

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMINAC - CKNAC	Página 1 de 4 POP BIOxxx/xx
-------------------------------	---	--------------------------------

USO

Reação enzimática para determinação quantitativa de Creatina Quinase em amostras de soro e plasma humanos. Somente para uso diagnóstico "in vitro".

PRINCÍPIO

A Creatina Quinase (CK) catalisa a fosforilação do ADP (adenosina difosfato) pelo fosfato de creatina, obtendo-se creatina e ATP (adenosina trifosfato). A concentração catalítica se determina, empregando as reações de hexoquinase (HK) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), a partir da velocidade de formação do NADPH, medido a 340nm. Temos então a seguinte reação:

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

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

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

METODOLOGIA

UV

SIGNIFICADO CLÍNICO

No infarto do miocárdio, a CPK começa a elevar-se de 4 a 6 horas após o início do episódio agudo, alcança seu máximo em geral após 36 horas e volta a normalidade em dois a quatro dias. O que torna esta enzima extremamente útil no diagnóstico do infarto é a precocidade de sua elevação.

A atividade também se encontra elevada em todos os tipos de distrofia muscular, observando-se os mais elevados teores do tipo Duchenne, no qual podem encontrar-se níveis até 50 vezes maiores do que o limite superior normal. Os títulos são mais elevados em lactentes e crianças, baixando com a idade. Cerca de 80% das mulheres assintomáticas portadoras mostram elevação moderada dos valores de CPK no soro. Uma injeção intramuscular (de qualquer medicamento) pode ocasionar liberação de CPK muscular para o plasma e aumento de seu teor sérico. Daí a necessidade de identificação das isoenzimas de CPK, de modo a afastar a possibilidade de superposição de CPK de origem muscular e CPK cardíaca.

Exercícios extenuantes ou atividade física podem produzir elevados níveis de CPK no soro.

PRODUTO UTILIZADO

QUIMINAC – CKNAC MS: 10159820161

Fabricante: Ebram Produtos Laboratoriais Ltda.

Rua Julio de Castilhos, 500.

Belenzinho – São Paulo – SP – Brasil - CEP: 03059-001

Para maiores informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM:

Tel. (011) 2291-2811 ou sac@ebram.com

REAGENTES

Reagente 1: Pronto para uso. Conservar entre 2 - 8 °C. Contem: Imidazole- 100mM

Reagente 2: Pronto para uso. Conservar entre 2 - 8 °C. Contem: Fosfato de creatina- 30 mM, ADP- 2 mM, AMP- 5mM, NADP- 2mM, N- Acetilcisteína- 20 mM, hexoquinase- 2500 U/L, G-6-PDH-1500 U/L, Glicose- 20 mM, acetato de magnésio 10 mM e EDTA Na2- 2 mM, di adenosina-5 pentafofato 10 uM.

Os reagentes não abertos são estáveis ate a data de vencimento impressa no rotulo do produto, e e on board (em um compartimento refrigerado do analisador) possuem estabilidade de aproximadamente 30 dias. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMINAC - CKNAC	Página 2 de 4 POP BIOxxx/xx
-------------------------------	---	--------------------------------

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 15 dias quando armazenado a 2 – 8°C ao abrigo da luz.

PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS

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 0.300 quando medido em 340 nm (cuveta de 1cm), ou se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco.

AMOSTRA

Soro ou plasma (colhido com heparina ou EDTA). O CPK no soro é estável por 7 dias se mantido entre 2 – 8°C. Todas as amostras e controles são considerados potencialmente infectantes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

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. Água destilada/deionizada.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. Soros Controle e Calibrador.
6. Medidor de tempo.

PROCEDIMENTO

• Procedimento automático:

Aplicação no sistema automatizado: vide manual para utilização do equipamento e instruções de uso do reagente. Aplicação no sistema semiautomático: proceder como demonstrado a seguir no procedimento manual somente até o item 2 (preparação dos tubos), em seguida utilizar o equipamento para leitura, seguindo protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema.

Nota: Adicionar as amostras no tubo somente no momento que antecede a aspiração do equipamento.

• 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).
2. Separar 3 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

	Branco	Calibrador	Amostra/S.C.
Água destilada	50µL	-	-
Calibrador	-	50µL	-
Amostra/S.C.	-	-	50µL
Reagente de trabalho	1.0mL	1.0mL	1.0mL

3. Adicionar 1,0mL do reagente de trabalho em dois tubos e deixe em banho-maria (BM) a 37°C. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio.
4. Adicionar 50µL do calibrador e 50µL de água destilada em cada tubo.
5. Aguardar de 3 minutos.
6. Zerar o espectrofotômetro a 340nm com o tubo do branco.

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMINAC - CKNAC	Página 3 de 4 POP BIOxxx/xx
-------------------------------	---	--------------------------------

7. Inserir no equipamento o tubo com o calibrador e registrar as absorvâncias A1, A2, A3, considerando A1 a primeira leitura (logo apos os 3 minutos de retardo) e as seguintes com 1 minuto de intervalo.
8. Determinar as duas diferenças de absorvância/min (Δ Abs/min), subtraindo cada leitura de sua anterior.
9. Determinar a media das diferenças de absorvância (Δ Abs/min).
10. Proceder em seguida do mesmo modo com os controles e todas as amostras.

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

CÁLCULOS

(Abs. = Absorvância)

(Conc. = Concentração)

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

$$\text{CKNAC da } \Delta \text{ Abs /min (amostra) Conc. Do} \\ \text{Amostra (U/L)} = \frac{\text{-----}}{\Delta \text{ Abs /min (Calib)}} \times \text{Calib (U/L)}$$

RESULTADOS

Os seguintes valores são baseados nas medições desempenhadas a 37°C.

Masculino: 38 a 174 U/L

Feminino: 26 a 140 U/L

Recém-nascidos: 2 a 3 vezes os valores dos adultos.

Estes valores são dados unicamente como titulo orientativo. É recomendado que cada laboratorio estabeleça seu próprio intervalo de referencia.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- **Linearidade / Sensibilidade**

Quando executado de acordo com o recomendado, o teste e linear ate 1300 U/L. Amostras com valores superiores a 1300 U/L devem ser diluídas com solução salina a ponto de ficarem entre 9.2 – 1300 U/L e os resultados devem ser multiplicados pelo fator de diluição.

Sensibilidade: 9.2 U/L

- **Interferências:**

Bilirrubina ate 20 mg/dL e hemoglobina ate 10 g/L nao interferem significativamente no resultado. Lipemia (triglicérides) > 5 g/L interfe no resultado. Algumas drogas e substancias afetam a concentração do CPK, sugerimos consultar Young et al.

OBSERVAÇÕES

1. A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A agua utilizada no laboratorio 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 (agua tipo II). Para o enxague da vidraria a agua pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ mega ohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxague final utilizar água tipo II.

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMINAC - CKNAC	Página 4 de 4 POP BIOxxx/xx
-------------------------------	---	--------------------------------

REFERÊNCIAS

1. Szasz. G. et al. Clin. Chem.. 22, 650 (1976)
2. McComb, R.B. et al. Clin. Chem. 22:141 (1976)
3. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 39:1 (1979)
4. Tietz, N.W. Fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia, W.B. Saunders Co.pp. 682:689 (1982)
5. Young, D.S. Effects of drug on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
6. IFCC reference procedures for measurement of catalytic concentrations of enzymes: corrigendum notes and useful advice. Clin Chem Lab med 2010; 48: 615-621
7. Arquivos da EBRAM

	Nome	Assinatura	Data
Elaborado por			
Aprovado por			
Revisado por			
Desativado por			
Razão			

VER Set/20