUIPMENT

Materials not included in the kit: diluent solutions, laboratory glassware, disposable tips, photometers and calibrators.

QUALITY CONTROLS

It's necessary, every time the kit is used, to make the quality controls and to check that values obtained are within the acceptance range provided in the insert.

Suggested serum:

REF 20350 Precise Norm **REF** 20360 Precise Path

PRECAUTION IN USE

The product is not classified as dangerous (DLg. N. 285 art. 28 l. n. 128/1998). The total concentration of components is lower than the limits reported by 67/548 and 88/379 CE Regulations (and following modifications) about classification, packaging and labelling of dangerous substances.

However the reagent should be handled with caution, according to good laboratory practice.

Caution: the reagents contain Sodium Azide (0.095%) as preservative. Avoid swallowing and contacting with skin, eyes and mucous membranes.

WASTE MANAGEMENT

Please refer to the local legal requirements.

PROCEDURE

Wavelength λ: 340 (334 o 365) nm
 Working temperature 37°C (25° o 30°C)
 Optical path 1 cm
 Reaction kinetic (increasing)

Bring the reagents at 15-25°C before using them.

- MONOREAGENT PROCEDURE "sample starter"

WORKING REAGENT	BLANK	SAMPLE
DISTILLED WATER	1000 µl	1000 µl
SAMPLE	20 µl	--
	--	20 µl

Mix and after 2 min. measure the absorbance. Make at least three readings at a distance of 60 sec. Calculate the average absorbance difference per minute (ΔE/min).

- BIREAGENT PROCEDURE "substrate starter"

REAGENT R1	BLANK	SAMPLE
DISTILLED WATER	800 µl	800 µl
SAMPLE	20 µl	--
	--	20 µl
REAGENT R2	200 µl	200 µl

Mix, incubate at 37°C for about 2 min. and then add:
 Mix and after 1 min. measure the absorbance. Make at least three readings at a distance of 60 sec. Calculate the average absorbance difference per minute (ΔE/min).

CALCULATION

$$CK [U/l] = \Delta E/min \times 8095$$

The factor and the reagent performances are related to 37°C and 340 nm.

ANALYTICAL PERFORMANCES

Interferences

Triglycerides do not interfere up to concentration of 7 mmol/l.
 Hemoglobin does not interfere up to concentration of 50 mg/dl.
 Glucose does not interfere up to concentration of 70 mg/dl.

Linearity

Reaction is linear from a concentration of 2.2U/l to a concentration of 2000 U/l. Samples with values exceeding 2000 U/l must be diluted with saline solution. Multiply, then, the result for diluting factor.

Sensitivity: 1U/l = 0.0012 ΔA/min.

"Intra-Assay" precision (within-Run)

Determined on several controls (N-H, Normal-High).

Results:

MEDIA [U/l]	N = 147	H = 494
D.S.	1.23	3.60
C.V.%	0.84	0.73

"Inter-Assay" precision (between-run)

Determined on several controls (N-H, Normal-High).

Results:

MEDIA [U/l]	N = 145	H = 485
D.S.	2.91	8.97
C.V.%	2.01	1.85

Correlation

A study based comparing this method with a similar method has given a correlating factor **r = 0.9995**.

BIBLIOGRAPHY

Stein, W. "Creatine kinase (total activity), creatine kinase isoenzymes and variants". In: Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; p. 71-80, (1998).

Recommendations of the German Society for Clinical Chemistry. "Standardization of methods for the estimation of enzyme activities in biological fluids: Standard method for the determination of creatine kinase activity". J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 15, 255-60, (1977).

Moren, L.G., Clin. Chem., 23, 1569 (1977).

Kaplan, L.A., Pesce, A.: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).

SYMBOLS



Read instruction for use



CE mark (requirement of 98/79 regulation)



Storing temperature limits



In vitro medical device



Producer