



TECO GRAM S.A.

Av. San Jorge 428 y 10ma.
Guayaquil - Ecuador
042396966 – 042397979 – 042396610
tecogram@gye.satnet.net

JUEGO DE REACTIVOS PARA CK - MB

USO ESPERADO El CK-MB ha sido fabricado para medir la actividad de la isoenzima CK-MB en suero humano. **INTRODUCCION** Las Creatine Kinase son moléculas diméricas compuestas de subunidades M y B y existen como isoenzimas MM, MB, y BB. Las subunidades M y B son distintas inmunológicamente; CK-MM y CK-MB son distribuidas principalmente en el músculo esquelético y en el músculo del corazón, respectivamente. Mientras que la mayoría del CK-BB está presente el cerebro y en tejidos compuestos de músculo suave. Después de un infarto agudo al miocardio, la actividad del CK-MB aumenta significativamente y este incremento es altamente específico para el diagnóstico de laboratorio de infarto al miocardio. Aunque la actividad total del CK usualmente aumente después de un infarto al miocardio, en algunos pacientes solo aumenta el CK-MB, y el total del CK se mantiene en el rango normal. En los métodos convencionales, las isoenzimas de CK son cuantificadas después de separar sus tres especies por electroforesis, intercambio de columnas de anión, o cromatografía de intercambio de anión. De cualquier forma, estos métodos toman mucho tiempo. Hace poco tiempo, Wurzburg introdujo un método por inmuno inhibición. Esta metodología forma la base de nuestro reactivo de CK-MB. **PRINCIPIO** La muestra se incuba en el reactivo de CK-MB, que incluye el anticuerpo anti-CK-M. La actividad del CK-B no inhibido luego es determinada usando las siguientes series de reacciones: $CK + ADP + Fosfato de Creatina \rightleftharpoons Creatina + ATP + Glucosa$ $ATP + Glucosa-6-Fosfato \xrightarrow{G6PD} G-6-P + NAD^+$ $G-6-P + NADH + H^+ \xrightarrow{La CK-B} 6-Fosfogluconato + NADH + H^+$ La CK-B cataliza el fosforización reversible del ADP, en la presencia de fosfato de creatina, para formar

ATP y creatina. La enzima auxiliar hexokinasa (HK) cataliza la fosforización de la glucosa por el formato ATP, para producir ADP y la glucosa-6-fosfato (G-6-P) se oxida transformándose en 6-Fosfogluconato con la producción concomitante de NADH. El porcentaje de formación de NADH, medido a 340 nm, es directamente proporcional a la actividad del CK-B en suero. **COMPOSICION DEL REACTIVO** Reactivo de CK-MB Fosfato de Creatina 30 mM; Adenosin-5-Fosfato 2 mM; Dinucleotido de Nicotinamida Adenina 2 mM; Hexokinasa > 3000 U/L; Dehidrogenasa de Glucosa-6-Fosfato (Bacterial) > 2000 U/L; Diluyente de CK-MB: Buffer 100 mM; Anticuerpo anti-humano de CK-M (cabra) – cantidad suficiente para inhibirse a 1500 U/L de CK-MM a 37°C. **ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES** Para diagnóstico in vitro. Utilice las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos de laboratorio. No es recomendable pipetear con la boca con ningún reactivo. **PREPARACION DEL REACTIVO** Reconstituya cada frasco de reactivo de CK-MB con el volumen de diluyente de CK-MB especificado en la etiqueta del frasco. Mezcle hasta disolver. **ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD** El reactivo no reconstituido y el diluyente deben ser almacenados a 2 – 8°C. Estos son estables hasta la fecha de expiración. El reactivo reconstituido es estable por lo menos por 7 días en refrigeración (2 – 8°C) y por 24 horas a temperatura ambiente (15 – 30°C). **RECOLECCION DE LA MUESTRA** El suero es la muestra de elección para este ensayo. Evite exponer las muestras a la luz fuerte. Almacene las muestras en refrigeración (2 – 8°C), pero no por más de una semana. El congelamiento de las muestras (-20°C) puede resultar en una pérdida mínima de actividad. **SUBSTANCIAS**

QUE INTERFIEREN Las muestras extremadamente hemolizadas no deben usarse para esta prueba, puesto que pueden contener niveles altos de kinasa de adenilato, ATP, y glucosa-6-fosfato, el cual interfiere con la prueba y puede conducir a un falso resultado. Las drogas y otras sustancias, las cuales pueden interferir con la determinación de la actividad de la creatina kinasa, ha sido redactadas por Young. El procedimiento descrito puede sobre estimar los valores del CK-MB si la actividad del CK-BB en el suero es muy alta. De cualquier forma, la actividad de CK-BB usualmente está ausente en el suero de individuos normales y pacientes con infartos al miocardio. Algunos investigadores han observado una forma macro de BB complejo de inmunoglobulina), el cual puede ser medido como B en este ensayo. La presencia de macro BB en la muestra debe ser estudiada si la actividad de CK-B medida por este procedimiento representa más del 20 del total de la actividad de CK.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS La muestra y pipetas de reactivo, tubos de ensayo o cubetas, cronómetro, Baño María, espectrofotómetro, suero de control.

PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO Consulte las instrucciones apropiadas del instrumento.

NOTA: Ciertos instrumentos requieren diferentes volúmenes de reconstitución a los establecidos en la etiqueta del frasco. Refiérase a las hojas de una aplicación apropiada.

PROCEDIMIENTO MANUAL Reconstituya el reactivo de CK-MB de acuerdo a las instrucciones. Pipete 1.0 ml de reactivo de CK-MB a los tubos de ensayo apropiados y pre-caliente a 37°C por lo menos por dos 2) minutos. Ponga a 0 el espectrofotómetro con agua a 340 nm. Añada 0.050 50 ul) de muestra al reactivo, mezcle, e incube a 37°C por cinco 5) minutos. Después de cinco minutos, lea y grabe el cambio en la absorbancia por minuto por dos 2) minutos. Calcule el promedio de diferencia de absorbancia por minuto Δ Abs./min). La Δ Abs./min multiplicada por el factor 3376 Ver Calculos) conducirá a un resultado de CK-MB en IU/L- Las muestras con valores superiores a 1500 IU/L deben ser diluidas 1:1 con solución salina,

deben ser re-analizados, y los resultados deben ser multiplicados por dos 2). **NOTA:** Si el espectrofotómetro a usarse requiere de un volumen final mayor que 1.0 ml para lecturas precisas, pueden usarse 3.0 ml de reactivo y 0.15 ml 150 ul) de muestra. Si el espectrofotómetro a usarse está equipado con una cubeta de temperatura controlada, la mezcla de la reacción puede ser dejada en la cubeta mientras se toman las lecturas.

LIMITES DE LA PRUEBA El procedimiento asume que la actividad de CK-BB en la muestra es insignificante. Si se encuentra presente una actividad significativa de CK-BB, entonces la actividad del CK-MB también será sobre estimada.

CALCULOS Actividad Total del CK: Determine la actividad total del CK en suero de acuerdo a las instrucciones provistas en la técnica de reactivo de CK.

Actividad de CK-B:

$$\text{IU/L} = \frac{\Delta \text{ Abs./min} \times \text{TV} \times 1000}{d \times \epsilon \times \text{SV}}$$

$$1 \times 6.22 \times 0.050 = \Delta \text{ Abs./min} \times 3376$$
 En donde: Δ Abs./min= Promedio del cambio de absorbancia por minuto. TV= Volumen total de reacción 1.050). 1000= Conversión de IU/ml a IU/Ld= Paso de la luz en cm 1.0) ϵ = Absorción milimolar de NADH 6.22) SV= Volumen de la muestra en ml 0.050) Actividad de CK-MB: La actividad del CK-MB se calcula de la actividad del CK-B de la siguiente forma: Actividad de CK-MB U/L) = Actividad de CK-B U/L) x 2**La molécula de CK-MB consiste en una subunidad B y una subunidad M. El complejo de anticuerpo con la subunidad M resulta en la pérdida de la mitad de la actividad catalítica de la molécula de CK-MB. Así, la actividad del CK-MB en la muestra es igual o el doble de la actividad del CK-B. Ejemplo: Si su promedio de absorbancia por minuto es 0.020, entonces: $0.020 \times 3376 = 67.5$ IU/L Actividad CK-B) **NOTA:** La actividad CK-MB IU/L) = Actividad de CK-B IU/L) x 2 Por ejemplo, si la actividad del CK-B es 67.5 IU/L, entonces el CK-MB = $67.5 \times 2 = 135.0$ Porcentaje de la actividad del CK-MB en la muestra es: actividad del CK-MB = Actividad del CK-MB x 100 Total actividad del CK Por ejemplo, si el total de la actividad del CK es 1007

IU/L, la actividad de CK-B es 67.5 IU/L, y la actividad del CK-MB es 135 IU/L, entonces el de la actividad del CK-MB = $135 \times 100 = 13.51007$ CALIBRACION La actividad de CK en la muestra se calcula basándose en la absorción milimolar del NAD. El reactivo de CK-MB es apropiado para el ensayo de isoenzima de CK cuando la actividad total del CK en la muestra no excede de 1500 IU/L a 37°C. CONTROL DE CALIDAD Use el suero de control con valores normales y anormales para monitorear la integridad de la reacción en cada juego de ensayos. Los valores deben ser aceptables para este método y temperatura. FACTORES DE CONVERSION DE TEMPERATURA Para convertir la actividad del CK-MB de 37°C a un valor de 30°C, multiplique el resultado por 0.60. VALORES ESPERADOS 0 – 24 IU/L 37°C) 0 – 14 IU/L 30°C) de CK-MB < 5.5. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores esperados, puesto que existen diferencias entre los instrumentos, laboratorios y poblaciones locales. CARACTERISTICAS DE LA PRUEBA Linealidad: 1500 IU/L. Sensibilidad: Basada en una resolución del instrumento de $A = 0.001$, este procedimiento tiene una estabilidad de 4 IU/L. Comparación: Estudios realizados entre este procedimiento y el procedimiento Sigma condujeron a un coeficiente de correlación de 0.98 con una ecuación de regresión de $Y = 0.98X - 0.823$ (N=40). Precisión: Dentro de la corrida Promedio IU/L) S.D. C.V. 342.88.21329.97.5 De corrida a corrida Promedio IU/L) S.D. C.V. 323.19.8122.89.27.4