

INTENCIÓN DE USO

El kit CK-MB ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de CK-MB en suero humano.

RESUMEN

La Creatina Quinasa (CK-MB) es la enzima utilizada como el marcador de suero definitivo para el diagnóstico o exclusión del infarto de miocardio agudo. La determinación de la masa de la CK-MB ha demostrado ser más específico para determinar la necrosis miocárdica que la prolongada actividad de la CK-MB y los ensayos de inhibición de CK-MB. CK-MB, lanzada tras el Infarto de Miocardio Agudo (IAM), es detectable en la sangre dentro de las primeros 3 a 4 horas después de la aparición de los síntomas, y se mantiene elevada durante unas 65 horas después del infarto. Niveles de masa de CK-MB reportan un 50% de diagnóstico de IAM después de 3 horas y > 90% a las 6 horas. Tal precisión hace que la determinación de masa de CK-MB sea útil para confirmar IAM en pacientes que acuden a urgencias con ECG no diagnosticados, 6 horas después de la aparición de los síntomas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit CK-MB es un método ELISA sándwich en fase sólida directa. El ensayo utiliza un anticuerpo monoclonal direccionado contra un antígeno determinante en la molécula en la fase sólida de inmovilización en el micropozo. Un anticuerpo de cabra anti CK-MB se encuentra presente en el conjugado enzimático. Se le permite a la muestra el reaccionar simultáneamente con los dos anticuerpos, resultando en un sándwich de las moléculas de CK-MB entre los anticuerpos de fase sólida y aquellos ligados enzimáticamente. Luego de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, los micropozos son lavados a fin de eliminar los anticuerpos no unidos. Se agrega el sustrato TMB y se incuba por 20 minutos, resultando en una coloración azul, la cual es frenada por la solución de lavado, propiciando una coloración amarilla. La concentración de CK-MB es directamente proporcional a la intensidad de color. La absorbancia debe ser leída a 450 nm.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos con Anti-CK-MB	12x8x1
2. Estándares de Referencia con 0, 7.5, 15, 50,100, y 200 ng/ml CK-MB. 1.0 ml para cada estándar.	1 ml
3. Conjugado Enzimático (listo para su uso)	22 ml
4. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)	11 ml
5. Solución de Frenado 1 frasco (listo para su uso)	11 ml
6. Solución de Lavado Concentrado 20X: 1 frasco	25 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrulado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre que las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas como se indica.

4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este pueden dar datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Para el procedimiento del presente ensayo se requieren muestras de suero.
2. Recolectar la sangre por venopunción y separar el suero de inmediato.
3. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigerar la muestra a (2-8°C) por 24 horas. En caso de exceder dicho plazo, congelar a -20°C hasta un seis meses.
4. Evitar utilizar muestras con excesos de lípidos, hemolíticos o turbios (post centrifugación).
5. Evitar múltiples ciclos de congelación - descongelación. No almacenar en congeladores "frost free", que pueden causar descongelación ocasional. Las muestras que han sido congeladas, y las que son turbias y / o contienen partículas, deben ser centrifugadas antes de su uso.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-23° C) previo a su uso.
2. Preparar una solución de lavado a 1X, adicionando el contenido de la botella (25 ml, 20 X) a 475 ml de agua destilada o des ionizada. Conservar a temperatura ambiente (18-23°C).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigerarlos a 2-8°C.
2. Dispense 20 µl de estándares, muestras y controles en los micropozos designados.
3. Dispense 200 µl de Conjugado Enzimático en cada pozo.
4. Mezcle por 30 segundos. Es importante que el mezclado se lleve a cabo completamente.
5. Incube a temperatura ambiente (18-23°C) por 60 minutos.
6. Remueva el líquido de los pozos. Lavar en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x.
7. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente hasta remover todos los residuos líquidos.
8. Agregue 100 µl de sustrato TMB en cada pozo. Mezclar gentilmente por 5 segundos.
9. Incube a temperatura ambiente (18-23°C) por 20 minutos.
10. Frene la reacción agregando 100µl de Solución de Frenado a cada pozo. Mezclar gentilmente.
11. Mezcle gentilmente por 30 segundos. Es importante que la

coloración azul cambie a amarillo completamente.

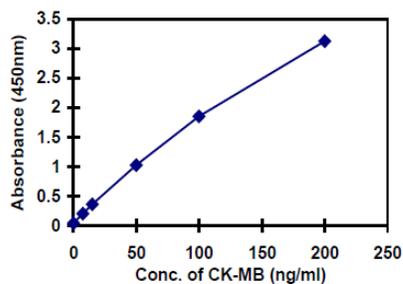
12. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcular el valor de absorbancia media para cada estándar de referencia, controles y muestras.
2. Para la construcción de la curva trazar la lectura de absorbancia media para cada estándar de referencia en eje vertical contra su concentración en ng/ml en eje horizontal en papel gráfico lineal, dibujar la curva de mejor manera posible uniendo los puntos.
3. Utilizar el valor de absorbancia media para cada espécimen a fin de determinar la correspondiente concentración de CK-MB desde la curva estándar. Registrar el valor de cada control o muestra desconocida.
4. Los resultados obtenidos con muestras diluidas deberán ser calculados con el factor de dilución correcto.

EJEMPLO DE CURVA STANDARD

Los resultados de un ensayo estándar con lecturas de absorbancia a 450 nm se indican en el eje Y mientras que las concentraciones de CK-MB se muestran en el eje X. El propósito de la curva estándar es meramente ilustrativo y no debe ser utilizado para el cálculo de muestras desconocidas. Cada laboratorio debe obtener sus propios datos y construir su propia curva estándar.



VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores tomando muestras de una porción representativa de la población local. Los siguientes valores pueden ser utilizados como referencia únicamente. La concentración mínima detectable de CK-MB mediante el presente ensayo es de 2.5 ng/ml.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos por medio presente test solo deben ser utilizados como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, pruebas físicas y otros procesos de diagnóstico.
2. El paso de lavado es crítico. El lavado insuficiente puede conducir a resultados erróneos.

REFERENCIAS

1. Lee, T.H., Goldman, L., Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann. Intern. Med.*, 1986; 105: 221-233.
2. The best biochemical markers of myocardial infarction. *Scripps News*, 1996; 10: 1-4.
3. Meerson, F.Z., Javich, M.P., Isoenzyme pattern and activity of myocardial creatine phosphokinase under heart adaptation to prolonged overload. *Basic Res. Cardiol.*, 1982; 77: 349-358.
4. Wu, A., Wang, X-M., Gornet, T.G., et al., Creatine kinase MB isoforms in patients with skeletal muscle injury: ramifications for early detection of acute myocardial infarction. *Clin. Chem.*, 1992; 38: 2396-2400.
5. Bhayana, V., Cohoe, S., Leung F.Y., et al., Diagnostic evaluation of creatine kinase-2 mass and creatine kinase-3 and -2 isoform ratios in early diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin. Chem.*, 1993; 39: 488-495 Mair, J., Morandell, D., Genser, N., et al., Equivalent early sensitivities of myoglobin, Creatine Kinase MB mass, Creatine Kinase isoform ratios, and cardiac Troponin I and T for acute myocardial infarction. *Clin. Chem.*, 1995; 41: 1266-1272.
6. 7 Bokhari, A.M., Davies, J., Davies J., et al., Biochemical diagnosis of myocardial infarction within the thrombolytic time window. *Int. J. Cardiol.*, 1995; 48: 249-254.
7. 8 Mair, J., Wagner, I., Jakob, G., et al., Different time courses of cardiac contractile proteins after acute myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta.* 1994; 231: 47-60.
8. Levitt, M.A., Promes, S.B., Bullock, S., et al., Combined cardiac marker approach with adjunct two-dimensional echocardiography to diagnose acute myocardial infarction in the emergency department. *Ann. Em. Med.*, 1996; 27: 1-7.
9. 10 Li, D., Jialal, I., Keffer J.H., Greater frequency of increased cardiac Troponin T than increased cardiac Troponin I in patients with chronic renal failure. *Clin. Chem.*, 1996; 42: 114-115.
10. Mair, J., Smidt, J., Lechleitner, P., et al., A decision tree for the early diagnosis of acute myocardial infarction in nontraumatic chest pain patient at hospital admission. *Chest*, 1995; 108:1502-1509. 12 Yang, Z., Zhang, W., Liu Y., Prognostic efficacy of Troponin T measurement in angina pectoris. *Chin. Med. J. (Engl)*, 1995; 108: 626-630.
11. Engvall, E., Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. In: Van Vunakis, H. and Langone, J.J. eds., *Methods in Enzymol.* Academic Press, New York, 1980; 70: 419-439.
12. Uotila, M., Ruoslahti, E. and Engvall, E. Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein. *J. Immunol. Methods*, 1981; 42: 11-15. 15 Tietz, N.W., ed., *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd Edition, W.B. Saunders, Co., Philadelphia, 1995: 180-186.