QUIMIMB - CKMB

Imunoinibição

MS: 10159820194

ebram

Finalidade

Reação enzimática para determinação quantitativa de Creatinaquinase fração MB em amostras de soro e plasma humano. Somente para uso diagnóstico "in vitro".

Princípio do Teste

O anticorpo específico inibe as subunidades M da CK-MM (CK-3) e a única subunidade M da CK-MB (CK-2), o que permite a medição da subunidade B da CK-MB (supondo a ausência de CK-BB o CK- 1). A concentração catalítica de CK-B, que corresponde a metade da atividade do CK-MB, se determina utilizando reações acopladas a hexoquinase (HK) e glicose -6-fosfato desidrogenase (G6P-DH), a partir da velocidade de formação da NADPH, medido a 340nm.

Fosfato de creatina + ADP $\xrightarrow{\text{CK-B}}$ Creatina + ATP

ATP+Glicose $\xrightarrow{\text{Hexoquinase}}$ ADP + Glicose-6-Fosfato

Glicose-6-Fosfato+ NADP+ $\xrightarrow{\text{G-6-PDH}}$ Gliconato-6-fosfato + NADPH + H+

Metodologia

Imunoinibição

Significado Clínico

Tal como a CPK total, também a isoenzima CK-MB aumenta nas primeiras horas após o início do infarto. O pico da elevação da CK- MB pode ocorrer um pouco antes do pico da CPK total. A CK-MB pode manter-se elevada até o 3º dia e, eventualmente, até mais tempo. As determinações da CPK e CK-MB podem ajudar também a reconhecer mais precocemente o reinfarto ou para avaliar a dimensão do infarto.

No diagnóstico do infarto do miocárdio, não é só a dosagem da atividade da CK-MB que tem importância decisiva, mas também a porcentagem desta atividade dentro da atividade total da CPK. Normalmente a atividade da CK-MB está abaixo de 5 U/L e a porcentagem de CK-MB dentro do total de atividade da CPK está abaixo de 3%. Existe suspeita de infarto do miocárdio quando a CPK se eleva a mais de 160 U/L e a atividade de CK-MB ultrapassa 5% da atividade total da CPK no soro.

Reagentes

Reagente 1: Pronto para uso. Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: Anti-Humano CK-M capaz de inibir 2000L de CK-M, Imidazol 125mmol/L, EDTA 2 mmol/L, Acetado de magnésio 12,5 mmol/L, D- glucosa 25 mmol/L, N-acetilcisteína 25 mmol/L, hexoquinase 6800 U/L, NADP 2,4mmol/L.

Reagente 2: Pronto para uso. Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: Fosfato de creatina- 250 mmol/L, ADP- 15,2 mmol/L, AMP- 5mM, NADP- 2 mM, N- Acetilcistina- 20 mM, AMP 25 mmol/L,P5-di (adenosina-5´-) pentafosfato 103 umol/L, glicose-6-fosfato desidrogenase 8800 U/L.

Soro Controle: Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: soro controle preparado com base de soro humano e formado com isoenzimas CKMM e CKMB.

- Verificar a concentração no rótulo do frasco. O valor de CKMB é rastreável ao material de referência ERM-AD455/IFCC (IRMM). A rastreabilidade só pode ser garantida se forem utilizados reagentes da EBRAM e procedimentos de medição recomendados.

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de vencimento impressa no rótulo do produto. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Modo de Preparo. Reagente de Trabalho

Para alguns analisadores é necessário preparar o Reagente de Trabalho (verifique o protocolo do analisador): Preparar 4 partes do reagente 1 para 1 parte do reagente 2. Ex.: 4mL de R1 + 1mL de R2. O reagente após o preparo é estável até 30 dias quando armazenado a 2 - 8°C ao abrigo da luz.

Modo de Preparo. Soro Controle

1. Golpear o frasco levemente com os dedos para desprender o material liofilizado.
2. Utilizando uma pipeta volumétrica calibrada, adicionar exatamente 1,0 mL de água destilada no frasco.
3. Recolocar a tampa no frasco e deixar em repouso na temperatura ambiente por 30 min.
4. Antes de utilizar, inverta suavemente o frasco de 5 a 10 vezes até o liofilizado dissolver totalmente.

Após reconstituição, o controle possui estabilidade de 7 dias se armazenado entre 2 - 8°C e de 2 meses se armazenado à -20°C.

Precauções e cuidados requeridos

Este reagente deve ser usado somente para diagnóstico "in vitro". Não pipetar com a boca. Evitar contato com a pele e roupa. No caso de contato com os olhos, lavar com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

Deve-se monitorar a temperatura do ambiente de trabalho bem como o tempo de reação para obtenção de resultados corretos. Não usar se a absorbância do branco ultrapassar 0.400 quando medido em 340 nm (cuveta de 1cm), ou se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco.

Material necessário não fornecido

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorbância de 340 nm.
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Consumíveis do analisador quando usado.
4. Cronômetro.

Amostra

O CK-MB no soro é estável por 7 dias se mantido entre 2 - 8°C. As amostras de plasma devem ser coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA ou heparina. Todas as amostras e controles são considerados potencialmente infectantes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

Preparo do paciente

É recomendado um jejum de 4 horas. Todavia, poderá ser modificado segundo orientação médica.

Interferências

- Bilirrubina > 20 mg/dL, Lipemia > 1,25 g/L e hemoglobina > 2,5 g/L, as concentrações acima do normal de CK-BB ou de adelino quinase, e de macro-CK ou CK mitocondrial podem interferir no resultado.
- Algumas drogas e substâncias podem afetar a concentração do CK- MB, sugerimos consultar Young et al.

Parâmetros do Sistema:

Temperatura	37°C
Comprimento de Onda	340 nm
Tipo de Reação	Cinético
Direção	Crescente
Relação Amostra x Reativo	1:25
Vol. Amostra	40 µL
Vol. Reagente	1,0 mL (800µL R1 + 200µL R2)
Tempo de Incubação	5 minutos (retardo)
Intervalo de leitura	1 minuto
Número de Intervalos	2-3

Calibração

A calibração deste ensaio é efetuada através de fatoração, obtida através da absorção média milimolar do NADH a 340 nm (6.22) sob condições específicas. Os resultados das amostras estão baseadas na variação de absorbância por minuto, portanto todos os parâmetros devem ser conhecidos e controlados.

Procedimento Automatizado

Aplicação no sistema automatizado: vide manual para utilização do equipamento e instruções de uso do reagente.

Aplicação no sistema semi-automático: Em um tubo de ensaio acrescentar 1,00mL do reagente de trabalho, adicionar 40 µL de amostra/soro controle. Ler imediatamente no equipamento, preparar também um tubo contendo pelo menos 0,5 mL do reagente de trabalho (os equipamentos no início do procedimento, solicitam que seja introduzido o reagente para verificação da absorbância do reagente), seguir protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema. Pode-se utilizar o fator de calibração enunciado para o procedimento manual, pequenos ajustes podem ser necessários.

Procedimento Manual

1. Preparar o Reagente de Trabalho: Misturar os reagentes na proporção: 1 parte do Reagente 2 + 4 partes do Reagente 1 (4mL R1 + 1mL R2). Reagente assim preparado permanece estável por 15 dias a 2 - 8°C.
2. Colocar 1,00mL do reagente de trabalho no tubo referente ao soro controle.
3. Zerar o espectrofotômetro a 340 nm com água destilada.
4. Cuidadosamente, adicionar 40µL do soro controle/amostra no tubo correspondente, homogeneizar e deixar em BM a 37°C. Acionar o cronômetro.
5. Registrar as absorbâncias A1, A2, A3, quando completar 5, 6 e 7 minutos respectivamente.
6. Determinar a média das diferenças de absorbância (Δ Abs/min). Proceder em seguida do mesmo modo com todas as amostras.

Nota: Realizar a incubação das amostras e soro controle individualmente.

Obs.: Procedimento sugerido para espectrofotômetros que requerem volume mínimo de 1,0 mL e podem ser ajustados proporcionalmente sem influência no desempenho do teste. Salientamos que volumes de amostra menores do que 10 µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

Cálculos

$$\text{Média } \Delta \text{ Abs/min} = \frac{(A2-A1) + (A3-A2)}{2}$$

CKMB Amostra U/L = Média Δ Abs/min x Fator Fator = 8360

Exemplo:

A1 = 0,006 / A2 = 0,008 / A3 = 0,010

Fator = 8360

$$\text{Média } \Delta \text{ Abs/min} = = \frac{(0{,}008 - 0{,}006) + (0{,}010 - 0{,}008)}{2}$$

Média Δ Abs/min = 0,002

CKMB Amostra = Média Δ Abs/min x 8360
CKMB Amostra = 0,002 x 8360
CKMB Amostra = 17 U/L
Obs: nkat/L= U/L x 16,67

Linearidade
Quando executado de acordo com o recomendado, o teste é linear até 600 U/L. Amostras com valores superiores a 600 U/L devem ser diluídas com água destilada a ponto de ficarem entre 5,5 - 600 U/L e os resultados devem ser multiplicados pelo fator de diluição.

Controle de Qualidade
Cada laboratório deve manter um programa interno de qualidade que defina objetivos, procedimentos, normas, limites de tolerância e ações corretivas. Deve-se manter também um sistema definido para se monitorar a variação analítica do sistema de medição. Aconselhamos o uso do soro controle CKMB que acompanha o KIT.

Valores Esperados
0 - 25 U/L, baseados nas medições desempenhadas a 37°C. Entretanto é preferível empregar o limite do índice de CK-MB de 6% da concentração do CK total.

Estes valores são dados unicamente como título orientativo. É recomendado que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

Estudos Comparativos
Estudos executados entre este procedimento e uma metodologia similar produziram os seguintes resultados:

Número de amostras	45
Intevalo dos resultados	20 - 105 (U/L)
Coeficiente de Correlação	0.999
Inclinação	0.98
Intercepta	0.932 (U/L)

Precisão
Estudos de precisão foram executados com dois níveis sendo que cada amostra fora processada por 20 vezes e os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=20	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	45	129
C.V. (%)	2,8	2,3

Exatidão
Estudos de precisão foram executados com dois níveis sendo que cada amostra fora processada por 25 vezes e os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=25	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	45	129
C.V. (%)	3,5	3,2

Sensibilidade Metodológica
5,5 U/L

Especificidade
Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Observações
A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥1 mega ohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos < 0,1 mg/L (água tipo II). Para o enxágüe da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade ≥ 0,1 megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágüe final utilizar água tipo II.
As concentrações descrita no rótulo do soro controle deve ser utilizada como referência inicial. O laboratório deve determinar a média e o intervalo de concentração utilizando seu sistema analítico, uma vez que podem ser encontradas diferenças decorrentes dos instrumentos e das imprecisões dos procedimentos de medição.
O valor médio e o intervalo de concentração encontrado pelo laboratório pode ser utilizado para controle interno da qualidade do ensaio. Como limite máximo de controle, recomendamos utilizar o valor da média ± 2 ou 3 vezes o desvio padrão obtido no laboratório. Alternativamente, pode-se utilizar as especificações desejáveis para imprecisão derivadas da variação biológica.

Apresentação
Linha Bioquímica Geral:R1= 4x10mL + R2= 2x5mL + S.C=1x1,0mL
Linha Bulk: R1= 1x100mL + R2= 1x25mL + S.C=1x1,0mL

Referência Bibliográfica
Tietz Textbook of Clinic Chemistry, 3rd edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co., 1999.
Young, D.S., Effect of Drugs on Clinical Laboratiry Tests. Third Edition. AACC press Washington, D.C. (1997).
Arquivos da EBRAM.

Revisão: Março de 2024.

Símbolos universais utilizados em embalagens de diagnóstico in vitro

	Consultar instruções de uso	R	Reagente		Fabricado por
Σ	O conteúdo é suficiente para <n> testes		Data de validade (útimo dia do mês)	LOT	Número do lote
	Limite de temperatura (conservar a)	IVD	Produto para diagnóstico *in vitro*	REF	Número do catálogo

Ebram Produtos Laboratoriais Ltda.
Rua Julio de Castilhos, 500 - Belenzinho - São Paulo - SP
Tel.: +55 11 2291 2811 - CEP 03059-001 - Indústria Brasileira
CNPJ.: 50.657.402/0001-31

Responsável Técnica
Dra. Nadjara Novaes Longen - CRF-SP - 37.451

SAC Ebram
Para mais informações, entrar em contato
com o SAC 0800 500 2424 ou 11 2574 7110
sac@ebram.com | ebram.com.br