



CREATINA CINASA - SL

Números de catálogo: 326-10
326-30

Presentación: R1: 1 x 100 mL, R2: 1 x 25 mL
R1: 3 x 100 mL, R2: 1 x 75 mL

USO

Para la determinación cuantitativa *in vitro* de creatina cinasa en suero.

PRECAUCIONES

Evite la ingestión y el contacto con la piel y los ojos. Vea la Hoja de Seguridad del Producto.

REACTIVOS

R1: Reactivo Amortiguador de CK-SL; R2: Reactivo de Sustrato de CK-SL

El Reactivo de Trabajo contiene: 100 mmol/L de imidazol (pH 6.7 a 25°C), 30 mmol/L de fosfato de creatina, 20 mmol/L de glucosa, 20 mmol/L de N-acetilcisteína, 10 mmol/L de acetato de magnesio, 2 mmol/L de EDTA, 2 mmol/L de ADP, 5 mmol/L de AMP, 10 µmol/L de pentafofosfato de di-adenosina, 2.0 mmol/L de NADP, >1.5 KU/L de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y >2.5 KU/L de hexocinasa.

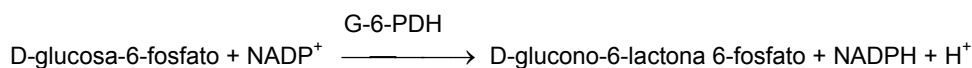
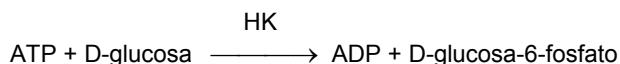
ANTECEDENTES

En todos los tipos de distrofia muscular y enfermedades que implican la destrucción de los tejidos musculares se detectan concentraciones séricas elevadas de creatina cinasa. En el caso de la distrofia muscular progresiva, pueden presentarse concentraciones elevadas de CK antes de que aparezcan los síntomas clínicos. Se han detectado concentraciones elevadas de CK después de un infarto del miocardio, en casos de enfermedad cardiovascular aguda y en el síndrome de Reye. Enfermedades musculares neurógenas como la esclerosis múltiple y la poliomielitis no producen concentraciones elevadas de CK. La actividad de la CK está en sentido inverso a la actividad de la tiroides, por tanto, pudieran observarse concentraciones elevadas de CK en casos de hipotiroidismo. (1)

Oliver (2) describió por primera vez el método para analizar la CK utilizando fosfato de creatina y difosfato de adenosina (ADP) como sustratos en vez de creatina y trifosfato de adenosina (ATP). Este método emplea las condiciones optimizadas propuestas por el Scandinavian Committee on Enzymes y la German Society for Clinical Chemistry (3, 4, 5). En el procedimiento, la N-acetilcisteína (NAC) es el activador tilo y se agregan monofosfato de adenosina (AMP) y pentafofosfato de p¹,p⁵-di(adenosina-5') (AP₅A) para inhibir la interferencia causada por la actividad de la adenilato cinasa.

PRINCIPIOS

Las reacciones proceden de la siguiente manera:



El incremento en absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADPH es directamente proporcional a la actividad de la creatina cinasa.

PREPARACION DEL REACTIVO

Los reactivos suministrados están listos para su uso. Puede prepararse un reactivo de trabajo al mezclar 4 partes de reactivo amortiguador de CK-SL (R1) con una parte de reactivo sustrato de CK-SL (R2).

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

Los reactivos suministrados son estables hasta la fecha de caducidad especificada en las etiquetas a 2-8°C. Proteja el reactivo de la luz solar. El reactivo de trabajo es estable por 21 días a 2-8°C.

DETERIORO DEL REACTIVO

Las soluciones de reactivo debe ser claras. La turbidez indicaría deterioro.

INSTRUMENTOS

Puede usarse cualquier instrumento con control de temperatura de $\pm 0.5^\circ\text{C}$ que sea capaz de leer la absorbancia con exactitud, con una sensibilidad de 0.001 de absorbancia a 340 nm. El ancho de banda deberá ser de 10 nm o menos, la desviación de luz de 0.5% o menos y la exactitud de longitud de onda dentro de 2 nm.

RECOLECCION Y PREPARACION DE LA MUESTRA

La muestra de elección es suero fresco, claro y no hemolizado. Los anticoagulantes diferentes a la heparina interfieren con la actividad de la CK (7). La actividad de la CK en suero se reduce rápidamente conforme aumenta la temperatura y la muestra deberá de separarse y enfriarse a 2-8°C tan pronto como sea posible. La CK Macro, o mitocondrial, es la isoenzima más estable seguida por la CK-3 (MM), CK-2 (MB) y CK-1 (BB).

Las estabilidades promedio, definidas como menos de 5% de pérdida de actividad, son las siguientes (5,1):

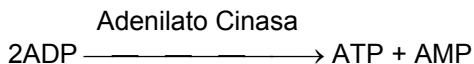
CK-MM (CK-3): 24 horas a 18-26°C, 1 semana a 4°C, 1 mes a -20°C

CK-MB (CK-2): 12 horas a 18-26°C, 3 días a 4°C, 1 mes a -20°C

CK-BB (CK-1): menos que CK-MB (CK-2)

SUBSTANCIAS DE INTERFERENCIA

La adenilato cinasa interfiere con la determinación de la actividad de CK al generar ATP adicional (ver la siguiente reacción), incrementando así la aparente actividad de la creatina cinasa.



En este procedimiento, la adición de AMP y AP_5A al reactivo inhibe la actividad de la adenilato cinasa (4)

Se evaluaron las interferencias por ictericia, lipemia y hemólisis para este método de CK-SL en un analizador Hitachi utilizando un criterio de significancia de variación $>10\%$ a partir del control. No se encontró interferencia importante por ictericia a niveles de bilirrubina de 0-684 $\mu\text{mol/L}$ (0-40 mg/dL) en una muestra de CK de 205 U/L.

No se encontró interferencia importante por lipemia a concentraciones de intralípidos de 0-1000 mg/dL [equivalente a 0-33.9 mmol/L (0-3000 mg/dL) de triglicéridos] en una muestra de CK de 188 U/L.

Se estudiaron niveles de hemoglobina de 0-155 $\mu\text{mol/L}$ (0-1000 mg/dL) con resultados aceptables a una concentración de 31 $\mu\text{mol/L}$ (200 mg/dL). A una concentración de hemoglobina de 31 $\mu\text{mol/L}$ (200 mg/dL) se obtuvo una interferencia positiva de 6.1% con una muestra de CK de 198 U/L. Se puede encontrar un resumen de la influencia de drogas en pruebas de laboratorio clínico consultando a Young, D.S. (8).

PROCEDIMIENTO

Materiales Proporcionados

Se incluyen los reactivos necesarios para la determinación de creatina cinasa.

Materiales Requeridos

1. Un instrumento que reúna los requisitos mencionados en la sección de Instrumentos.
2. Cubetas de 1 cm o una celda de flujo capaz de transmitir luz a 340 nm.
3. Tubos de ensayo de la capacidad adecuada
4. Pipetas de la capacidad adecuada
5. Un cronómetro adecuado
6. Un baño de agua adecuado

Condiciones

	Genéricas	Analizador automatizado
Longitud de onda	340 nm	340 nm
Temperatura	37°C	37°C
Paso de luz	1 cm	
Tipo de reacción	Cinética	Cinética
Tiempo de reacción	3-5 minutos	10 minutos
Volumen de la muestra	40 µL	10 µL
Volumen de reactivo	1.0 mL	R1 280 µL; R2 70 µL
Volumen total	1.040 mL	360 µL
Relación muestra/reactivo	1:25	1/35

Procedimiento

1. Prepare el volumen requerido de reactivo de trabajo como se indicó en Preparación del Reactivo.
2. En tubos de ensayo por separado pipetee 40 µL del suero a analizar.
3. Agregue 1.0 mL del reactivo, mezcle e incube por 2 minutos a 37°C. Se reducirá el tiempo de reacción si se precalienta el reactivo a la temperatura de incubación.
4. Registre el cambio en la absorbancia a 340 nm a intervalos de un minuto hasta que el cambio de absorbancia sea constante.

CALIBRACION

No se utiliza un estándar para calibrar el procedimiento de creatina cinasa. Los resultados son calculados usando el coeficiente de extinción molar y la fórmula dada. Véase Cálculos y Resultados.

CONTROL DE CALIDAD

Se debe analizar un suero control normal y anormal con cada serie de muestras, y los resultados deberán caer dentro de ± 2 desviaciones estándar del valor establecido.

CALCULO Y RESULTADOS

Resultados

La actividad de la creatina cinasa se expresa en unidades por litro (U/L).

Cálculo

$$\begin{aligned} \text{Creatina cinasa (U/L)} &= \frac{\Delta A/\text{min} \times \text{volumen del análisis (mL)} \times 1000}{6.22 \times \text{paso de luz (cm)} \times \text{volumen de la muestra (mL)}} \\ &= \Delta A/\text{min} \times 4180 \end{aligned}$$

$\Delta A / \text{min}$	= cambio en absorbancia por minuto
Volumen del análisis	= volumen total de la reacción expresado en mL
1000	= convierte las U/mL a U/L
6.22	= coeficiente de absorción del NADPH
Paso de luz	= longitud del paso de luz expresada en cm (usualmente 1.0)
Volumen de la muestra	= volumen de la muestra expresado en mL
4180	= factor derivado de las constantes en la ecuación

Ejemplo

$$\begin{aligned} \text{Creatina cinasa (U/L)} &= \frac{0.029 \times 1.040 \times 1000}{6.22 \times 1 \times 0.04} \\ &= 0.029 \times 4180 \\ &= 121.2 \text{ U/L} \end{aligned}$$

- 0.029 = cambio en absorbancia por minuto
- 1.040 = volumen de la reacción total expresada en mL
- 1000 = convierte las U/mL a U/L
- 6.22 = coeficiente de absorbancia del NADPH
- 1 = paso de luz en cm
- 0.04 = volumen de la muestra en mL
- 4180 = factor derivado de las constantes en la ecuación

Limitaciones

Una muestra con un valor de creatina cinasa que exceda el límite de linealidad, deberá diluirse con solución salina a 0.9% y reanalizarse incorporando el factor de dilución en el cálculo del resultado. Note que la dilución de sueros sumamente activos causa un aumento progresivo en la actividad por unidad de volumen. (9)

VALORES ESPERADOS (1)

- Hombres: 38-174 U/L (37°C)
- Mujeres: 26-140 U/L (37°C)

Se sugieren estos valores como referencia. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales para el área donde está localizado.

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

Estas características de rendimiento se obtuvieron en laboratorios de DCL con procedimientos automatizados.

Estudio de Recuperación

Se agregó creatina cinasa (NAC) a un grupo de sueros humanos para aumentar la concentración de CK (NAC) en 174 U/L y 348 U/L. La recuperación de CK (NAC) agregada promedió 96.1%.

Rango Reportable (NCCLS EP6-P)

El rango reportable utilizando procedimientos automatizados dependerá de la proporción muestra/reactivo utilizada. El procedimiento automatizado descrito dio un rango reportable de 2-1500 U/L.

Estudios de Precisión (NCCLS EP5-T2)

Se recopilaron los datos de dos sueros control utilizando un solo lote de reactivo en 40 corridas llevadas a cabo durante 20 días.

Nivel U/L	DE Total	CV Total %	DE durante la corrida U/L	CV durante la corrida %
288	7.1	2.5	1.3	0.4
748	15.7	2.1	2.3	0.3

Exactitud (NCCLS EP9-P)

Se comparó el rendimiento de este método (y) con el de un método similar para CK-NAC (x) en un analizador Hitachi. Las muestras de suero de 57 pacientes que oscilaron de 31 U/L a 1480 U/L dieron un coeficiente de correlación de 0.9993. El análisis de regresión lineal dio la siguiente ecuación:

$$\text{Este método} = 1.02 (\text{método de referencia}) + 1.3 \text{ U/L.}$$

REFERENCIAS

1. Burtis, C.A., Ashwood, E.R. (Ed.), Tietz Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Toronto, (1994).
2. Oliver, I.T., A Spectrophotometric Method for the Determination of Creatine Phosphokinase and Myokinase, Biochem. J.61, 116 (1955).
3. Gerhart, W., Waldenstrom, J., Gruber, W., Scand, J. Clin Lab. Invest. 39, 737-742 (1979).
4. Szasz, G., Gerhardt, W., Gruber, W., Clin Chem. 23, 1888-1892 (1972).
5. Recommendation of the German Chemical Society Standardization of Methods for the Estimation of Enzyme Activities in Biological Fluids, J. Clin. Chem., Clin Biochem. 15, 225-260 (1977).
6. Rotthauwe, H.W., Kowalewski, S., Klin. Wschr. 45, 387 (1967).
7. Kaplan, Lawrence and Pesce, Amadeo J.(Ed) , Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation, Mosby-Year Book Inc, St Louis Missouri, (1996).
8. Young, D.S., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, AACC Press, Third Edition, Washington, 1990.
9. Graig, F.A., Smith, I.C., Foldes, F.F., Clin. Chem. Acta. 15, 107 (1967).

IN32610-3

Septiembre 24, 2004