

CREATINA QUINASA CK-NAC 2V

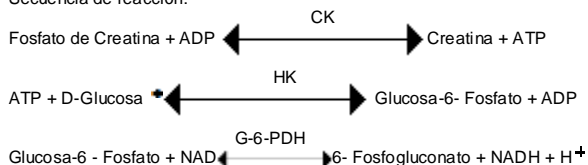
Uso:

Para la determinación cuantitativa de los niveles de creatina quinasa en suero humano. **Introducción** La creatina quinasa (CK) desempeña un papel importante en el mecanismo de almacenamiento de energía del tejido por la catálisis de la reacción reversible entre creatina y ATP para formar fosfato de creatina y ADP. CK se distribuye en varios órganos; las actividades más altas (en orden decreciente) son músculo esquelético, corazón, y cerebro. Por lo tanto, la determinación de CK es una ayuda en el diagnóstico de la distrofia muscular y otras enfermedades de los músculos esqueléticos, infarto de miocardio, enfermedades renales, y/o disfunción.2

Al principio el procedimiento para la determinación de CK se basó en la tasa de formación de ATP.3 Un método modificado fue descrito por Nielson mediante la adición de un compuesto sulhidrido y AMP para asegurar la máxima actividad de CK e inhibir la actividad del adenilato quinasa.4 Condiciones optimizadas para la medición de CK fueron publicadas por Szasz en 1976, así como por el comité escandinavo en enzimas.5, 6 El procedimiento anterior se modifica de nuevo en 1979 para incluir EDTA.7 El presente reactivo es una modificación de la revisión anterior.

Principio:

Secuencia de reacción:



CK cataliza la conversión de fosfato de creatina y ADP a creatina y ATP. El ATP y la glucosa se convierten a ADP y glucosa-6-fosfato por la hexoquinasa (HK). Deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato (G-6-PDH) se oxida a la D-glucosa-6-fosfato y reduce el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD). La tasa de formación de NADH, medida a 340 nm, es directamente proporcional a la actividad de CK en suero.

Composición del Reactivo:

El reactivo de CK contiene lo siguiente:

D-Glucosa	20 mM
Magnesio++	10 mM
Adenosina-5'-Monofosfato (AMP)	50 mM
N-Acetilcisteína (NAC)	20 mM
Fosfato de Creatina	30 mM
Adenosina-5'-Difosfato (ADP)	2 mM
Nicotinamida Adenina Oxidada	
Fosfato Dinucleótido	2 mM
Glucosa-6- Fosfato Deshidrogenasa (E.C.1.1.1.49, G-6-PDH)	3,000 U/L
Hexoquinasa (E.C.2.7.1.1, HK)	3,000 U/L
EDTA	2 mM
Buffer	100 mM

Advertencias y Precauciones:

1. Para el diagnóstico in vitro.
2. Respetar las precauciones normales necesarias para el manejo de todos los reactivos de laboratorio. Pipeteo con la boca no es recomendable para cualquier reactivo de laboratorio.

Preparación del Reactivo:

El reactivo de trabajo se prepara mediante la mezcla de cinco (5) volúmenes de R1 con un (1) volumen de R2 en un recipiente desechable. Ejemplo: 25 mL R1 + 5 mL R2.

Almacenamiento y Estabilidad:

El reactivo debe ser almacenado a 2-8°C antes de su reconstitución. El reactivo puede usarse hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase. Después de la reconstitución, el reactivo es estable durante veinticuatro (24) horas a temperatura ambiente o veintiún (21) días refrigerado (2-8°C).

Deterioro del Reactivo:

1. Apariencia física: Si el reactivo aparece húmedo y agrupado, deterioro puede haber ocurrido, y el producto debe desecharse.
2. Absorbancia del blanco: Si el reactivo reconstituido CK sin muestra añadida tiene una absorbancia mayor que 0.70 a 340 nm frente a agua del grado del

reactivo, el reactivo se considera insatisfactorio para su uso y debe desecharse.

3. Los ensayos de control: El no tener resultados precisos en el ensayo de materiales de control puede indicar deterioro del reactivo.
4. No podemos garantizar la estabilidad de los reactivos que han sido:
 - a. Transferido de sus envases originales.
 - b. Incorrectamente almacenado antes de o durante el uso.
 - c. Contaminado durante su uso.

Recolección de Muestras:

Recoger la sangre total por punción venosa no traumática y permitir la coagulación. Centrifugar y eliminar el suero inmediatamente. Suero se informa estable para cuatro (4) horas a temperatura ambiente, 8-12 horas a 2-8°C, y 2-3 días cuando se congela.8

Las muestras hemolizadas no deben ser utilizadas debido a reacciones secundarias que pueden ocurrir debido al adenilato quinasa, trifosfato de adenosina, y deshidrogenasa liberada de las células rojas de glucosa-6-fosfato.

Sustancias Que Pueden Interferir:

Ciertas drogas y medicamentos pueden afectar la actividad de CK, véase Young et al. 9

Materiales Necesarios, Pero No Suministrados:

Pipetas para muestras y reactivos, viales de prueba o cubetas, cronómetro, estante de tubo de prueba, celda de flujo termostregulada, espectrofotómetro, suero de control.

Instrucciones Generales:

El reactivo de CK está diseñado para utilizarse tanto en procedimiento automatizado de instrumentos de química como en procedimiento manual en un espectrofotómetro adecuado.

Procedimiento (Automatizado):

Consulte las instrucciones del instrumento para la aplicación adecuada.

Procedimiento (Manual):

1. Reconstituya el reactivo de trabajo de acuerdo a las instrucciones.
2. Pipetear 1.0 mL de reactivo en los tubos apropiados y pre-caliente a 37°C durante cuatro (4) minutos.
3. Cero el espectrofotómetro con agua destilada a 340 nm.
4. Agregue 0.025 mL (25 µL) de muestra al reactivo, mezclar e incubar a 37°C durante dos (2) minutos.
5. Después de dos minutos, leer y anotar la absorbancia. Devolver los tubos de 37°C. Repita las lecturas cada minuto durante los siguientes dos minutos.
6. Calcular la diferencia de absorbancia promedio por minuto ($\Delta\text{Abs./Min.}$)
7. Los $\Delta\text{Abs. /Min.}$ multiplicado por el factor 6592 (ver Cálculos) dará resultados en IU/L.
8. Las muestras con valores por encima de 1200 IU/L se deben diluir 1:1 con solución salina, se volvieron a analizar, y los resultados se multiplican por dos (2).

Nota:

Si el espectrofotómetro siendo utilizado requiere un volumen final mayor que 1.0 ml para lecturas precisas, se pueden usar 3 mL de reactivo y 0.1 mL (100 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 de absorbancia.

Limitaciones del Procedimiento:

1. Algunos inhibidores de la actividad de CK:10
 - a. El exceso de Mg++, Cl-, SO42-
 - b. Mayoría de los metales pesados de tierra, es decir, Zn++, Cu++, Mn++
 - c. Iodoacetato y otros agentes sulhidrido
 - d. El exceso de ADP, citrato, fluoruro, L-tiroxina
 - e. El exceso de ácido úrico.
2. Este procedimiento mide la actividad total de CK con independencia de tejidos de órganos o su origen.
3. Valores menor de lo esperado de CK han sido reportados en muestras que tienen alta actividad de fosfatasa alcalina.

Cálculos:

$$\text{IU/L} = \frac{\Delta\text{Abs./min.} \times \text{TV} \times 1000}{D \times \epsilon \times \text{SV}} = \frac{\Delta\text{Abs./min.} \times 1.025 \times 1000}{1 \times 6.22 \times 0.025} = \Delta\text{Abs./min.} \times 6592$$

Donde:

$\Delta\text{Abs./min.}$ = Promedio de cambio en absorbancia por minuto
TV = Volumen total de reacción (1.025)

1000 = Conversión de IU/mL a IU/L

D = Paso de luz en cm (1.0)

ϵ = Absorción Millimolar NADH (6.22)

SV = Volumen de muestra en ml (0.025)

Ejemplo:

Si su Promedio de cambio en absorbancia por minuto es 0.015, entonces $0.015 \times 6592 = 98.9$ IU/L.

Nota: Si cualquiera de los parámetros de la prueba son cambiados, se tiene que determinar un nuevo factor siguiendo la fórmula anterior.

UNIDADES SI: Para convertir unidades SI (nkat/L) multiplicar IU/L por 16.67.

*Si 3 mL de reactivo y 0.1 mL (100µL) de muestras son utilizados, entonces $\text{IU/L} = \Delta\text{Abs. /min.} \times 4984$.

Control de Calidad:

Utilice sueros de control con los valores normales y anormales conocidos para supervisar la integridad de la reacción. Los valores deben ser aquellos aceptables para este método y temperatura.

Factores de Conversión de Temperatura:

Es posible convertir los resultados a resultados aproximados a otras temperaturas multiplicando por el factor de temperatura apropiado.

Temperatura de Rendimiento	Temperatura Reportada		
	25°C(TF)	30°C(TF)	37°C(TF)
25°C	1.00	1.38	2.30
30°C	0.72	1.00	1.67
37°C	.043	0.60	1.00

Valores Esperados:

25 - 192 IU/L (37°C).

10 - 109 IU/L (30°C).

Rendimiento:

1. Linealidad: 1.200 IU/L.
2. Comparación: Los estudios realizados entre este procedimiento y un procedimiento similar producen un coeficiente de correlación de 0.991 con una ecuación de regresión de $y = 1.01 \times 0.29$.
3. Estudios de Precisión:

Dentro de la Corrida:

Promedio (mg/dL)	S. D.	C. V. %
111	1.6	1.5
373.5	12.4	3.3

Corrida-a-Corrida:

Promedio (mg/dL)	S. D.	C. V. %
110.9	4.3	3.9
367.4	10.3	2.8

Referencias:

1. Faulker, W.R. and Meites, S.: *Selected Method of Clinical Chemistry*, vol 9, p. 185 (1982).
2. Rosalki, S.B.: *J. Lab. Clin. Med.* 69:696 (1967).
3. Oliver, I.T.: *Biochem. J.* 61:116 (1955).
4. Nielson, L., Ludvigsen, B.: *J. Lab. Clin. Med.* 62:159 (1963).
5. Szasz, G, et al.: *Clin. Chem.* 22:650 (1976).
6. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society to Clinical Chemistry and Clinical Physiology. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 36:711 (1976).
7. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society to Clinical Chemistry and Clinical Physiology. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 36:711 (1979).
8. Kaehmar, J.F. and Moss, D.W.: *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Tietz N.W. ed. Saunders, W.B. Co., Philadelphia, 686 (1976).
9. Young, D.S. et al.: *Clin. Chem.* 21:10 (1975).
10. Moren, L.G.: *Clin. Chem.* 23:1569 (1977).

