



QUIMINAC - CKNAC

Método UV

REG. MS: 10159820161

EGRAM 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

Para mais informações, entrar em contato com o **SAC EBRAM**

0800 500 2424 ou 11 2574 7110

sac@ebram.com | www.ebram.com

FINALIDADE. 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 340 nm. Temos então a seguinte reação:



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 Duschenne, no qual podem encontrar-se níveis até 50 vezes maiores do que o limite superior normal. Os títulos são mais elevados em lactantes e crianças, diminuindo 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.

REAGENTES.

Reagente 1: Pronto para uso. Conservar entre 2 a 8 °C. Contém:

Imidazole- 100mM

Reagente 2: Pronto para uso. Conservar entre 2 a 8 °C. Contém:

Fosfato de creatina- 30 mM, ADP- 2 mM, AMP- 5mM, NADP- 2 mM, N- Acetilcisteina- 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 pentafosfato 10 uM.

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de vencimento impressa no rótulo 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.

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 a 8°C ao abrigo da luz.

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 0.300 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. Água destilada/deionizada.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. Soro Controle e Calibrador.
6. Cronômetro.

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.

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

Exercícios pesados ou atividades físicas podem produzir níveis elevados de CK no soro.

INTERFERÊNCIAS.

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

PARÂMETROS DO SISTEMA:

Temperatura	37°C
Comprimento de Onda	340 nm
Tipo de Reação	Cinética
Direção	Crescente
Relação Amostra x Reativo	1:20
Vol. Amostra	50 µL
Vol. Reagente	1,0 mL (800µL R1 + 200µL R2)
Tempo de Incubação	3 minutos (retardo)
Intervalo de leitura	1 minuto
Número de intervalos	2

CALIBRAÇÃO. Utilizar Quimicalib Ebram cód.7023/12023 que possui a concentração rastreável ao método de referência proposto pelo CLSI, ou realizar a calibração através de fatoração, obtida através da absorção média milimolar do NADH a 340 nm (6.30) sob condições específicas.

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

Aplicação no sistema semi-automático: 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.

- Preparar o Reagente de Trabalho: Misturar os reagentes na proporção: 1 parte do Reagente 2 + 4 partes do Reagente 1 (4mL R1 + 1mL R2).
 - Separar 3 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:
- | | 1. Branco | 2. Calibrador | 3. Amostra/S.C. |
|----------------|-----------|---------------|-----------------|
| Água destilada | 50µL | - | - |
| Calibrador | - | 50µL | - |
| Amostra | - | - | 50µL |
| Reagente | 1,0 mL | 1,0 mL | 1,0 mL |

- Adicionar 1,0 mL 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.
- Adicionar 50µL do calibrador e 50µL de água destilada em cada tubo.
- Aguardar 3 minutos
- Zerar o espectrofotômetro a 340nm com o tubo do branco.
- Inserir no equipamento o tubo com o calibrador e registrar as absorbâncias A1, A2, A3, considerando A1 a primeira leitura (logo após os 3 minutos de retardo) e as seguintes com 1 minuto de intervalo.
- Determinar as duas diferenças de absorbância/min ($\Delta \text{Abs}/\text{min}$), subtraindo cada leitura de sua anterior.
- Determinar a média das diferenças de absorbância ($\Delta \text{Abs}/\text{min}$). Proceder em seguida do mesmo modo com os controles e todas as amostras.

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.

(Abs.= Absorbância) (Conc. = Concentração)

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

$$\text{CKNAC da amostra (U/L)} = \frac{\Delta \text{Abs.}/\text{min. Amostra}}{\Delta \text{Abs.}/\text{min Calibrador}} \times \text{Conc. do calibrador (U/L)}$$

EXEMPLO:

Absorbância com o Calibrador

$$A1=0,028 / A2=0,060 / A3=0,104$$

$$\text{Média } \Delta \text{Abs}/\text{min} = \frac{(0,060 - 0,028) + (0,104 - 0,060)}{2}$$

$$\text{Média } \Delta \text{Abs}/\text{min (calib)} = 0,038$$

$$\text{Média } \Delta \text{Abs}/\text{min (amostra)} = 0,034 \text{ (calc. I dem acima)}$$

$$\text{Concentração do Calibrador} = 347 \text{ U/L}$$

$$\text{CKNAC Amostra} = (0,034 / 0,038) 347$$

$$\text{CK-NAC Amostra} = 310 \text{ U/L}$$

Obs: nkat/L= U/L x 16,67

LINEARIDADE. Quando executado de acordo com o recomendado, o teste é linear até 2000 U/L. Amostras com valores superiores a 2000 U/L devem ser diluídas com solução salina a ponto de ficarem entre 8,9 - 2000 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 dos soros controle Quimicontrol Normal e Quimicontrol Anormal Ebram Cód. 7024/12024 e 7031/12031.

VALORES ESPERADOS.

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

Masculinos: 38 a 174 U/L

Femininos: 26 a 140 U/L

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

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	48
Intervalo dos resultados	15 - 501 (U/L)
Coeficiente de Correlação	0,993
Inclinação	1,0027
Intercepta	0,8 (U/L)

PRECISÃO. Estudos de precisão foram executados com três níveis (baixo, normal e patológico) sendo que cada amostra fora processada por 40 vezes e os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=20	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Média (mg/dL)	101,0	564,1	960,6
D.P. (mg/dL)	1,0	1,8	2,4
C.V. (%)	1,1	0,3	0,2

EXATIDÃO. As amostras foram processadas por 10 dias consecutivos, uma vez por dia e em quadruplicata. Os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=40	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Média (mg/dL)	101,0	564,1	960,6
D.P. (mg/dL)	1,8	9,2	18,9
C.V. (%)	1,7	1,6	2,0

SENSIBILIDADE METODOLÓGICA. 8,9 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 limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- 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 silícios $< 0,1 \text{ mg/L}$ (água tipo II). Para o enxágüe da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágüe final utilizar água tipo II.

APRESENTAÇÃO.

Linha Bioquímica Geral: R1= 4 x 10mL + R2= 2 x 5mL

Linha Bulk: R1= 1 x 200mL + R2= 1 x 50mL

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

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

SÍMBOLOS UNIVERSAIS UTILIZADOS EM EMBALAGENS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		REAGENTE		FABRICADO POR
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTES		DATA DE VALIDADE (ÚLTIMO DIA DO MÊS)		NÚMERO DO LOTE
	LIMITE DE TEMPERATURA (CONSERVAR A)		PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		NÚMERO DO CATÁLOGO