

CREATINA QUINASA-MB CK-MB

Uso

CK-MB tiene por objeto medir la actividad de la isoenzima CK-MB en suero humano.

Introducción:

Quinasas de creatina son moléculas dimericas compuestas de subunidades M y B y existen como las isoenzimas MM, MB, y BB. Las subunidades M y B son inmunológicamente distintas: CK-MM y CK-MB se distribuyen principalmente en el músculo esquelético y el músculo del corazón, respectivamente. Mientras CK-BB está presente principalmente en el cerebro y en los tejidos compuestos de músculo suave.² Tras un infarto de miocardio agudo, la actividad de CK-MB aumenta significativamente y esta elevación es altamente específica para el diagnóstico de laboratorio de infarto de miocardio.^{3,4} Aunque la actividad de CK total aumenta por lo general después de un infarto de miocardio, en algunos pacientes aumenta únicamente la actividad de CK-MB, mientras que el CK total se mantiene en el rango normal.⁵

En los métodos convencionales, las isoenzimas de CK se cuantifican después de primero separar las tres especies por electroforesis, intercambio de columna de aniones, o intercambio de cromatografía de lotes de anión. Sin embargo, estos métodos consumen mucho tiempo. En los últimos tiempos, Würzburg et al. ha introducido un método de inmunoinhibición. Esta metodología constituye la base de nuestro reactivo de CK-MB.

Principio:

La muestra se incuba en el reactivo de CK-MB que incluye el anticuerpo anti-CK-M. La actividad del CK-B desinhibido se determina entonces utilizando la siguiente serie de reacciones:



CK-B cataliza la fosforilación reversible de ADP, en presencia de fosfato de creatina, para formar ATP y creatina. La enzima hexoquinasa auxiliar (HK) cataliza la fosforilación de la glucosa por el formato de ATP, para producir ADP y glucosa-6-fosfato (G-6-P) se oxida a 6-fosfogluconato con la producción concomitante de NADH. La tasa de formación de NADH, medida a 340 nm, es directamente proporcional a la actividad de CK-B en suero.

Composición del Reactivo:

- CK -MB reactivo:
Fosfato de Creatina 30 mM; Adenosina-5'-fosfato 2 mM; Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD) 2 mM; Hexoquinasa (levadura) ≥ 3.000 U/L; Deshidrogenasa de Glucosa-6-Fosfato (Bacteriana) ≥ 2000 U/L.
- CK -MB Diluyente:
Buffer 100 mM; Anticuerpo CK-M anti-humano (Cabra)-cantidad suficiente para inhibir hasta 1500 U/L de CK-MM a 37°C.

Advertencias y Precauciones:

- Para el diagnóstico in vitro.
- Tome las precauciones usuales para el manejo de todos los reactivos de laboratorio. Pipeteo con la boca no se recomienda para reactivos de laboratorio.

Preparación de los Reactivos:

Reconstituir cada vial de reactivo CK-MB con el volumen de diluyente de CK-MB especificado en la etiqueta del vial. Agite para disolver.

Almacenamiento y Estabilidad:

El reactivo sin reconstituir y el diluyente deben almacenarse a 2-8°C. Los reactivos son estables hasta la fecha de

caducidad. El reactivo reconstituido es estable durante al menos 7 días en nevera (2-8°C) y 24 horas a temperatura ambiente (15-30°C).

Recogida de Muestras:

El suero es la muestra de elección para este ensayo. Evite la exposición de las muestras a luz intensa. Almacene las muestras en nevera (2-8°C), pero no más de una semana. La congelación de las muestras (-20°C) se traduce en una pérdida mínima de actividad.

Sustancias que Pueden Interferir:

Muestras hemolizadas extremadamente no son adecuadas para la prueba, ya que pueden contener altos niveles de adenilato quinasa, ATP y glucosa-6-fosfato, que interfieren con el ensayo produciendo resultados falsos. Drogas y otras sustancias que pueden interferir con la determinación de la actividad de la creatina quinasa, han sido enumeradas por Young et al.¹⁰ El procedimiento descrito puede sobreestimar los valores de CK-MB si la actividad de CK-BB en el suero es muy alta. Sin embargo, la actividad de CK-BB está generalmente ausente en suero de individuos normales y de pacientes con infarto del miocardio.¹¹ Algunos investigadores han observado una forma de BB macro (complejo de inmunoglobulina), que se puede medir como B en el ensayo.^{11, 13, 14} La presencia de BB macro en la muestra se debe sospechar si la actividad de CK-B medida por este procedimiento representa más de 20% de la actividad total de CK.

Materiales necesarios, pero no suministrados

- De muestra y reactivo de pipetas.
- Tubos de ensayo o cubetas.
- Cronómetro.
- Celda de flujo termorregulada.
- Espectrofotómetro.
- Suero de control.

Procedimiento Automatizado:

Consulte nuestras instrucciones de aplicación de instrumentos adecuados. **Nota:** Algunos instrumentos requieren diferentes volúmenes de reconstitución de los indicados en la etiqueta del vial. Consulte las hojas de solicitud correspondientes.

Procedimiento Manual:

- Reconstituir CK -MB reactivo de acuerdo con las instrucciones.
- Pipetear 1.0 mL de reactivo CK-MB en los tubos de ensayo apropiados y pre-caliente a 37°C durante cinco (5) minutos.
- Cero el espectrofotómetro con agua a 340nm.
- Añadir 0.050 mL (50 µL) de la muestra al reactivo, mezclar, e incubar a 37°C durante cinco (5) minutos.
- Después de cinco minutos, leer y registrar el cambio de absorbancia por minuto durante dos (2) minutos.
- Calcular la diferencia de absorbancia promedio por minuto ($\Delta\text{Abs.}/\text{min.}$).
- La $\Delta\text{Abs.}/\text{min.}$ multiplicada por el factor 3376 (Ver Cálculos) dará resultados de CK-B en UI/L.
- Las muestras con valores por encima de 1500 UI/L se deben diluir 1:1 con solución salina, volverse a analizar, y los resultados se multiplican por dos (2).

Nota:

Si el espectrofotómetro siendo utilizado requiere un volumen final de más de 1.0 mL para lecturas precisas, se puede utilizar 3.0 mL de reactivo y 0.15 mL (150 µL) de la muestra. Si el espectrofotómetro que se utiliza está equipado con una cubeta de temperatura controlada, la mezcla de reacción se puede dejar en la cubeta mientras se toman las lecturas.

Limitaciones:

El procedimiento supone que la actividad de CK-BB en la muestra es insignificante. Si una cantidad significativa de

actividad de CK-BB está presente, entonces también la actividad de CK-MB será sobreestimada.

Cálculos:

1. Actividad CK Total:

Determinar la actividad total de CK en suero de acuerdo con las instrucciones que se facilitan en el prospecto de CK reactivo.

2. Actividad CK-B:

$$\text{UI/L} = \frac{\Delta\text{Abs./min.} \times \text{TV} \times 1000}{x \text{ en SV}} = \frac{\Delta\text{Abs./min.} \times 1.050 \times 1000}{1 \times 6.22 \times 0.050}$$

$$= \Delta\text{Abs.}/\text{min.} \times 3376$$

Donde:

$\Delta\text{Abs.}/\text{Min.}$ = Cambio medio de absorbancia por minuto TV

= Volumen total de reacción (1.050)

1000 = Conversión de UI/ml a UI/L

d = paso de luz en cm (1.0)

€ = absorción milimolar del NADH (6.22)

SV = volumen de muestra en ml (0.050)

3. Actividad CK -MB:

La actividad de CK-MB se calcula a partir de la actividad de CK-B de la siguiente manera: Actividad de CK-MB (UI/L) = CK-B UI/L x 2*

* La molécula CK-MB es un dímero que consta de una subunidad B y una subunidad M. Complejos de anticuerpo con la subunidad M resultan en la pérdida de la mitad de la actividad catalítica de la molécula de CK-MB. Por lo tanto, la actividad de CK-MB en la muestra es igual a dos veces la actividad de la CK-B.

Ejemplo:

Si el cambio de absorbancia por minuto promedio es 0.020, entonces: $0.020 \times 3376 = 67.5$ UI/L (Actividad de CK-B)

Nota:

Actividad de CK-MB (IU/L) = Actividad de CK-B (IU/L) x 2

Por ejemplo, si la actividad de CK-B es 67.5 UI/L, entonces CK-MB = $67.5 \times 2 = 135.0$

Porcentaje de actividad de CK-MB en la muestra es:

$$\% \text{ de actividad de CK-MB} = \frac{\text{Actividad de CK-MB} \times 100}{\text{La actividad total de CK}}$$

Por ejemplo, si la actividad de la CK total es 1007 UI/L, la actividad de CK-B es 67.5 UI/L, y la actividad de CK-MB es de 135 UI/L entonces;

$$\text{la actividad de CK-MB} = \frac{135\% \times 100\%}{1007} = 13.5\%$$

Calibración:

La actividad de CK en la muestra se calcula sobre la base de la capacidad de absorción milimolar de NAD. El reactivo CK-MB es adecuado para el ensayo de la isoenzima CK cuando la actividad total de CK en la muestra no excede de 1500 UI/L a 37°C.

Control de Calidad:

Utilizar sueros de control con valores conocidos normales y anormales para monitorear la integridad de la reacción en cada conjunto de ensayo. Los valores deben ser aceptables para este método y temperatura.

Factores de Conversión de Temperatura:

Para convertir la actividad de CK-MB a 37°C a valor de 30°C, multiplicar el resultado por 0.60.

Valores Esperados¹⁵:

0-24 UI/L (37°C)

0-14 UI/L (30°C)

% CK-MB < 5.5%

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores esperados, ya que existen diferencias entre instrumentos, laboratorios y poblaciones locales.

Características de Rendimiento:

- Linealidad: 1500 UI/L
- Sensibilidad: Basado en una resolución de instrumento de $A = 0.001$, este procedimiento tiene una sensibilidad de 4 UI/L.
- Comparación: Los estudios realizados entre este procedimiento y el procedimiento de Sigma dan un coeficiente de correlación de 0.98 con una ecuación de regresión de $y = 0.98x - 0.823$ (N = 40).
- Precisión:

Dentro de Corrida:

	Media (IU/L)	S.D.	C.V. (%)
Normal	34	2.8	8.2
Anormal	132	9.9	7.5

Corrida-a-Corrida:

	Media (IU/L)	S.D.	C.V. (%)
Normal	32	3.1	9.8
Anormal	122.8	9.2	7.4

Referencias:

- Dawson, D M, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 21:346 (1965).
- Neumeir, D., *Tissue Specific Distribution of Creatine Kinase Isoenzyme*, H. Lang, Editor, Springer Verlag, New York, p 85-109 (1981).
- Wagner, et al., *Circulation*: 47:263 (1973).
- Bais R., *Crit. Rev., Clin. Lab. Sci.*, 18:291 (1982).
- D'Souza JP et al., *Clin. Biochem.* 11:204 (1978).
- Robert et al., *Am. J. Cardiol.* 33:650 (1974).
- Mercer D.W., *Clin. Chem.* 20:36 (1974).
- Gerhardt et al., *Clin. Chem. Acta* 78:29 (1977).
- Kaehmar, J.F. and Moss, D.W.: *Fundamentals of Clinical Chemistry*, Tietz N.W. ed. Saunders, W.B. Co., Philadelphia, 686 (1976).
- Young, D. S., et al., *Clin. Chem.* 21:10 (1975).
- Lang, H et al., *Clin. Chem.* 28:1439 (1982).
- Lott J.A., *Clin. Lab Med.* 6:547 (1986).
- Ljungdahl L., Gerhardt W., "Creatine kinase isoenzymes variants in human serum." *Clin. Chem.* 24:832, (1978).
- Urdal P, Landaas S: "Macro-creatine kinase BB in serum, and some data on its prevalence," *Clin. Chem.* 25:461, (1979).
- Wu AHB, Bowers CN Jr: "Evaluation and comparison of immunoinhibition and immunoprecipitation methods for differentiating MB from BB and macro forms of creatine kinase isoenzymes in patients and healthy individuals," *Clin. Chem.*:2017,

