

**USO:**

Para la determinación cuantitativa de Creatina Kinasa-MB en suero para procedimiento manual o automatizado

**RESUMEN DE LA PRUEBA Y PRINCIPIO:**

La Creatina Kinasa es un dímero formado por moléculas de subunidades M y B y existe como iso-enzima MM, MB y BB. La subunidad M y B son inmunológicamente distintas. CK-MM y CK-MB son distribuidas principalmente en el músculo esquelético y el músculo cardiaco, respectivamente, al mismo tiempo la CK-BB está presente principalmente en el cerebro y en los tejidos compuestos de músculo liso. Después del infarto agudo de miocardio, la actividad de CK-MB aumenta significativamente y esta elevación es altamente específica para el diagnóstico en laboratorio de infarto al miocardio. Aunque la actividad total de la CK aumenta generalmente después del infarto en algunos pacientes solamente la actividad de CK-MB aumenta, mientras que el CK total permanece en el rango normal. Este método es una prueba UV optimizada según DGKC (Sociedad Alemana de Química Clínica) e IFCC (Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio). En este procedimiento la actividad de la CK se mide en presencia de un anticuerpo contra el monómero CK-M. Este anticuerpo inhibe completamente la actividad de CK-MM y la mitad de la actividad de CK-MB sin afectar a la actividad de la subunidad B de CK-MB y CK-BB. Debido a concentraciones insignificantes de CK-BB en la circulación, la actividad restante, multiplicada por un factor de 2, representa la actividad de la isoenzima CK-MB.

**COMPOSICION DE REACTIVOS:**

CK-MB Reactivo 1

Glucosa 20.0 mmol/L, Acetato de magnesio 10.0 mmol/L, EDTA 2.0 mmol/L, Hexoquinasa 5.0 kU/L, LDH 1.5 kU/L, NAC 20.0 mmol/L, NADP 2.0 mmol/L Imidazol Buffer 50.0 mmol/L, anticuerpos monoclonal (ratón) contra la capacidad de inhibición de CK-M > 2000 U/L CK-MB.

CK-MB Reactivo 2

ADP 10.0 mmol/L, AMP 20.0 mmol/L, Di adenosín Penta fosfato 50.0 µmol/L, Creatina fosfato 150.0 mmol/L, G6P-DH 20 kU/L, Imidazol Buffer 50.0 mmol/L.

**PRECAUCIONES:**

*Solo uso para diagnóstico in Vitro*

Se deben seguir las precauciones normales que se ejercen en la manipulación de reactivos de laboratorio. No se pipete con la boca.

**PREPARACION DE REACTIVO:**

Los reactivos R1 CK-MB y R2 CK-MB se suministran listos para usar.

Para analizadores capaces de dispensar 2 reactivos separados y para analizadores que no puedan dispensar 2 reactivos o para uso manual, prepare un reactivo de trabajo en la proporción de 4 partes de reactivo R1 con 1 parte de reactivo R2 (Ejemplo: 4 mL de reactivo R1 y 1 mL de reactivo R2).

**ALMACENAJE Y ESTABILIDAD:**

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacenan adecuadamente a la temperatura de 2-8°C y protegido de la luz.. El reactivo 1 y 2 deben permanecer claros e incoloros. Desechar si aparece turbia o contiene partículas. Una vez preparado y protegido de la luz, el reactivo de trabajo es estable durante 2 semanas a 2-8 °C o 24 horas a 15-30 °C.

El suero claro no hemolizado es el indicado. No se requiere aditivos ni conservadores especiales. Siempre que sea posible, los especímenes deben separarse y analizarse el día de la recolección. Almacene el Suero en tubos tapados. Según los informes, la actividad de CK-MB en suero es estable durante 4 semanas, cuando se almacena en un área oscura a -20 °C. El almacenamiento a otras temperaturas resultará en una pérdida de actividad; después de 24 horas a 2-8°C, < 10%; después de una hora a 15-30 °C, < 10%. Las muestras extremadamente hemolizadas no son adecuadas para la prueba, ya que pueden contener altos niveles de adenilato quinasa, ATP y glucosa-6- fosfato, que interfieren con el ensayo para producir resultados falsos.

**SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN:**

El ácido ascórbico arriba de 30 mg/dL, niveles conjugados de bilirrubinas de hasta 24 mg/dL, niveles de bilirrubinas no conjugados de hasta 30 mg/dL y niveles de triglicéridos arriba de 1000 mg/dL no interfieren en esta prueba. La hemoglobina interfiere, incluso en concentraciones mínimas (25 mg/dL).

Young ha revisado los efectos de los fármacos sobre los niveles séricos de CK-MB. El procedimiento descrito puede sobrestimar los valores de CK-MB si la actividad de CK-BB en el suero es muy alta. Sin embargo, la actividad de la CK-BB suele estar ausente en los sueros de individuos normales y pacientes con infarto de miocardio. Algunos investigadores han observado una forma macro de BB (complejo de inmunoglobulina), que puede medirse como B en este ensayo. La presencia de macro BB en la muestra debe sospecharse si la actividad de la CK-B medida por este procedimiento representa más del 20% de la actividad total de la CK.

**MATERIAL PROVISTO**

Reactivo CK-MB R1 y Reactivo CK-MB R2

**MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO**

Espectrofotómetro capaz de leer la absorbancia a 340 nm y 1 cm de trayectoria de luz.

Bloque de temperatura constante o baño, 37 °C o cubeta de temperatura controlada.

Dispositivos de pipeteo precisos, tubos de ensayo, temporizador de intervalos.

**PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO:**

Los parámetros de Aplicación para varios instrumentos automatizados se encuentran disponibles.

**PROCEDIMIENTO MANUAL:**

1. Permitir que los reactivos y las muestras se equilibren a la temperatura ambiente antes de su uso.
2. Prepare el reactivo de trabajo CK-MB de acuerdo a las instrucciones (ver sección de preparación de reactivo)
3. Ajuste el espectrofotómetro a 340 nm con agua destilada.
4. Para cada muestra y control, agregue 1.0 mL de reactivo de trabajo a la cubeta o al tubo de ensayo e incube a 37 °C durante 4 minutos.

5. Añadir 40 µL de suero al tubo respectivo y mezclar suavemente.
6. Lea y registre la absorbancia a los 5 minutos. Continuar incubando a 37°C y volver a registrar la absorbancia a los 6, 7, 8 y 9 minutos. Debe ser constante.
7. Determinar la absorbancia media por minuto (A/min), multiplicar por el factor 8360 (4180 x 2) para los resultados en U/L.

**NOTA:** Si la cubeta no tiene temperatura controlada, incube las muestras a 37 °C entre lecturas.

**CALIBRACION:**

No se requiere calibración. Si el fabricante del instrumento requiere la calibración, siga las instrucciones de calibración para calibrar el analizador.

**CONTROL DE CALIDAD:**

Pointe Sc. recomienda el uso de controles disponibles comercialmente con valores de CK-MB ensayados por este método para verificar la exactitud y la precisión. Los controles que contienen fracciones CK-MB no humanas no son adecuados para ser aplicados con esta prueba debido al anticuerpo monoclonal utilizado en el reactivo. Utilice controles que contengan exclusivamente CK-MB humanos. La actividad de CK-MB determinada en estos materiales, por este procedimiento debe caer dentro de los rangos de los controles. Se deben analizar dos niveles (Normal/Anormal) de controles cada día de prueba.

**RESULTADOS:**

La actividad CK-B: Los valores se derivan en base al coeficiente de extinción micromolar de absorbancia de NADP a 340 nm (0,00622). Una unidad por litro (U/L) de actividad CK-B es aquella cantidad de enzima que oxida un µmol/L de NADP por minuto.

$$\text{Actividad CK-B U/L} = \frac{\text{A/Min} \times \text{Volumen total (mL)}}{\text{Absorbancia} \times \text{Volumen de muestra (mL)}}$$

$$\text{Actividad CK-B U/L} = \frac{\text{A/Min}}{0.00622} \times \frac{1.040}{0.040}$$

$$\text{Actividad CK-B U/L} = \text{A/Min} \times 4180$$

$$\text{Actividad CK-MB (U/L)} = \text{Actividad CK-B (U/L)} \times 2 \%$$

$$\text{Actividad CK-MB} = \frac{\text{Actividad CK-MB (U/L)} \times 100}{\text{Actividad total CK (U/L)}}$$

**LIMITACIONES:**

Si la absorbancia/min. es mayor que 0.345, diluya 1 muestra de la parte con 9 partes salina y vuelva a ensayar. Multiplique los resultados por 10. Los valores de CK para pacientes neonatales no se han establecido con este procedimiento.

**VALORES ESPERADOS:**

<24 U/L (37°C); La actividad de CK-MB se encuentra entre el 6 y el 25 % de la actividad total de CK.

Este rango debe servir sólo como una guía. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores esperados ya que existen diferencias entre los instrumentos, los laboratorios y las poblaciones locales.

**RENDIMIENTO:**

**COMPARACION:**

Un grupo de 90 sueros fueron ensayados por el método descrito de CK-MB y por un reactivo comercialmente disponible similar de CK-MB. La comparación de los resultados arrojó un coeficiente de correlación de 1,00 y la ecuación de regresión fue  $y = 1,00x + 2,08$ . Los estudios de comparación se realizaron de acuerdo con la Guía Tentativa de NCCLS, EP9-T

**PRECISIÓN:**

La precisión dentro de la ejecución se estableció mediante 20 ensayos en tres niveles diferentes de controles comerciales. Los valores totales de la precisión fueron obtenidos ensayando 3 controles comerciales por 5 días consecutivos.

Dentro de la Carrera	Suero			Precisión Total	Suero		
	Suero 1	Suero 2	Suero 3		Suero 1	Suero 2	Suero 3
Media CK-MB (U/L)	26.7	46.6	106	Media CK-MB (U/L)	28.2	52.7	109
Estandar de Desviación	0.70	0.85	1.03	Estandar de Desviación	1.05	1.66	2.32
CV (%)	2.6	1.8	1.0	CV (%)	3.7	3.2	2.1

Los estudios de precisión se realizaron de acuerdo con la Directriz Tentativa de NCCLS, EP5-T.

**LINEARIDAD:**

Lineal a 175 U/L a 37°C. Realizado de acuerdo con la Directriz EP6-P de NCCLS

**SENSIBILIDAD:**

Basado en una resolución del instrumento de A=0,001, el método presentado muestra una sensibilidad de 2,0 U/L.