



TECO DIAGNOSTICS

1268 N. Lakeview Ave.
Anaheim, CA 92807
1-800-222-9880

USO RECOMENDADO

Diseñado para la determinación cuantitativa de Creatine Kinase en suero humano

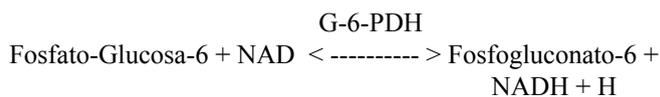
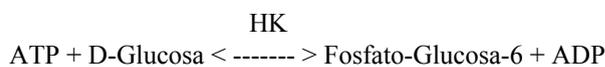
INTRODUCCION

La Creatine Kinase (CK) juega un papel importante en el mecanismo de reservas de energía de los tejidos, catalizando la reacción reversible entre la creatinina y el ATP para formar fosfato de creatina y ADP. La CK es distribuida en varios órganos; las mayores actividades (en orden decreciente) son el músculo esquelético, el corazón y cerebro. Así, la determinación de CK se convierte en una ayuda en el diagnóstico de distrofia muscular y otras enfermedades musculares óseas, infarto del miocardio, hipotiroidismo, enfermedades renales, y/o disfunciones.

El procedimiento antiguo para determinar CK estaba basado en el nivel de formación de ATP. Nielsen describió un método modificado, añadiendo un compuesto de sulfhidril y de AMP para asegurar la actividad máxima de CK e inhibir la actividad de kinasas adenilato. Las condiciones óptimas para medir el CK fueron publicadas por Szas en 1976, así como por el comité escandinavo para la enzima.

PRINCIPIO

Secuencia de la reacción



La CK cataliza la conversión de fosfato de creatina y ADP a ATP. El ATP y la glucosa se convierten en ADP y fosfato-glucosa-6 por la hexokinasa (HK). La deshidrogenada de Fosfato-Glucosa-6 (G-6-PDH) oxida al D-Fosfato-Glucosa-6 y reduce el denucleótido de nicotinamida y adenina (NAD). El valor de la formación de NAD, medido a 340 nm es directamente proporcional a la actividad de CK en el suero.

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO

Cuando se ha reconstituido según se indica, el reactivo para CK contiene lo siguiente:

D-Glucosa	20 mM
Magnesio	10 mM
Monofosfato-Adenosina-5 (AMP)	50 mM
N-Acetilcisteína (NAC)	20 mM
Fosfato de creatina	30 mM
Adenosina-5-Difosfato	2 mM
Fosfato Dinucleótido Oxidado de Adenina Nicotinamida	2 mM

REACTIVO DE CREATINE-KINASE (CK-NAC) (METODO CINETICO UV)

Deshidrogenada de Fosfato-Glucosa-6 (E.C.1.1.1.49, G-6-PDH)	3,000 UL
Hexokinasa (E.C.2.7.1.1. HK)	3,000 UL
EDTA	2 Mm
Buffer	100 mM

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Uso únicamente para diagnóstico in Vitro.
2. Siga las precauciones requeridas normalmente para el manejo de reactivos de laboratorio. No se recomienda pipetear con la boca a ningún laboratorio clínico.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Reconstituya cada frasco con el volumen específico de agua destilada, mezcle para que se disuelva.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El reactivo puede ser almacenado a una temperatura de 2 – 8°C antes de ser reconstituido. El reactivo puede ser usado hasta antes de su fecha de caducidad indicada en la etiqueta del reactivo. Una vez reconstituido, el reactivo es estable por veinticuatro (24) horas a temperatura ambiente o por veintidós (22) en la temperatura del refrigerador.

DETERIORO DEL REACTIVO

1. Apariencia Física
Si el reactivo se ve húmedo y con grumos, puede haber ocurrido una deterioración y el producto debe ser desechado.
2. Absorbancia del blanco
Si el reactivo reconstituido de CK, sin agregar la muestra, tiene una absorbancia sobre los 0.70 a 340 nm comparado con el grado de agua, el reactivo se considera insatisfactorio para el uso y debe ser desechado.
3. Ensayo de controles
Si se falla al obtener resultados precisos en el ensayo de los materiales de control, esto puede indicar el deterioro del reactivo.
4. No podemos garantizar la estabilidad de los reactivos que han sido:
 - a. transferidos de sus envases originales.
 - b. Almacenados inapropiadamente antes o durante su uso.
 - c. Contaminados durante su uso.

RECOLECCION DE LA MUESTRA

Colecte la sangre entera mediante venipuntura no traumática y permita que se forme coágulo. Centrifugue y retire el suero inmediatamente. El suero estable para reportarse por cuatro (4) horas en temperatura ambiente, de 8 – 12 horas en 4°C y de 2 – 3 días congelado.

Muestras hemolizadas no deben ser usadas debido a que pueden ocurrir reacciones colaterales debido al kinasa adenilato, trifosfato de adenosina, y deshidrogenada fosfato-glucosa-6 liberada de las células rojas.

SUBSTANCIAS QUE INTERFIEREN

Ciertas drogas y medicamentos pueden afectar la actividad de la CK.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

Pipetas para las muestras y reactivos, frascos o cubetas para las pruebas, cronómetro, tubera, espectrofotómetro, suero control, Baño María.

INSTRUCCIONES GENERALES

Este reactivo ha sido fabricado para ser usado tanto como en un procedimiento automatizado en un instrumento de químicos, como en un procedimiento en un espectrofotómetro apropiado.

PROCEDIMIENTO (AUTOMATIZADO)

Vea las instrucciones apropiadas para la aplicación del instrumento.

PROCEDIMIENTO (MANUAL)

1. Reconstituya el reactivo de acuerdo a las instrucciones.
2. Pipetee 1.0 ml de reactivo en los tubos apropiados y preincúbelos a 37°C por cuatro (4) minutos.
3. Prepare el espectrofotómetro a 0 con agua destilada a 340 nm.
4. Añada 0.025 ml (25 µl) de muestra al reactivo, mezcle, e incube a 37°C por dos (2) minutos.
5. Después de dos minutos, lea y anote la absorbancia. Devuelva los tubos a los 37°C. Repita las lecturas cada minuto por los siguientes dos minutos.
6. Calcule diferencia promedio de la absorbancia por minuto (Δ Abs./min)
7. La Δ Abs./min multiplicada por el factor 6592 (Véase cálculos) dará el resultado en IU/L.
8. Las muestras con valores por encima de los 1,200 IU/L deben ser diluidos a 1:1 con solución salina, re-ensayado, y el resultado multiplicado por dos (2).

Nota: Si el espectrofotómetro en uso requiere un volumen final mayor que 1.0 ml para lecturas más precisas, se pueden usar 3 ml de reactivo, y 0.1 ml (100 µl) de muestra.

Si el espectrofotómetro en uso requiere un volumen final mayor que 1.0 ml para lecturas más precisas, se pueden usar 3 ml de reactivo, y 0.1 ml (100 µl) de muestra.

Si el espectrofotómetro en uso está equipado con cubetas de temperatura controlada, la mezcla de reacción puede ser dejada en la cubeta mientras se toman las lecturas de la absorbancia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Algunos inhibidores de la actividad del CK:
 - a. Exceso de Mg, CT: SO₄
 - b. La mayoría de los metales de tierra, ej: Zn, Cu, Mn.
 - c. Acetato de yodo, y otros agentes que contengan sulfidril.
 - d. Exceso de ADP, citrato, fluorado, L-tiroxina.
 - e. Exceso de ácido úrico.
2. Este procedimiento mide la actividad total irrespectiva de CK de su tejido u órgano de origen.
3. Valores menores de lo esperado de CK han sido reportados en muestras que tienen una alta actividad de fosfatasa alcalina.

CALCULOS

$$IU/L = \frac{\Delta Abs./min. \times TV \times 1000}{d \times e \times SV} = \frac{\Delta Abs./min. \times 1.025 \times 1000}{1 \times 6.22 \times 0.025}$$

$$= A Abs./min. \times 6592^*$$

Donde:

Δ Abs./min = Promedio del cambio de absorbancia por minuto.

TV = Volumen total de reacción (1.025)

1000 = Conversión de IU/ml a IU/L

d = Paso de luz en cm (1.0)

e = Absorción molar de NADH (6.22).

SV = Volumen de la muestra en ml (0.025)

Ejemplo: Si su promedio del cambio de absorbancia por minuto es 0.015, entonces 0.015 x 6592 = 98.9 IU/L.

NOTA: Si alguno de los parámetros de la prueba cambia, se debe determinar un nuevo factor usando la fórmula mencionada.

UNIDADES SI: Para convertir las Unidades SI (nKat/L) multiplique IU/L por 16.67.

* Si se usan 3 ml de reactivo y 0.1 (100 Δ Abs./min. x 4984).

CONTROL DE CALIDAD

Use un suero de control con valores conocidos normales y anormales para monitorear la integridad de la reacción. Los valores deben ser los aceptables para éste método y temperatura.

FACTORES DE TEMPERATURA Y CONVERSION

Puede convertir los resultados a resultados aproximados en otras temperaturas multiplicando por el factor de temperatura apropiado.

Temperatura Usada	Temperatura a reportarse		
	25°C(TF)	30°C(TF)	37°C(TF)
25°C	1.00	1.38	2.30
30°C	0.72	1.00	1.67
37°C	0.43	0.60	1.00

VALORES ESPERADOS

25 – 192 IU/L (37°C)

10 – 109 IU/L (30°C)

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores esperados.

CARACTERISTICAS DEL FUNCIONAMIENTO

1. Linearidad: 1.200 IU/L.
2. Comparación: Estudios realizados entre este procedimiento y uno similar llevaron a un coeficiente de correlación de 0.991 con una ecuación de regresión de $Y = 1.01X - 0.29$
3. Estudios de precisión:

<u>Promedio (mg/dl)</u>	<u>S.D.</u>	<u>Dentro de corrida</u>
		<u>C.V.%</u>
111	1.6	1.5
373.5	12.4	3.3

<u>Promedio (mg/dl)</u>	<u>S.D.</u>	<u>De corrida a corrida</u>
		<u>C.V.%</u>
110.9	4.3	3.9
367.4	10.3	2.8