

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIMB - CKMB	Página 1 de 4 POPBIOxxx/xx
-------------------------------	---	-------------------------------

USO

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

PRINCÍPIO

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 ou 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.

CK-B

Fosfato de creatina + ADP -----> Creatina + ATP

Hexoquinase

ATP+Glicose -----> ADP + Glicose-6-Fosfato

G-6-PDH

Glicose-6-Fosfato+ NADP⁺ -----> 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 inicio do infarto. O pico da elevação da CKMB 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 reinfarco 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.

PRODUTO UTILIZADO

Quimi MB – CKMB MS: 10159820194

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: Anti-Humano CK-M capaz de inibir 2000U de CK-M, Imidazol 125mmol/L, EDTA 2 mmol/L, Acetado de magnesio 12,5 mmol/L, Dglucosa 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. Contem: 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. Contem: soro controle preparado com base de soro humano e formado com isoenzimas CKMM e CKMB.

- Verificar a concentração no rotulo 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.

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIMB - CKMB	Página 2 de 4 POPBIOxxx/xx
-------------------------------	---	-------------------------------

Os reagentes não abertos são estáveis ate a data de vencimento impressa no rotulo 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 apos o preparo é estável ate 15 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 agua 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 ate o liofilizado dissolver totalmente.
- Apos reconstituição, o controle possui estabilidade de 7 dias se armazenado entre 2 – 8°C e de 2 meses se armazenado a -20°C.

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

AMOSTRA

O CK-MB 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.

Preparo do Paciente:

E recomendado um jejum de 4 horas. Todavia, poderá ser modificado segundo orientação medica.

MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorbância em 340nm.
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Agua destilada/deionizada.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. 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: Em um tubo de ensaio acrescentar 1,0mL do reagente de trabalho, adicionar 40µL de amostra/soro controle. Ler imediatamente no equipamento, preparar também um tubo contendo pelo menos 0,5mL do reagente de trabalho (os equipamentos no inicio 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.

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIMB - CKMB	Página 3 de 4 POPBIOxxx/xx
-------------------------------	---	-------------------------------

- **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 1,0mL do reagente de trabalho no tubo referente ao soro controle.
3. Zerar o espectrofotômetro a 340nm com agua destilada.
4. Cuidadosamente, adicionar 40µL do soro controle/amostra no tubo correspondente, homogeneizar e deixar em BM a 37°C. Acionar o cronometro.
5. Registrar as absorbâncias A1, A2, A3, quando completar 5, 6 e 7 minutos respectivamente.
6. Determinar a media 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 1,0mL e podem ser ajustados proporcionalmente sem influencia no desempenho do teste.

Salientamos que volumes de amostras menores do que 10µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

CÁLCULOS

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

$$\text{CKMB Amostra U/L} = \text{Media } \Delta \text{ Abs/min} \times \text{Fator}$$

Fator = 8360

RESULTADOS

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 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 é linear ate 1000 U/L. Amostras com valores superiores a 1000 U/L devem ser diluídas com agua destilada a ponto de ficarem entre 3 – 1000 U/L e os resultados devem ser multiplicados pelo fator de diluição.

Sensibilidade: 3,0 U/L

- **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 adelinoquinase, e de macro-CK ou CK mitocondrial podem interferir no resultado.

Algumas drogas e substancias podem afetar a concentração do CKMB, 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

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIMB - CKMB	Página 4 de 4 POPBIOxxx/xx
-------------------------------	---	-------------------------------

III, com resistividade \geq 0,1 mega ohms ou condutividade \leq 10 microsiemens. No enxague final utilizar água tipo II.

REFERÊNCIAS

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

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

VER Set/20