КРЕАТИНКИНАЗА (Creatine Kinase (CK NAC)) 1001050, 1001051

УФ-кинетический метод. Количественное определение креатинкиназы (КФК – CK).

IVD (для диагностики in vitro) Хранить при 2–8°C.

Код: 1001050 20x2.5 мл Код: 1001051 10x15 мл

ПРИНЦИП МЕТОДА

КФК катализирует обратимый перенос фосфатной группы от фосфокреатина к АДФ. Эта реакция ассоциирована с последующей: АТФ и глюкоза превращаются в АДФ и глюкозо6-фосфат под действием гексокиназы и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы окисляет Г-6-Ф и восстанавливает НАД:

$$\text{Креатинфосфат + АДФ} \xleftrightarrow{\text{КФК}} \text{креатин + АТФ}$$

$$\text{АТФ + Глюкоза} \xleftrightarrow{\text{гексокиназа}} \text{глюкозо-6-фосфат + АДФ}$$

$$\text{Глюкозо-6- фосфат + NADP} \xleftrightarrow{\text{Г-6Ф-ДГ}} \text{6-Фосфоглюконат + NADPH + } H^+$$

Скорость образования NADPH, измеряемая фотометрически при 340 нм, прямо пропорциональна каталитической активности (концентрации) КФК, присутствующей в пробе.[1,2]

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Креатинкиназа – это клеточный фермент, широко представленный в тканях тела человека. Его физиологическая роль заключается в создании аденозинтрифосфата (АТФ) для сократительной и транспортной систем. Повышенные уровни КФК наблюдаются при заболеваниях скелетной мускулатуры и при инфаркте миокарда[1,5,6]. Клинический диагноз не может быть поставлен по результату одного теста, он должен определяться по совокупности клинических и других лабораторных данных.

РЕАГЕНТЫ

Реагент 1 **R1**	Имидазольный буфер pH 7,0	100 ммоль/л
Буфер	Глюкоза	20 ммоль/л
	Ацетат магния	10 ммоль/л
	ЭДТА	2 ммоль/л
Реагент 2 **R2**	АДФ	2 ммоль/л
Субстрат	АМФ	5 ммоль/л
	Диаденозин-5-пентафосфат	10 ммоль/л
	$НАДФ^+$	2 ммоль/л
	гексокиназа (HK)	2500 Е/л
	глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (G6P-DH)	1500 Е/л
	N-ацетилцистеин (NAC)	20 ммоль/л
	Креатинфосфат	30 ммоль/л

ПОДГОТОВКА И СТАБИЛЬНОСТЬ

Рабочий реагент (R1+R2):

Набор 1001050: Разведите одну таблетку R2 в 1 флаконе буфера R1.

Набор 1001051: Разведите одну таблетку R2 в 15 мл буфера R1.

Закройте флакон и тщательно перемешайте до полного растворения.

Стабильность: 5 дней при 2-8°C или 24 часа при комнатной температуре (15-25°C).

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Все компоненты набора стабильны до указанной на упаковке даты (expiration date) в плотно закрытом флаконе при 2-8°C, в защищенном от света месте и с соблюдением правил, предотвращающих контаминацию при использовании.

Не используйте таблетки субстрата, если они разрушены.

Не используйте реагенты после окончания срока годности.

Признаки порчи реагентов:

- присутствие частиц или мутности.
- абсорбция бланка (A) при 340 нм ≥1,600.

ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Спектрофотометр и колориметр с фильтром 340 нм (или биохимический анализатор).
- Термостат с температурой 25, 30 или 37°C (± 0,1°C) (или биохимический анализатор).
- Соответствующие кюветы с оптическим путем 1,0 см.
- Общее лабораторное оборудование.

ПРОБЫ

Сыворотка или гепаринизированная или ЭДТА-плазма[1], без гемолиза. Стабильность 7 дней при 2-8°C, в защищенном от света месте. Активность креатинкиназы снижается на 10% через 1 день при 2-5°C или через 1 час при 15-25°C.

ПРОЦЕДУРА

1. Условия теста:
   Длина волны : 340 нм
   Оптический путь : 1 см
   Температура : 25, 30 или 37°C (Температура должна быть стабильной (±0,5°C))
   Измерение : против бланка по дистиллированной воде или воздуху.
   Метод : кинетика по фактору (8095), время задержки 120 с, время реакции 180 с
2. Настройте прибор на ноль по дистиллированной воде или воздуху.
3. Подогреть рабочий реагент и кюветы до нужной температуры (25/30/37°C). Пипетируйте в кювету непосредственно перед измерением:

	Полумикрометод		Микрометод		ChemWell
	25, 30°C	37°C	25, 30°C	37°C	37°C
Проба	40 мкл	20 мкл	20 мкл	10 мкл	4 мкл
Рабочий реагент (R1+2)	1 мл	1 мл	500 мкл	500 мкл	200 мкл

4. Перемешать, инкубировать в течение 2 мин.
5. Измерить начальную оптическую плотность (A), затем измерять оптическую плотность каждую минуту в течение 3-х мин.
6. Вычислить среднее изменение оптической плотности за минуту: ΔA/мин.

ВЫЧИСЛЕНИЕ

Рассчитать активность креатинкиназы в пробе, умножая ΔA/мин на следующие величины (факторы):

25/30°C (Е/л)= ΔA/мин x 4127

37°C **(Е/л)= ΔA/мин x 8095**

Единицы: 1 международная единица (Е/л или U/L) – это количество фермента, которое трансформирует 1 мкмоль субстрата в минуту при стандартных условиях. Концентрация выражается в единицах на литр пробы (Е/л).

Фактор для перевода международных единиц (Е/л) в единицы СИ (кат/л):

1 Е/л = 16.67×10^{-9} кат/л = 16.67×10^{-3} мккат/л; 1 мккат/л = 60 Е/л

Коэффициенты температурной конверсии

Для коррекции результатов относительно другой температуры умножьте на:

Температура исследования	Коэффициенты конверсии для		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1.00	1.56	2.44
30°C	0.64	1.00	1.56
37°C	0.41	0.63	1.00

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольную сыворотку с каждой серией тестов. Мы рекомендуем контрольные сыворотки SPINTROL Normal и Pathological (Кат.№ 1002120 и 1002210). Если значения контролей выходят за указанный диапазон, проверьте прибор, реагенты и технику выполнения. Каждая лаборатория должна разработать собственную систему контроля качества и соответствующие действия, если контроли не показывают приемлемых результатов.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ

Температура исследования		25°C	30°C	37°C
Мужчины,	до	80 Е/л	130 Е/л	**195 Е/л**
Женщины,	до	70 Е/л	110 Е/л	**170 Е/л**

Эти значения приведены для ориентационных целей; каждая лаборатория должна представить свои собственные значения референтного диапазона.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Диапазон измерения: от определяемого уровня в 1,35 Е/л до предела линейности 1000 Е/л.

Если полученные результаты превышают предел линейности, пробы следует разбавить 1:10 физраствором (9 г/л NaCl) и повторить исследование, полученный результат умножить на 10.

Воспроизводимость:

	Внутри серии (n=20)		Между сериями (n=20)	
Среднее (U/L)	166	450	165	446
SD	2.36	3.72	2.26	5.17
CV (%)	1.42	0.82	1.37	1.16

Чувствительность: 1 Е/л = 0.0001 ΔA/мин.

Правильность: Результаты, полученные с помощью реагентов SPINREACT (y) не показали систематических различий при сравнении с другими коммерческими реагентами (x).

Результаты оценки характеристик теста зависят от используемого анализатора.