

Finalidade

Método UV para a determinação da isoenzima MB de Creatina Quinase em soro ou plasma utilizando anticorpos anti CK-M.

Significado clínico

A Creatina Quinase (CK) é uma enzima intramuscular constituída por uma sub-unidade M (músculo) e outra sub-unidade B (brain = cérebro) que combinam-se dando lugar às isoenzimas CK-MM (muscular), CK-BB (cerebral) e CK-MB (miocárdica).

A elevação sérica de CK e de CK-MB constitui um indicador de injúria do miocárdio. Depois de um enfarte agudo do miocárdio, em aproximadamente o 55% dos casos o pico máximo de elevação de CK e CK-MB se produz de forma simultânea, ao passo que 45% dos casos a elevação máxima de CK-MB precede à do CK total.

Fundamentos do método

O método baseia-se na inibição específica das sub-unidades CK-M com anticorpos anti CK-M. Os anticorpos inibem tanto a isoenzima MM como as sub-unidades M correspondentes a CK-MB. As sub-unidades B se determinam mediante o emprego de um sistema reativo baseado em uma técnica analítica otimizada pela IFCC, com N-acetilcisteína como ativador, adicionada de anticorpos anti CK-M.

Reagentes fornecidos

A. Reagente A: solução de tampão imidazol.

B. Reagente B: solução contendo creatina fosfato, anticorpos anti-CK M e componentes reativos em quantidades suficientes para obter as seguintes concentrações finais:

imidazol	100 mmol/L; pH 6,7
creatina fosfato.....	30 mmol/L
ADP.....	2 mmol/L
glicose.....	20 mmol/L
NADP.....	2 mmol/L
hexoquinase	≥ 2500 U/L
glicose-6-fosfato desidrogenase.....	≥ 2000 U/L
acetato de magnésio.....	10 mmol/L
AMP.....	5 mmol/L
di-(adenosina-5') pentaosfato.....	10 umol/L
N-acetil cisteína (NAC).....	20 mmol/L
Anticorpos capazes de inibir 1000 U/L de CK-M.	

Controle: frasco contendo CK-MB de origem humano, liofilizado (vide tabela anexa para valor teórico).

Reagentes não fornecidos

Solução fisiológica (cloreto de sódio 9 g/dL).

Água destilada.

Instruções de uso

Reagentes Fornecidos: prontos para uso. Podem-se utilizar separados ou como Reagente único misturando 5 partes de **Reagente A** com 1 parte de **Reagente B** (ex. 5 mL Reagente A + 1 mL Reagente B).

Controle: abrir o frasco tendo a precaução de não perder material. Reconstituir com o volume de água destilada indicado no rótulo. Tampar e esperar 5 minutos. Dissolver o conteúdo completamente por inversão do frasco. O Controle de CK-MB reconstituído deve ser tratado da mesma forma que uma amostra desconhecida.

Precauções

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".

O Controle foi examinado para antígeno de superfície do vírus da hepatite B, vírus da hepatite C e anticorpos contra HIV 1/2, encontrando-se não reativos. No entanto, as amostras e o Controle, devem-se manipular como se tratando de material infectante.

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

Estabilidade e instruções de armazenamento

Reagentes Fornecidos: estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Uma vez abertos, não devem permanecer fora do refrigerador por períodos prolongados. Evitar contaminações. **Reagente único** (pre-misturado): estável 20 dias sob refrigeração (2-10°C) a partir do momento de sua reconstituição.

Controle reconstituído: estável por 3 dias sob refrigeração (2-10°C), por 2 dias sob 25°C ou por 3 meses congelado (-20°C). Não congelar e descongelar repetidamente.

Indícios de instabilidade ou deterioração dos reagentes

Quando o espectrofotômetro for zerado com água destilada e as leituras de

absorbância do Reagente único forem superiores a 0,500 D.O. (a 340 nm) são indício de deterioração do mesmo.

Amostra

Soro ou plasma

a) Coleta: obter o soro da modo usual.

b) Aditivos: caso a amostra usada seja plasma, deve-se utilizar heparina ou EDTA como anticoagulante.

c) Estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra deve ser fresca. Refrigerada (2-10°C) perde até 10% de atividade enzimática em um dia.

Interferências

Não são observadas interferências por bilirrubina até 390 mg/L (39 mg/dL), triglicerídeos até 300 mg/dL (3 g/L), nem hemoglobina até 0,06 g/dL (60 mg/dL) (hemólise leve). Os soros com hemólise visível produzem valores falsamente aumentados, portanto não devem ser usados.

Referência bibliográfica Young à efeitos de drogas neste método.

Material necessário (não fornecido)

- Espectrofotômetro.
- Micropipetas e pipetas para medir os volumes indicados.
- Banho-maria à temperatura indicada em "Procedimento".
- Cronômetro.

Condições de reação

- Comprimento de onda: 340 nm (Hg 334 ou 366).

- Temperatura da reação: 25, 30 ou 37°C. Selecionar a temperatura conforme o instrumental. Vide "Valores de referencia" correspondentes a cada temperatura.

- Tempo de reação: 6 minutos

- Os volumes de amostra e reagente podem-se variar proporcionalmente (ex. 100 uL amostra + 2,5 mL Reagente único ou 20 uL amostra + 500 uL Reagente único).

Procedimento

Técnica com reagente único

Zerar o aparelho com água destilada.

Em uma cubeta mantida à temperatura de selecionada (25, 30 ou 37°C) colocar:

Reagente único	1 mL
Preincubar alguns minutos, e depois adicionar:	
Amostra	40 uL

Misturar imediatamente por inversão. Esperar 10 minutos. Ajustar a absorbância a um valor de referência e disparar simultaneamente o cronômetro. Registrar a absorbância cada minuto, durante 3 minutos. Determinar a diferença média de absorbância/min ($\Delta A/\text{min}$), subtraindo a cada leitura a anterior e tirando a média destes valores. Utilizar esta média para os cálculos.

Cálculo dos resultados

$CK-MB (U/L) = \Delta A/\text{min} \times \text{fator}$

Medida a 340 nm: $CK-MB (U/L) = \Delta A/\text{min} \times 8,254$

Medida a Hg 334: $CK-MB (U/L) = \Delta A/\text{min} \times 8,414$

Medida a Hg 366: $CK-MB (U/L) = \Delta A/\text{min} \times 14,858$

Os fatores mencionados anteriormente já têm incluída a correção necessária para converter o valor de CK-B em CK-MB.

Exemplo:

(Os dados apresentados a seguir são ilustrativos)

	Amostra	Diferença	Promédio
Absorbância A1	0,351		
Absorbância A2	0,358	0,007	
Absorbância A3	0,374	0,006	
Absorbância A4	0,382	0,008	0,007

Utilizando Fator teórico (37°C):

$CK-MB (U/L) = 0,007 \times 8254 = 57 U/L$

Se é utilizado Laborcal como calibrador:

Concentração de CK-MB no calibrador: 237 U/L (37°C)

	Calibrador	Diferença	Promédio
Absorbância A1	0,259		
Absorbância A2	0,286	0,027	
Absorbância A3	0,315	0,029	
Absorbância A4	0,344	0,029	0,028

Determinação do fator de calibração:

$$\text{Fator} = \frac{[\text{CK-MB}]_{\text{calibrador}}}{\Delta\text{A}/\text{min}_{\text{calibrador}}} = \frac{237 \text{ U/L}}{0,028} = 8464$$

$$\text{CK-MB (U/L)} = \Delta\text{A}/\text{min}_{\text{amostra}} \times \text{Fator} = 0,007 \times 8464 = 59 \text{ U/L}$$

Método de controle de qualidade

Processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (Controle CK MB) com atividades conhecidas de CK-MB com cada determinação.

Valores de referência

Temperatura	25°C	30°C	37°C
Valores	≤ 10 U/L	≤ 16 U/L	≤ 25 U/L

Conversão de unidades ao sistema SI

$$\text{CK-M (U/L)} \times 0,017 = \text{CK-MB (ukat/L)}$$

Interpretação dos resultados

Existe alta probabilidade de dano do miocárdio se são cumpridas simultaneamente as seguintes condições:

1- A atividade de CK total excede as seguintes faixas normais:

Temperatura	25°C	30°C	37°C
Homens	10-80 U/L	15-130 U/L	24-195 U/L
Mulheres	10-70 U/L	15-110 U/L	24-170 U/L

Caso haja suspeita de dano de miocárdio e os valores se encontrarem inferiores à faixa normal, existe a possibilidade de um enfarte recente. Neste caso a determinação deve ser repetida após 4 horas.

2- A atividade de CK-MB excede os valores normais. Vide "Valores de referência".

3- A porcentagem de CK-MB se encontra entre 6-20% do valor de CK total.

Se a porcentagem é menor que 6% é provável que exista dano do músculo esquelético. Se a porcentagem supera 20% do valor total de CK, pode-se suspeitar a presença de uma forma macro de CK (CK atípica) que não é inibida pelos anticorpos anti CK-M.

A presença de CK atípica pode ser determinada por:

- Persistência por mais de 48 horas (a CK-MB decai aproximadamente às 30-48 horas do início do enfarte).
- Estabilidade frente ao tratamento da amostra a 40°C durante 20 minutos.
- Análise eletroforética (obtém-se uma banda entre as isoenzimas MM e MB).

Limitações do procedimento

Vide "Interferências".

Amostras com atividades CK total que superam as 1000 U/L devem ser diluídas com solução fisiológica. O resultado obtido deve ser multiplicado pela diluição efetuada.

Desempenho

a) Reprodutibilidade: aplicando o protocolo EP-15A do CLSI, se analisaram dois níveis de atividade, cada um por quadruplicado durante 5 dias. Com os dados obtidos, calcularam-se as precisões intra-ensaio e total.

Precisão intra-ensaio (n = 20)

Nível	D.P.	C.V.
41 U/L	± 0,69 U/L	1,7%
232 U/L	± 2,55 U/L	1,1%

Precisão total (n = 20)

Nível	D.P.	C.V.
41 U/L	± 0,98 U/L	2,4%
232 U/L	± 3,94 U/L	1,7%

b) Linearidade: a reação é linear até 500 U/mL.

c) Sensibilidade analítica: depende do fotômetro utilizado e da comprimento de onda. Em espectrofotômetros a 340 nm com cubetas de faces paralelas de 1 cm de espessura, para um $\Delta\text{A}/\text{min}$ de 0,001, a mínima mudança de atividade detectável, será 8 U/L.

Parâmetros para analisadores automáticos

Para a programação consultar o manual de uso do analisador a ser utilizado.

Apresentação

- 1 x 50 mL Reagente A
 - 1 x 10 mL Reagente B
 - 1 x C → 2 mL (Control)
- (Cód. 1770060)

Referência

- D.G.K.C. - Z. Klin. Chem. 10:281 (1972).
- S.S.C.C. - Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33:291 (1974).
- I.F.C.C. - Clínica Chimica Acta 105:147F (1980).
- Würzburg, U. et al - J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15:131 (1977).
- Stein, W. - Med. Welt 36:572 (1985).
- Szasz, G.; Busch, E.W. - Third European Congress of Clinical Chemistry, Brighton, England, 3-8. June 1979 (Abstract).
- Lorenzo, L.; Capriotti, G.; Rojkin, F. - Revista A.B.A. 55/3 (1991).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACCPress, Shed., 2000.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCLLS) - Protocols EP 15A (2001) / EP 17A (2004).

SÍMBOLOS



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Européia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado na Comunidade Européia



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Conteúdo suficiente para <n> testes



Data de validade



Limite de temperatura (conservar a)



Não congelar



Risco biológico



Volume após da reconstituição



Conteúdo



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar as instruções de uso



Calibrador



Controle



Controle Positivo



Controle Negativo



Número de catálogo

Termo de garantia

Este Kit como um todo tem garantia de troca, desde que esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado pelo Departamento Técnico da Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda. que não houve falhas técnicas na execução e manuseio deste kit, assim como em sua conservação.



Produtos para Laboratórios Ltda.
Estrada do Capão Bonito, 489
Guarulhos - SP - Brasil - CEP: 07263-010
CNPJ: 72.807.043/0001-94
Atendimento ao cliente:
+55 (11) 2480 0529/+55 (11) 2499 1277
sac@laborlab.com.br
www.laborlab.com.br