

Cistatina C

Note applicative dell'Immunodosaggio per cistatina C sui sistemi Beckman Coulter® IMAGE® 800

Con l'uso del Kit di reagenti per cistatina C Gentian e delle Cartucce di reagente IMAGE definite dall'utente

Uso previsto

L'immunodosaggio per cistatina C eseguito sui sistemi Beckman Coulter® IMAGE® è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione quantitativa della cistatina C nel siero e nel plasma umano. La misurazione della cistatina C viene utilizzata nella diagnosi e nel trattamento delle nefropatie.

Sommario e spiegazione del test

La cistatina C, una proteina basica non glicosilata (peso molecolare di 13,2 kD), viene prodotta a velocità costante in quasi tutte le cellule nucleate nell'organismo umano [1]. La cistatina C viene filtrata liberamente attraverso una normale membrana glomerulare e viene quindi riassorbita e quasi interamente catabolizzata nei tubuli prossimali. Di conseguenza, la concentrazione di cistatina C nel sangue umano è strettamente correlata alla velocità di filtrazione glomerulare (GFR) [2]. La riduzione della velocità di filtrazione glomerulare causa un aumento della concentrazione di cistatina C. Non risulta che sulla concentrazione di cistatina C influiscano significativamente altri fattori, come la massa muscolare, le malattie infiammatorie, il sesso, l'età o il regime alimentare [2, 3, 4].

Standardizzazione del calibratore

Il calibratore di cistatina C Gentian rispetta lo standard internazionale dei calibratori ERM-DA471/IFCC.

Calcolo di previsione della GFR

Sono state pubblicate diverse equazioni di previsione basate sulla cistatina C per il calcolo della velocità di filtrazione glomerulare negli adulti e nei bambini. Si noti che tali formule sono state valutate con diversi dosaggi di cistatina C (nefelometrico - particle-enhanced nephelometric immunoassay PENIA - o turbidimetrico - particle enhanced turbidimetric immunoassay PETIA) e potrebbero rivelare risultati GFR inaccurati in presenza di combinazioni di formule e campioni inadeguati. Per il calcolo della GFR dai valori di cistatina C misurati con il dosaggio Gentian, si consiglia di utilizzare l'equazione di previsione che segue, utilizzando mg/l come fattore unitario [5]: L'equazione è valida per pazienti di età superiore ai 14 anni.

$$\text{GFR [ml/min/1,73 m}^2\text{]} = \frac{79,901}{\text{Cistatina C (mg/l)}^{1,4389}}$$

Principio del dosaggio

Il campione di siero o di plasma umano viene mescolato con immunoparticelle di cistatina C. La cistatina C del campione e l'anti-cistatina C delle immunoparticelle si aggregano. Le particelle complesse che vengono create assorbono la luce e l'assorbimento viene correlato mediante turbidimetria alla concentrazione di cistatina C mediante interpolazione su una curva di calibrazione standard prestabilita. Le piattaforme IMAGE® calcoleranno automaticamente i risultati.

Reagenti forniti nel Kit di reagenti

Tampone di reazione 1 (R1)

Tampone di reazione per cistatina C, 1 fialone da 100 ml. R1 è una soluzione salina tamponata di MOPS [acido 3-(N-morfolino)-propansulfonico], con sodio azide come conservante (0,09% (peso/volume)). Il tampone è pronto per l'uso.

Tampone di reazione 2 (R2)

Immunoparticelle di cistatina C, 2 fialoni da 10 ml. R2 contiene immunoparticelle e consiste in una frazione di immunoglobulina purificata diretta contro la cistatina C, legata covalentemente a particelle di polistirene di dimensione uniforme. La cistatina C umana è stata usata come immunogeno nel processo di generazione delle immunoparticelle. Questo reagente viene fornito come soluzione pronta per l'uso, conservata con sodio azide allo 0,09% (peso/volume) e antibiotici.

Materiali inclusi nel pacchetto CYSX IMAGE RIF. B69746 in vendita:	
Kit di reagenti per cistatina C Gentian	RIF. A52761
Cartuccia di reagente definita dall'utente (confezione da 10)	RIF. 447250
Capsule per evaporazione (confezione da 20)	RIF. 447170
Materiali richiesti (non inclusi):	
Kit di calibratori per cistatina C Gentian (6 x 1 ml)	RIF. A52763
Kit di controlli per cistatina C Gentian (2 x 1 ml)	RIF. A52765

Avvertenze e precauzioni

- Questo test è esclusivamente per uso *in vitro* e deve essere maneggiato da personale qualificato.
- I reagenti contengono antibiotici e devono essere maneggiati con la dovuta attenzione.
- I reagenti contengono sodio azide come conservante e devono essere maneggiati con la dovuta attenzione. Non ingerire o portare a contatto con la pelle o le mucose. La concentrazione di sodio azide in questo prodotto non è classificata come pericolosa. Tuttavia, l'accumulo di NaN₃ nelle tubazioni di piombo e rame può generare azidi metalliche esplosive. Per evitare ciò, lavare con abbondanti quantità di acqua se il prodotto viene gettato nello scarico.
- Le immunoparticelle contengono sostanze di origine animale. Smaltire i materiali di scarto nel rispetto delle norme in vigore a livello locale.
- Il siero usato per la preparazione dei calibratori e dei controlli è stato analizzato e riscontrato negativo per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAG) e gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV1 e anti-HIV2. I materiali contengono tuttavia sostanze di origine umana e animale e devono essere maneggiati con la dovuta attenzione. Smaltire i materiali di scarto nel rispetto delle norme in vigore a livello locale.

Conservazione e stabilità dei reagenti

Durata dei reagenti conservati in fialoni chiusi a 2-8 °C: vedere la data di scadenza indicata sull'etichetta. Stabilità dei fialoni una volta aperti: fino alla data di scadenza utilizzando capsule rigide a 2-8 °C. Stabilità a bordo: 28 giorni utilizzando le capsule di evaporazione.

I prodotti con data di scadenza in cui è riportato il mese e l'anno di scadenza scadono l'ultimo giorno del mese riportato.

Acquisizione e preparazione dei campioni

Il materiale richiesto per i campioni è siero o plasma umano trattato con EDTA/eparinato. Si consiglia di analizzare i campioni quanto prima possibile. I test di stabilità dei campioni hanno dimostrato che la cistatina C in campioni di siero o plasma è stabile per 26 giorni a temperatura ambiente (8-25 °C) o per 26 giorni se i campioni vengono conservati a 2-8 °C. Inoltre, delle pubblicazioni riportano che i campioni possono essere conservati a temperature inferiori a -20 °C fino a 10 anni [6]. Miscelare bene i campioni prima di analizzarli.

Procedura di dosaggio

Note applicative/installazione del sistema di dosaggio

Un elenco dettagliato dei parametri dello strumento è reperibile di seguito, nella sezione "Parametri dello strumento". La nota applicativa è disponibile anche al seguente indirizzo web: www.gentian.no. La predisposizione e la manutenzione dello strumento, le funzioni operative e le precauzioni devono essere eseguite in osservanza dei manuali d'uso del sistema Beckman Coulter® IMMAGE®.

Preparazione dei reagenti

I reagenti sono forniti pronti per il trasferimento nella cartuccia di reagente IMMAGE. Trasferire il contenuto dei flaconi di reagente 1 e reagente 2 negli scomparti appropriati della cartuccia definita dell'utente, come indicato nella tabella seguente, ed applicare le capsule di evaporazione durante l'uso. Fare attenzione ad evitare la contaminazione. Quando non in uso, i reagenti devono essere conservati a 2-8 °C.

Kit per cistatina C	Scomparto A	Scomparto B
R1, Tampone di reazione	-	8,5 ml
R2, Immunoparticelle	1,5 ml	-

Determinazione della curva di calibrazione

Usare gli standard da 1 a 6 per determinare una curva standard a 6 punti, come indicato nei manuali d'uso dei sistemi Beckman Coulter® IMMAGE®. I valori dei calibratori dipendono dal lotto e occorre eseguire una nuova calibrazione ogni volta che si utilizza un nuovo lotto di calibrazione. I valori assegnati ai calibratori sono forniti nella scheda dei valori analitici fornita con il calibratore. Eseguire una nuova calibrazione ogni 4 settimane.

Controlli di qualità

Per convalidare la curva di calibrazione, i controlli di livello alto e basso devono essere analizzati ogni giorno prima dell'analisi di qualsiasi campione. Prima di analizzare i campioni, è necessario assicurarsi che venga rispettato il range di valori assegnato ai controlli. I valori assegnati sono reperibili nella scheda dei valori analitici fornita con il kit di controlli per cistatina C Gentian. Se i valori dei controlli non sono validi, ripetere le misurazioni dei controlli. Se non è possibile eseguire la calibrazione senza errori o riprodurre valori validi dei controlli, rivolgersi alla Beckman Coulter® per assistenza.

Misurazione dei campioni dei pazienti

Una volta eseguita la calibrazione e quando i valori dei controlli rientrano nel range valido, è possibile misurare i campioni di siero o di plasma. Verificare che il volume del campione corrisponda al minimo richiesto e analizzare i campioni secondo le istruzioni fornite nei manuali d'uso dei sistemi Beckman Coulter® IMMAGE®.

Risultati

I risultati vengono calcolati automaticamente dai sistemi Beckman Coulter® IMMAGE®. I risultati sono espressi in mg/l.

Limitazioni

I materiali non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza.

Range di misurazione

Il range di misurazione della cistatina C per il dosaggio è di circa 0,4-8,0 mg/l. Il range esatto dipende dai setpoint di calibrazione del numero di lotto del kit dei calibratori per cistatina C Gentian.

Intervalli di riferimento

Per determinare la trasferibilità dell'intervallo di riferimento, la Gentian segue la CLSI Guideline, C28-A2; *How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline Second edition* (direttiva del CLSI, C28-A2; Come definire e determinare gli intervalli di riferimento del laboratorio clinico; direttiva approvata, seconda edizione). L'intervallo di riferimento si basa su uno studio in merito condotto presso il Växjö Hospital, in Svezia, su campioni di siero provenienti da 138 soggetti dichiaratisi sani, di età compresa tra i 20 e gli 80 anni. I campioni sono stati analizzati per la cistatina C sulla piattaforma AU 2700. L'intervallo di riferimento è stato calcolato con metodo non parametrico e ne è stato determinato un valore tra 0,53 e 1,01 mg/l. Questo rappresenta il 95% centrale dell'intera popolazione testata. Si consiglia a ciascun laboratorio di stabilire un intervallo di riferimento locale, dato che i valori possono variare a seconda della popolazione testata.

In uno studio separato condotto su 850 bambini sani (46% di maschi, 54% di femmine) d'età compresa tra i 5 e i 15 anni, l'intervallo di riferimento da 0,51 a 1,05 mg/l è stato confermato per tutte le età fino ai 5 anni [7].

Caratteristiche della prestazione

Tutti gli studi sono stati eseguiti utilizzando un lotto di reagenti in un laboratorio, se non diversamente riportato.

Precisione

L'immunodosaggio per cistatina C Gentian è stato usato in uno studio di accuratezza di 3 giorni progettato in osservanza del protocollo EP5-A del CLSI. Sono stati misurati 4 pool di siero e 2 livelli di controlli sui sistemi Beckman Coulter® IMMAGE 800*.

ID	Valore medio (mg/l)	CV intra-analisi (%)	CV totale (%)	N
P1	0,72	1,71	3,86	10
P2	0,62	2,35	5,59	10
P3	0,67	3,74	3,76	10
P4	0,96	1,63	3,10	10
P5	0,82	2,14	6,78	10
P6	2,54	0,67	3,84	10

Linearità

L'immunodosaggio per cistatina C Gentian è stato usato in uno studio di linearità sul sistema IMMAGE 800; è stata osservata una linearità nel range 0,35-6,79 mg/l. Non sono state testate concentrazioni fuori da questi range.

Recupero analitico

Utilizzando l'immunodosaggio per cistatina C Gentian su un sistema Beckman Coulter® IMMAGE 800, si osserva un recupero del 100-110%.

Limite di quantificazione

Usando l'immunodosaggio per cistatina C Gentian su un sistema IMMAGE 800, un limite di quantificazione inferiore è stato misurato in 0,24 mg/l.

Zona di sicurezza

In uno studio su IMMAGE 800, la zona di sicurezza per l'eccesso di antigene si è estesa fino a 43 mg/l utilizzando l'immunodosaggio per cistatina C Gentian.

Interferenza

In uno studio, non è stata individuata alcuna interferenza significativa con emoglobina (8 g/l), intralipidi (16 g/l) o bilirubina (800 mg/l) nei campioni di cistatina C. Lo studio di interferenza è stato progettato in osservanza del protocollo EP7-A del CLSI [8]. In precedenza, non era stata individuata alcuna interferenza significativa con i farmaci testati dietro suggerimento di Sonntag e Scholer [9]. Nell'immunodosaggio per cistatina C Gentian non sono presenti interferenze del fattore reumatoide in quanto gli anticorpi sono di origine aviaria (pollo) [10].

Variazioni tra strumenti

Variazioni tra cistatina C Gentian su IMMAGE e su Hitachi 917 sono state misurate e i risultati sono stati analizzati utilizzando l'analisi di regressione di Passing-Bablok:

Metodi	N	Range campione (mg/l)	Voce	Coefficiente	Intervallo di confidenza 95% del coefficiente
IMMAGE 800 vs Hitachi 917	24	0,58-6,97	Intercetta	0,08	0,05-0,11
			Pendenza	1,01	0,99-1,03

Informazioni aggiuntive

Per informazioni più dettagliate sui sistemi IMMAGE®, consultare il manuale di tali sistemi. Dato che Beckman Coulter® non produce il reagente e non esegue il controllo di qualità o altre prove sui lotti individuali, non è di conseguenza responsabile della qualità dei risultati ottenuti, che dipende dalle prestazioni del reagente, dalle differenze tra i lotti di reagente o dalle modifiche al protocollo effettuate dalla ditta produttrice.

Danni di spedizione

Si prega di avvisare il distributore del prodotto qualora alla consegna il prodotto risulti danneggiato. Per assistenza tecnica, rivolgersi al rappresentante Beckman Coulter® di zona. Per altre lingue, visitare: <http://gentian.no/products/beckman-coulter-customers/>

Legenda dei simboli



Numero di lotto



Limiti di temperatura



Data di scadenza



Consultare le istruzioni per l'uso



Ditta produttrice



Numero di catalogo



Dispositivo medico diagnostico in vitro



Attenzione



Rischio biologico



Gentian AS CE

Bjornasveien 5, N-1596 Moss, Norvegia

TEL: +47 99 33 99 05

FAX: +47 69 24 09 62

<http://www.gentian.no>

Bibliografia

1. Abrahamson M et al: Biochem J 1990;268:287-94.
2. Laterza OF et al: Clin Chem 2002;48:63-99.
3. Grubb AO. Adv Clin Chem 2000;35:63-99.
4. Filler G et al: Clin Biochem 2005 ;38 :1-8.
5. Flodin M et al: Scand J Clin Lab Invest 2007;67:560-567
6. Shlipak M.G, et al: Clinical Chemistry 57: 737-745, 2011
7. Nitsch D. et al: The Uppsala Family Stud. Am J Kidney Dis. 2011;57(6):863-872
8. CLSI; Document EP7-A ; Interference testing in Clinical Chem ; Approved Guideline.
9. Sonntag O, Scholer A: Ann Clin Biochem 2001 ;38 :376-85.
10. Larsson A et al: Poultry Science 1993 ;72 :1807-1812.

Impostazioni dello strumento per Immunodosaggio per cistatina C su sistemi Beckman Coulter® IMAGE*(IMAGE 800)

Pagina 1

Nome del test: cysx	Unità: mg/l
Numero di lotto reagente: *	Protocollo: NIPIA non competitivo
Numero cartuccia: **	Data di scadenza reagente: *
Numero di serie reagente: **	Test per lotto: 40
Limite AGXS:	AGXS abilitato:

Pagina 2

Tampone BUF10	Diluyente: DIL10
Volume campione: 5 µl	Diluizione calibratore: 1:1
Volume tampone di reazione 0 µl	Diluizione campione: 1:1
Volume reagente A: 30 µl	Tempo di reazione: 5 minuti
Volume reagente B: 195 µl	

Pagina 3:

Livelli: 6	Livello calibratore
Replica: 2	Livello 1: *
Aggiornamento livello: 3	Livello 2: *
Replica: 2	Livello 3: *
Tipo di calibrazione: 3. ordine polinomio	Livello 4: *
	Livello 5: *
	Livello 6: *

Pendenza e offset (sotto "Reagente e calibrazione")

Fattore a (a·x + b) : 1,10

Trasferire il tampone del dosaggio per cistatina C Gentian nello scomparto B e le immunoparticelle di cistatina C Gentian nello scomparto A. Il volume massimo dello scomparto "A" e "B" della cartuccia UDR è 8,5 ml. Di conseguenza, il numero massimo di test caricati nella cartuccia è pari a circa 40 test.

* Dipende dal lotto

** Definito dall'utente