

FINALIDADE

Sistema colorimétrico para determinação de creatina fosfotransferase no soro.

Somente para uso diagnóstico in vitro.

PRINCIPIO

Em meio alcalino, a creatina fosfotransferase (CPK) catalisa a seguinte reação:



Em meio ácido, a fosfocreatina neo-formada é hidrolisada, liberando-se creatina e íon fosfato. O fosfato inorgânico liberado é proporcional à atividade enzimática.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

Alta concentração de creatina e ATP no substrato permite a obtenção de ótimas condições de reação, mantendo-se cinética de zero ordem e linearidade da reação até 360 U.I./L. A presença de glutathion ativa a CPK, permitindo a obtenção de valores elevados, condizentes com o teor real dessa enzima no soro. O tempo total entre a incubação e a dosagem de íon fosfato é de 30 minutos.

METODOLOGIA

Okinaka modificado.

REAGENTES

Substrato: solução 0,09M de Creatina em tampão TRIS 0,125M, pH 9. Devido à alta concentração de Creatina, há saturação da mesma. Os pequenos cristais, por vezes presentes no fundo do frasco, não diminuem a sensibilidade da reação.

ATP-Glutathion: cada frasco contém 21,8mmol de Adenosina Trifosfato, sal sódico e 26,1 mmol de Glutathion, sob forma liofilizada.

Solução padrão 130U.I./L: dentro da metodologia adotada, cada 0,5mL da solução corresponde a 130U.I./L de CPK.

Ácido Ascórbico: cada frasco contém 2g de Ácido Ascórbico.

Reagente molibdato: solução 0,016M de Molibdato de Amônio em Ácido Sulfúrico 1,5M.

Solução alcalina: solução 16,5M de Monoetanolamina.

APRESENTAÇÃO

Substrato	1 x 13,5 mL
ATP-Glutathion (flaconetes)	10 x 21 mg
Solução padrão 130U.I./L	1 x 5 mL
Ácido Ascórbico	1 x 2 g
Reagente molibdato	1 x 40 mL
Solução alcalina	1 x 20 mL

NÚMERO DE TESTES

10 testes - 50µL amostra

20 testes - 25µL amostra

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em 660nm ou filtro vermelho.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipetas semiautomáticas de 50µL e 500 µL.
- Ponteiras descartáveis.
- Água deionizada ou destilada.
- Banho maria (37°C).
- Cronômetro.
- Proveta com capacidade volumétrica de 130mL.
- Frasco âmbar, de vidro, com capacidade volumétrica de 130 mL.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Substrato: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento e manuseio.

ATP-Glutathion: armazenar à temperatura de 2-8°C, enquanto fechado na embalagem plástica. **Após a retirada da embalagem plástica, armazenar a 10°C negativos.** Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Solução padrão 130U.I./L: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Ácido Ascórbico: armazenar à temperatura de 2-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento. Após o preparo, a solução de Ácido Ascórbico deverá ser armazenada em frasco âmbar de vidro, ao abrigo da luz. Manter o frasco bem fechado e à temperatura de 2-8°C. A estabilidade da solução de Ácido Ascórbico é de 12 meses, se obedecidas as condições de manuseio, preparo e armazenamento.

Reagente molibdato: armazenar à temperatura de 2-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento e manuseio.

Solução alcalina: armazenar à temperatura de 2-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento e manuseio.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Todos os reagentes são somente para **uso diagnóstico in vitro**. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se contato com pele e mucosas. Em caso de contaminação acidental, lavar a parte afetada em água corrente. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

Observar ainda a simbologia constante nos rótulos do produto:



Corrosivo



Irritante

AMOSTRA

Soro. Os anticoagulantes (fluoretos, edta, citrato e heparina) inibem a atividade enzimática. A enzima permanece estável por 48 horas, à temperatura de 20°C; por 7 dias, à temperatura de 2-8°C e por 2 meses, à temperatura de 20°C negativos.

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Preparo da solução de Ácido Ascórbico 0,084M:

Medir em uma proveta 130mL de água destilada ou deionizada. Transferir todo o conteúdo de um frasco de Ácido Ascórbico para a água destilada ou deionizada e dissolver. Após o preparo, armazenar em frasco âmbar, ao abrigo da luz, à temperatura de 2-8°C. A estabilidade da solução de Ácido Ascórbico é de 12 meses, se obedecidas as condições de manuseio, preparo e armazenamento.

Preparo do substrato de uso:

A um frasco de ATP-Glutathion, adicionar 1,2mL do Substrato e agitar até dissolver. Contém material suficiente para uma dosagem.

Rotular 4 tubos de ensaio com **B (branco), BT (branco teste), T (teste), P (padrão).**



Proceder como segue:

	B	BT	T	P
Substrato de uso	-	0,5mL	0,5mL	-
Solução padrão	-	-	-	500µL
Água destilada	0,5mL	-	-	-
Colocar em banho maria, 37°C, durante 3 minutos.				
Soro	-	-	50µL	-

Incubar durante 20 minutos em banho maria (37°C). Retirar do banho maria e proceder como segue:

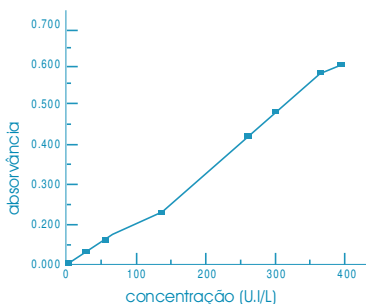
Soro	-	50µL	-	-
Reagente molibdato	1mL	1mL	1mL	1mL
Ácido Ascórbico 0,084M	3mL	3mL	3mL	3mL

Deixar repousar por 10 minutos, à temperatura ambiente. O tempo de 10 minutos, após a adição de **reagente molibdato e Ácido Ascórbico**, deve ser observado com atenção, pois nesse período se dá a hidrólise da fosfocreatina neo-formada. Após o repouso proceder como segue:

Solução alcalina	0,5mL	0,5mL	0,5mL	0,5mL
------------------	-------	-------	-------	-------

Homogeneizar por agitação (as proteínas se dissolvem). Deixar em repouso de 1 a 2 minutos. Ler as absorvâncias dos tubos **T (teste)**, **BT (branco teste)** e **P (padrão)**, em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **660nm** ou **filtro vermelho**, acertando o zero com o **branco (B)**.

CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (U.I./L)
1	0.000	0
2	0.043	26
3	0.086	52
4	0.213	130
5	0.424	260
6	0.489	300
7	0.590	360
8	0.605	390

Obs.: Não utilizar esta curva para determinar o resultado de seu ensaio.

- A curva de calibração é a representação gráfica da relação entre os valores das absorvâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão. São necessários três passos para confeccioná-la: (1) preparo das soluções padrão; (2) medição dos valores de absorvância das soluções padrão, de acordo com o especificado no procedimento técnico da presente instrução de uso, e (3) montagem de um gráfico em papel especial, linear, onde são relacionados os valores de absorvância com os de concentração, conforme demonstrado na figura acima.
- As dosagens para montagem da curva foram feitas em um espectrofotômetro "Ultrospec III", Pharmacia Biotec, comprimento de onda de 660nm e cubetas com passagem de luz de 10mm.
- A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma determinada concentração, na qual pode ser determinado um fator de calibração (F), de acordo com a Lei de Beer.
- A reação é linear até 360U.I./L (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, dilui-se a amostra com solução fisiológica e procede-se a nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**

- O kit de Creatina Fosfotransferase (CPK) Doles possui padrão no intervalo de linearidade conforme explicitado na curva de calibração. O laboratório deve realizar o ensaio com o padrão que acompanha o kit e calcular seu fator de calibração (F), a exemplo do demonstrado nos cálculos abaixo.
- O fator deve ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.
- Os padrões utilizados na montagem da curva de calibração foram ajustados em concentração de fosfato, tendo como referência "Standard Phosphorus Solution (20µg fosforo/mL). Cat. 661-9 Sigma Chemical Company".

CÁLCULOS

$$CPK (U.I./L) = \frac{\text{absorvância (T)} - \text{absorvância (BT)}}{\text{absorvância (P)}} \times 130$$

Exemplo:

$$\text{Leituras: (T)} = 0,460$$

$$\text{(BT)} = 0,415$$

$$\text{(P)} = 0,213$$

$$CPK (U.I./L) = \frac{0,460 - 0,415}{0,213} \times 130 = 27,56$$

Como a reação corada segue estritamente a lei de Beer, basta que se determine um **fator (F)** para cálculo dos resultados.

$$\text{Fator (F)} = \frac{130}{\text{absorvância (P)}}$$

$$CPK (U.I./L) = (\text{absorvância T} - \text{absorvância BT}) \times F$$

Para determinação do fator, recomenda-se dosar em triplicata o padrão, ler as absorvâncias e tirar a média aritmética das mesmas.

Exemplo:

Leituras:

$$\text{Teste (T)} = 0,460$$

$$\text{Branco teste (BT)} = 0,415$$

$$\text{Padrão (P)} = 0,212; 0,213; 0,214$$

$$\text{Média aritmética (P)} = \frac{0,212 + 0,213 + 0,214}{3} = 0,213$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{130}{0,213} = 610$$

$$CPK (U.I./L) = (0,460 - 0,415) \times 610 = 27,45$$

Conceito de unidade: uma U.I. de CPK corresponde a 1µmol de fosfocreatina neo-formada por litro de soro em um minuto.

LIMITAÇÕES DO SISTEMA

- Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso. Qualquer alteração poderá levar a resultados errôneos.
- Algumas drogas como: anfotericina B, ampicilina, anticoagulantes, aspirina, furosemida e morfina podem elevar os níveis de CPK.
- Por vezes a leitura do branco teste (**BT**) é superior à do teste (**T**). Nessas condições, considerar o resultado do paciente como sendo 0 U.I./L
- O tempo de 10 minutos, após a adição do reagente de molibdato e solução de Ácido Ascórbico 0,084M, deve ser observado com atenção, pois nesse período se dá a hidrólise da fosfocreatina neo-formada.



CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

- 1.A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos. Não usar detergente à base de fosfato.
- 2.A água utilizada na limpeza do material, no preparo dos reagentes e na dosagem, deve ser de boa qualidade.
- 3.Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, aminas e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
- 4.As pipetagens devem ser precisas.
- 5.O nível da água do banho maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio e a temperatura (37°C), rigorosamente observada.
- 6.O uso de soro controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar um soro controle com valor na faixa de normalidade e outro soro controle de valor elevado.

VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida. Como orientação, sugerimos os seguintes valores:
0 - 30 U.I. /L

SIGNIFICADO CLÍNICO

A creatina fosfotransferase é uma enzima, predominantemente, da musculatura estriada. Aumenta secundariamente no soro, nas patologias que comprometem a musculatura estriada. A CPK é um sensível indicador, com aumentos precoces e elevados, nos casos de infarto do miocárdio e distrofia muscular progressiva.

Atividades aumentadas de CPK são encontradas, ocasionalmente, em patologias do sistema nervoso central, bem como em casos de acidente vascular cerebral. Em pacientes portadores de hipotireoidismo, podem ser detectados níveis elevados de CPK.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 42 testes em amostras cujo teor de CPK situava se no intervalo de 0 - 260 U.I./L. A comparação do kit de Creatina Fosfotransferase Doles (Y) com a metodologia de referência (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 0,87 + 1,06X$, sendo o coeficiente de correlação 0,99.

O acréscimo de enzima a soros com níveis de CPK, oscilando entre 15 e 140 U.I./L, mostrou uma recuperação entre 97,5 e 102%.

O erro da média foi de 3,2%.

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com 2 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (U.I./L)	24,87	140,18
Desvio padrão	0,78	2,02
Coefficiente de variação (%)	3,14	1,44

Reprodutibilidade: foram realizadas 20 dosagens, durante 20 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (U.I./L)	22,09	160,40
Desvio padrão	0,73	2,45
Coefficiente de variação (%)	3,30	1,53

Especificidade: a presente metodologia é específica para determinação de creatina fosfotransferase (CPK), quando dosada em condições ideais de conservação da amostra e do procedimento técnico. A presença de glutatión ativa a CPK, permitindo a obtenção de valores elevados, condizentes com o teor real dessa enzima na amostra.

Sensibilidade: a absorvância encontrada, de 0,002, corresponde a 1 U.I./L de concentração de creatina fosfotransferase (CPK), quando medida em espectrofotômetro a 660nm. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório.

Diluição da matriz: estudos sucessivos de diluição da matriz mostram que existem aumentos significativos da CPK, provavelmente por diluição de fatores inibidores existentes no soro.

Substâncias interferentes: as amostras colhidas com anticoagulantes não devem ser utilizadas, pois esses são inibidores da atividade enzimática.

Resíduos de fosfatos presentes na vidraria interferem decisivamente, levando a reações finais intensamente coradas.

Certas drogas podem alterar os níveis de CPK. Para controle de tal interferência, é recomendado que o paciente seja questionado quanto ao uso de medicamentos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Okinaka, S. e cols.: *A.M.A. Arch Neurol.* 4:520, 1961.
- Doles, J.: *Método simples e direto para dosagem da Creatina Fosfotransferase no soro.* Trabalho apresentado ao VII Congresso Brasileiro de Patologia Clínica de Curitiba, 1972.
- Tibúrcio, H.M.: *Controle interno da qualidade analítica*, 1ªed. março/1995.
- Doles: dados de arquivo.

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - **Código de Defesa do Consumidor**. Todos os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento dos mesmos, se obedecidas as condições abaixo:

- 1.O usuário do sistema seguir, rigorosamente, o procedimento técnico.
- 2.As condições de armazenamento deverão estar de acordo com o estabelecido nas instruções de uso.
- 3.Os materiais necessários e não fornecidos deverão estar em boas condições técnicas.

Todos os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.
CNPJ: 01.085.513/0001-05
Rodovia BR 153, Km 1273, Lt.07, Chácara Retiro
CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil
Caixa Postal 1051
e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810020

Revisão: 15 (09/2009)

NBR ISO 9001

Sistema da Qualidade certificado desde 1999

