

## Utilização prevista

Para a determinação quantitativa de creatina quinase-MB no soro em procedimentos manuais e/ou automatizados. **Rx Only.**

## Resumo e princípio

A creatina quinase consiste em moléculas diméricas compostas pelas subunidades M e B e existem como isoenzimas MM, MB e BB.<sup>1</sup> As subunidades M e B são distintas em termos imunológicos. A CK-MM e CK-MB estão distribuídas principalmente pelos músculos esqueléticos e músculo cardíaco, respetivamente, enquanto a CK-BB está presente principalmente no cérebro e em tecidos compostos por músculos lisos.<sup>2</sup> No seguimento de um enfarte agudo do miocárdio, a atividade da CK-MB aumenta significativamente e esta elevação é altamente específica para o diagnóstico de enfarte do miocárdio por parte do laboratório.<sup>3,4</sup> Embora a atividade da CK total geralmente aumente após um enfarte do miocárdio, em alguns pacientes apenas aumenta a atividade da CK-MB, enquanto a CK total permanece no intervalo normal.<sup>5</sup>

Este método é um teste UV otimizado de acordo com a Sociedade Alemã de Química Clínica (DGKC) e a Federação Internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial (IFCC).

Neste procedimento, a atividade da CK é medida na presença de um anticorpo do monómero CK-M. O anticorpo inibe totalmente a atividade da CK-MM e metade da atividade da CK-MB, sem afetar a atividade da subunidade B da CK-MB e CK-BB. Devido a concentrações mínimas de CK-BB na circulação, a atividade restante, multiplicada por um fator de 2, representa a atividade da isoenzima CK-MB.

## Reagentes

### CK-MB (Reagente R1)

Composição:

Glicose	20,0 mmol/L
Acetato de magnésio	10,0 mmol/L
EDTA	2,0 mmol/L
Hexoquinase	5,0 kU/L
LDH	1,5 kU/L
NAC	20,0 mmol/L
NADP	2,0 mmol/L
Tampão imidazol	50,0 mmol/L
Anticorpos monoclonais (rato) contra CK-M humana, capacidade de inibição	> 2000 U/L

### CK-MB (Reagente R2)

Composição:

ADP	10,0 mmol/L
AMP	20,0 mmol/L
Diadenosina pentafosfato	50,0 µmol/L
Fosfato de creatina	150,0 mmol/L
G6P-DH	20 kU/L
Tampão imidazol	50,0 mmol/L

## Precauções:

Para utilização em diagnóstico *in vitro*

Devem ser seguidas as precauções normais de manuseamento de reagentes de laboratório. Não utilize a pipeta com a boca. Os reagentes contêm azida de sódio, que pode ser tóxica se for ingerida. A azida de sódio também pode reagir com canalização de chumbo e cobre, formando azidas de metal altamente explosivas. Consulte a Ficha de Dados de Segurança do Material para obter informações atualizadas sobre riscos, perigos e segurança. Elimine os reagentes usados ou fora do prazo de validade de acordo com os requisitos governamentais e do seu laboratório.

**Preparação dos reagentes:** Os reagentes líquidos R1 e R2 são fornecidos prontos a utilizar em analisadores capazes de dispensar 2 reagentes separados. No caso de analisadores sem capacidade de dispensar 2 reagentes ou para utilização manual, prepare um reagente de trabalho na proporção de 4 partes de Reagente R1 para 1 parte de Reagente R2 (isto é, 24 mL de reagente R1 e 6 mL de reagente R2).

**Armazenamento e estabilidade dos reagentes:** Os reagentes mantêm-se estáveis até à data de validade indicada nos respetivos rótulos, quando devidamente armazenados a 2-8°C e protegidos da luz. Ambos os Reagentes R1 e R2 devem ser transparentes/incolores. Elimine se qualquer um dos reagentes estiver turvo ou contiver matéria particulada. Uma vez preparado e protegido da luz, o reagente de trabalho mantém-se estável durante 2 semanas a 2-8°C ou 24 horas a 15-30°C.

## Colheita e armazenamento de amostras

Todas as amostras utilizadas neste teste devem ser consideradas potencialmente infecciosas. Devem ser aplicadas as precauções universais, relativas às suas instalações, no manuseamento e eliminação dos materiais durante e depois de efetuar o teste. O soro não hemolisado transparente é a amostra preferível. Não são necessários aditivos ou conservantes especiais. Sempre que possível, as amostras devem ser separadas e analisadas no dia da colheita. Armazene o soro em tubos fechados. A atividade da CK-MB no soro mantém-se estável durante 4 semanas, quando armazenada num local escuro a -20°C. O armazenamento a outras temperaturas resultará em perda de atividade; após 24 horas a 2-8°C, < 10%; após uma hora a 15-30°C, < 10%. As amostras extremamente hemolisadas não são adequadas para este teste, pois podem conter níveis elevados de adenilato quinase, ATP e glicose-6-fosfato, que interferem no ensaio e produzem resultados falsos.

## Substâncias interferentes

O ácido ascórbico até 30 mg/dL, níveis de bilirrubina conjugada de até 24 mg/dL, níveis de bilirrubina não conjugada de até 30 mg/dL e níveis de triglicéridos de até 1000 mg/dL não demonstram interferência neste teste. A hemoglobina interfere, mesmo em concentrações mínimas (25 mg/dL).<sup>8</sup> Young et al<sup>6</sup> analisaram os efeitos dos medicamentos nos níveis séricos de CK-MB. O procedimento descrito pode sobrestimar os valores de CK-MB se a atividade da CK-BB no soro for muito elevada. No entanto, a atividade da CK-BB está geralmente ausente nos soros de indivíduos normais e pacientes com enfarte do miocárdio.<sup>9</sup> Alguns investigadores observaram uma forma macroscópica de BB (imunoglobulina complexada), que pode ser medida como B neste ensaio.<sup>10,11,12</sup> A presença de BB macroscópica deve ser suspeita se a atividade da CK-B medida por este procedimento representar mais de 20% da atividade da CK total.

## Materiais fornecidos

Reagentes R1 e R2 de CK-MB

## Material necessário, mas não fornecido

Espectrofotómetro com capacidade de leitura da absorvância a 340 nm e trajeto de luz de 1 cm, bloco ou cuba com temperatura constante, 37°C, ou cubete com temperatura controlada, dispositivos de pipetagem precisos, tubos de ensaio, temporizador de intervalos

## Procedimento automatizado

Estão disponíveis aplicações para analisadores automatizados mediante o contacto com o Departamento de Assistência Técnica da HORIBA Instruments Inc.

## Procedimento manual

1. Deixe que os reagentes e as amostras atinjam a temperatura ambiente antes de os utilizar.
2. Prepare o Reagente de Trabalho de CK-MB de acordo com as instruções (consulte a secção Preparação do reagente).
3. Reponha o espectrofotómetro a zero a 340 nm com água destilada.
4. Para cada amostra e controlo, adicione 1,0 mL de Reagente de Trabalho à cubete ou tubo de ensaio e incube a 37°C durante 4 minutos.
5. Adicione 40 µL de soro ao respetivo tubo e misture com cuidado.
6. Leia e registre a absorvância aos 5 minutos. Continue a incubar a 37°C e registre novamente a absorvância aos 6, 7, 8 e 9 minutos. A taxa deve ser constante.
7. Determine a absorvância média por minuto (IA/min), multiplique pelo fator 8360 (4180 x 2) para obter resultados em U/L.

**NOTA:** Se a cubete não tiver controlo de temperatura, incube as amostras a 37°C entre leituras.

## Calibração

Não é necessária calibração. Se a calibração for exigida pelo fabricante do instrumento, siga as diretrizes de calibração para calibrar o analisador.

## Controlo da qualidade

A HORIBA Medical recomenda utilizar controlos disponíveis comercialmente com valores de CK-MB avaliados por este método para verificar o rigor e a precisão. Os controlos que contêm frações de CK-MB não humana não são adequados para utilização com este teste devido ao anticorpo monoclonal utilizado no reagente. Utilize controlos que contenham exclusivamente CK-MB humana. A atividade da CK-MB determinada nestes materiais por este procedimento deve situar-se dentro dos intervalos dos controlos. Dois níveis (Normal/Anormal) de controlos devem ser analisados em cada dia de teste.

# Conjunto de Reagentes de Creatina Quinase – MB (CK – MB) Pointe

## Resultados

Atividade de CK-B: Os valores são calculados com base no coeficiente de extinção micromolar da capacidade de absorção do NADP a 340 nm (0,00622). Uma unidade por litro (U/L) de atividade da CK-B é a quantidade de enzimas que oxida um  $\mu\text{mol/L}$  de NADP por minuto.

$$\text{Atividade da CK-B U/L} = \frac{\Delta A/\text{Min} \times \text{Volume total (mL)}}{\text{Capacidade de absorção do volume de amostra (mL)}}$$

$$\text{Atividade da CK-B U/L} = \frac{\Delta A/\text{Min}}{0,00622} \times \frac{1,040}{0,040}$$

$$\text{Atividade da CK-B U/L} = \frac{\Delta A/\text{Min}}{0,00622} \times 4180$$

$$\text{Atividade da CK-MB (U/L)} = \text{Atividade de CK-B (U/L)} \times 2$$

$$\% \text{ de atividade da CK-MB} = \frac{\text{Atividade de CK-MB (U/L)} \times 100}{\text{Atividade de CK total (U/L)}}$$

## Limitações

Se a  $\Delta A/\text{min}$ . for superior a 0,345, dilua 1 parte da amostra com 9 partes de solução salina e submeta novamente a ensaio. Multiplique os resultados por 10. Os valores de CK de pacientes neonatais não foram estabelecidos com este procedimento.

## Valores esperados<sup>7</sup>

<24 U/L (37°C); a atividade da CK-MB situa-se entre 6 e 25% da atividade de CK total.

Este intervalo deve servir apenas para orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo de valores esperados, dado que existem diferenças entre instrumentos, laboratórios e populações locais.

## Característica de desempenho<sup>8</sup>

**Comparação:** Um grupo de 90 soros foi analisado com o método de CK-MB descrito e com um reagente de CK-MB disponível comercialmente semelhante. A comparação dos resultados produziu um coeficiente de correlação de 1,00 e a equação de regressão foi de  $y = 1,00x + 2,08$ . Foram realizados estudos de comparação de acordo com a Diretriz Provisória do NCCLS, EP9-T.

**Precisão:** A precisão na mesma determinação foi estabelecida por 20 ensaios em três níveis diferentes de controlos comerciais. Os valores de precisão total foram obtidos analisando 3 controlos comerciais durante 5 dias consecutivos.

	Na mesma determinação		
	Soro 1	Soro 2	Soro 3
CK-MB média (U/L)	26,7	46,6	106
Desvio padrão	0,70	0,85	1,03
CV (%)	2,6	1,8	1,0
	Precisão total		
	Soro 1	Soro 2	Soro 3
CK-MB média (U/L)	28,2	52,7	109
Desvio padrão	1,05	1,66	2,32
CV (%)	3,7	3,2	2,1

Foram realizados estudos de precisão de acordo com a Diretriz Provisória do NCCLS, EP5-T.










**Linearidade:** Linear a 175 U/L a 37°C. Realizado de acordo com a Diretriz NCCLS EP6-P.





**Sensibilidade:** Com base numa resolução do instrumento de  $A=0,001$ , o método apresentado demonstra uma sensibilidade de 2,0 U/L.




## Bibliografia

1. Dawson, DM et al., Biochem Biophys. Res. Comm 21: 346 (1965)
2. Neumeir, D: Tissue Specific Distribution of Creatine Kinase Isoenzyme, Lang, Editor, Springer Verlag, New York, 1981, 85-109
3. Wagner et al, Circulation 47 263 (1973)
4. Bais R., Crit. Rev. Clin. Lab Sci. 18 291 (1982)
5. D'Souza JP et al, Clin. Biochem. 11 204 (1978)
6. Young DS et al. Clin Chem 21 286D, 1975 (Special Edition)
7. Stein W. Strategie der klinisch-chemischen Diagnostik des frischen Myokardinfarkts. Med Welt 1985:36:572-7.
8. Dados laboratoriais do fabricante.
9. Kaehmar, J.F. and Moss, D.W.: Fundamentals of Clinical Chemistry. Tiertz N.W. ed. Saunders, W.B. Co., Philidelphia, 686 (1976).
10. Lott J.A., Clin. Lab Med. 6:547 (1986).
11. Ljungdahl I., Gerhardt W., "Creatine kinase isoenzyme variants in human serum." Clin Chem 24:832, (1978).
12. Urdal P, Landaas S: "Macro-creatine kinase BB in serum, and some data on its prevalence", Clin Chem 25:461, (1979).

## Legenda dos símbolos

 Utilizar até (AAAA-MM-DD)	 Lote e código
 Número de catálogo	 Fabricante
 Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	 Limite de temperatura
 Consulte as instruções de utilização	<b>Rx Only:</b> Utilização apenas mediante receita médica
 Marcação CE	 Representante autorizado na Comunidade Europeia

 C7563  Fabricado para a HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand  
5449 Research Drive Canton, MI 48188   2°C 

 Fabricado para a HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand 5449 Research Drive, Canton, MI 48188	
 Obelis s.a. Boulevard Général Wahis 53 1030 Brussels, BÉLGICA Tel.: (32)2.732.59.54, Fax:(32)2.732.60.03 e-mail: mail@obelis.net	

## Certificada para executar reagentes

Os reagentes Pointe são certificados para serem fabricados de acordo com parâmetros especificados. Qualquer produto de reagente Pointe que não cumpra as especificações até a data de validade indicada será regularizado imediatamente sem quaisquer custos.