

SAS-MX CK VIS-10 Isoenzyme

Instructions For Use

REF 101800

REF 101801 (gel kit only) REF 101802 (reagent kit only)

SAS-MX Isoenzyme CK Vis-10

Fiche technique

REF 101800

REF 101801 (gels uniquement) REF 101802 (réactifs uniquement)

SAS-MX CK Vis-10 Isoenzym

Anleitung

REF 101800

REF 101801 (nur Gel-Kit) REF 101802 (nur Reagenz-Kit)

isoenzimi CK Vis-10 SAS-MX

Istruzioni per l'uso

REF 101800

REF 101801 (solo kit gel) REF 101802 (solo kit reagente)

isoenzimas de la CK SAS-MX Vis-10

Instrucciones de uso

REF 101800

REF 101801 (sólo el kit de gel) REF 101802 (sólo el kit de reactivos)

Contents

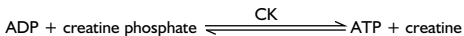
English	1
Français	8
Deutsch	16
Italiano	24
Español	32



INTENDED PURPOSE

The SAS-MX CK Vis-10 Isoenzyme Kit is intended for the separation and quantitation of Creatine Kinase Isoenzymes in serum or plasma by agarose gel electrophoresis.

Creatine phosphokinase (CK) (EC 2.7.3.2.) is an energy transfer enzyme, which catalyses the reversible reaction



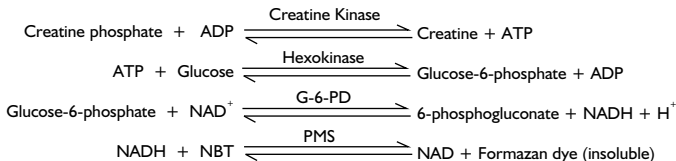
CK exists primarily in skeletal muscle, cardiac muscle and the brain, with small amounts in several other tissues. A number of diverse clinical episodes such as surgical procedures, intramuscular injections and myocardial infarct induce increased CK activity in the serum^{2,3}. The source of elevated CK activity may be narrowed by isoenzyme assessment. There are two molecular CK subunits, designated M and B, the combinations of which produce three isoenzymes. CK-MM (isolated primarily from skeletal muscle), CK-MB (myocardium) and CK-BB (primarily from the brain).

CK isoenzyme analysis is one of the most important procedures used in the early detection of myocardial damage⁴. After an acute myocardial infarction (MI), CK-MB appears in the serum in approximately 4 to 6 hours, reaches peak activity at 18-24 hours, and may disappear completely within 72 hours. Within the first 48 hours after MI, CK-MB is present in 100% of the patients with MI, as well as in some cases of severe coronary insufficiency^{1,3,5}.

The most definitive laboratory testing in the diagnosis of MI is accomplished by performing studies of CK isoenzyme in conjunction with lactate dehydrogenase (LD) isoenzymes^{3,5,6}. The specificity and sensitivity achieved with these two tests has eliminated the necessity for additional enzyme studies in accurately diagnosing MI⁷. The most important consideration in the interpretation of CK and LD isoenzyme patterns is the detection of the characteristic change of pattern of multiple examinations (the relatively fast appearance and disappearance of CK-MB and the flip of LD1 over LD2)^{1,3,9}. Persistent elevation in CK-MB is not indicative of myocardial infarct. CK-MB may be useful in diagnosing a small infarct in which total CK never exceeds the upper limit of normal¹⁰.

CK produced by myocardium is only 25-40% CK-MB, the remainder being CK-MM. Therefore, an elevation in CK due to myocardial infarction produces not only a rise in CK-MB but in CK-MM as well. The isoenzymes of CK have been assessed by various methods^{11,20}. Electrophoresis offers the distinct advantage of complete separation of the isoenzymes without risk of carryover³.

The isoenzymes of CK are separated according to their electrophoretic mobility on an agarose gel, followed by incubation with a reagent which visualizes the CK isoenzymes according to the following reaction sequence:



The patterns may be qualitatively examined or the patterns may be quantitated by densitometry.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

All reagents are for in-vitro diagnostic use only. Do not ingest or pipette by mouth any kit component. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheet for risk and safety phrases and disposal information.

COMPOSITION

1. SAS-MX CK Isoenzyme Gel (x10)

Contains agarose in a AMP buffer with sodium azide as preservative. The gel is ready for use as packaged.

2. SAS-MX CK Isoenzyme Buffer (1x 100ml)

Contains MOPSO buffer pH 7.6 - 8.0. Dilute the contents of the bottle to 1 litre with purified water.

3. CK Isoenzyme Reagent (10x 1ml)

Contains those components required for the identification of creatine kinase isoenzymes according to the reaction sequence shown above. See STEP-BY-STEP PROCEDURE for reconstitution instructions.

4. CK Isoenzyme Diluent (1x 10.5ml)

Contains MES, sucrose and sodium azide as preservative. The diluent is ready for use as packaged.

5. CK Isoenzyme Chromogen (1x 1ml)

Contains tetranitro blue tetrazolium (TNBT) and dimethylformamide (DMF). The chromogen is ready for use as packaged.

6. CK Isoenzyme Activator (1x 1ml)

Contains 2-Mercaptoethanol in water. The activator is ready for use as packaged.

7. Other Kit Components

Each kit contains Instructions For Use and sufficient Sample Application Templates (Template 2 = 10 x 8 sample, Template 4 = 10 x 10 sample), and Blotters A and D to complete 10 gels.

STORAGE AND SHELF-LIFE

1. SAS-MX CK Isoenzyme Gel

Gels should be stored at 15...30°C and are stable until the expiry date indicated on the package. DO NOT REFRIGERATE OR FREEZE. Deterioration of the gel may be indicated by 1) crystalline appearance indicating the gel has been frozen, 2) cracking and peeling indicating drying of the gel or 3) visible contamination of the agarose from bacterial or fungal sources.

2. SAS-MX CK Isoenzyme Buffer

The buffer concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted buffer is stable for 2 months at 15...30°C.

3. CK Isoenzyme Reagent

The reagent vials should be stored at 2...6°C and is stable until the expiry date indicated on the label.

4. CK Isoenzyme Diluent

The diluent should be stored at 2...6°C and is stable until the expiry date indicated on the label.

5. CK Isoenzyme Chromogen

The chromogen should be stored at 2...6°C and is stable until the expiry date indicated on the label.

6. CK Isoenzyme Activator

The activator should be stored at 2...6°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Avoid contamination.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 4063 SAS-MX Chamber

Cat. No. 1525 EPS600 Power Supply

Cat. No. 4062 Incubation Chamber

Drying Oven with forced air capable of 60...70°C

Incubator capable of 45°C

Glass Plate

Destain Solution: Mix 100ml of glacial acetic acid and 900ml of purified water. Store in a tightly stoppered bottle.

Purified water

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Fresh serum is the specimen of choice. Samples should be tested as soon as possible after collection. If required, samples can be stored refrigerated at 2...6°C for up to 48 hours²³ or frozen at -20°C for up to 2 weeks²³. Allow to thaw at room temperature.

Sample Collection: Proper timing of sample collection is critical for the accurate interpretation of CK Isoenzyme patterns in the assessment of myocardial infarction (MI). A minimum of 4 samples should be collected - one on admission, followed by samples every 8-12 hours for a minimum of 36 hours.

Interfering factors:

- 1) Whilst red cells contain no CK activity, the products of haemolysis can interfere with the reaction sequence for the enzyme, so haemolysed samples are not recommended for use²¹.
- 2) Repeated freezing and thawing of samples destroys CK activity.
- 3) Certain drugs can affect CK isoenzyme activity²².
- 4) CK is inactivated by heat²¹.
- 5) In some samples, albumin may produce a visible band between MB and BB band regions.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. To every 100µl of patient sample or control add 1µl of CK Isoenzyme Activator and incubate at 15...30°C for 10 minutes before use.
2. Remove the gel from the packaging and place on a paper towel. Blot the gel surface at the application point, (between the '-' marks at the edges of the gel) with a blotter A, discard the blotter. **NOTE:** From the time the gel is taken out of the plastic shell, no more than 5-7 minutes should elapse before electrophoresis is started.
3. Align the sample application template (either 8 sample or 10 sample according to preference) with the '-' marks at the edge of the gel. Place a blotter A on top of the template and rub a finger across the slits to ensure good contact. Remove the blotter and retain for use in step 6.
4. Apply 1µl of sample to each slit and allow to absorb for 4 minutes.
5. Whilst the samples are absorbing, pour 45ml of buffer into each inner section of the SAS-MX Chamber.
6. Following sample absorption, blot the template with the blotter A retained from Step 3 and remove both blotter and template.
7. Position the gel in the chamber agarose side down, aligning the positive (+) and the negative (-) sides with the corresponding positions on the chamber.
8. Electrophorese the gel: 100 volts, 20 minutes.
9. Whilst the samples are electrophoresing, place a blotter D moistened with water into the incubation chamber and place in the incubator set at 45°C to equilibrate.

10. Approximately 3-4 minutes before the end of electrophoresis, reconstitute 1 vial of CK Isoenzyme Reagent by adding 1 ml of CK Isoenzyme Diluent and 70 μ l of CK Isoenzyme Chromogen and mix well. Do not vortex.
11. Following electrophoresis, place the gel agarose side up on the glass plate. Pour the contents of the CK Isoenzyme Reagent vial along the anode (+) side of the gel.
12. Using a serological pipette, spread the reagent from the anode edge to the cathode (-) edge of the gel. Wait 15 seconds and spread the reagent from cathode to anode edge. Wait 15 seconds and roll the excess off the gel.
13. Remove the gel from the glass plate and place in the incubation chamber. Incubate the gel: 30 minutes, 45°C.
14. Immerse the gel in destain solution for 10 minutes.
15. Wash the gel in purified water and dry at 60...70°C.

INTERPRETATION OF RESULTS

It is recommended that any evaluation of the gels is performed against normal values which have been produced for this test in each individual laboratory. Completed gels should be stored in the dark at all times.

Qualitative Evaluation: The SAS-MX CK Isoenzyme gel can be visually inspected for the presence or absence of bands of interest.

Quantitative Evaluation: Scan the gels at 590nm within 1 hour of completion.

CK-BB is the fastest moving, most anodic band and CK-MM is the slowest moving most cathodic band. CK-MB migrates intermediate to CK-MM and CK-BB¹. A number of atypical CK bands have been reported. Atypical bands migrating between CK-MB have been attributed to CK-BB complexed to IgG and CK-MM complexed to lipoprotein as well as others without positive identification. Mitochondrial CK migrates cathodally to CK-MM and a band designated -macro- CK isolated from a cancer patient also migrated cathodally to CK-MM.

CK-MM

Often the only isoenzyme of CK found in normal serum¹.

Elevated in skeletal muscle injury, myocardial injury or brain injury^{1,3}.

CK-MB

May be present in serum from normal subjects in the amount of 0-4%²⁴. Small amounts of CK-MB activity have been interpreted as an alert to possible myocardial infarct and should be followed by serial CK and LDH Isoenzyme studies.

Positive indication of myocardial infarct when the following criteria are met: The proper clinical setting², CK-MB activity >5% of the total CK activity and a minimum of 10IU/L^{1,15,25}, CK-MB shows the characteristic change in pattern (relatively rapid appearance and disappearance)^{1,3,9}.

Positive identification of second myocardial infarct: after the first MI the CK-MB increases after starting to decline. The total CK may not show an increase after starting to decline.

Values following open heart surgery³ - CK and LD isoenzymes are less specific following open heart surgery than in most diagnostic situations. The CK-MB will be elevated due to myocardial damage from the operative procedure as well as trauma to the heart from manipulation and cannulation. The LD is flipped secondary to haemolysis from extracorporeal circulation. Infarct patients have higher levels of CK-MB activity, but the wide range of isoenzyme activity seen in non-MI patients overlaps that noted

in patients with MI, making complete discrimination impossible. Despite this difficulty, accuracy in diagnosing MI can be increased by doing serial determinations of CK-MB in the post-operative period and monitoring the trends. Peri-operative infarct patients will usually have a progressive rise in CK-MB levels, while non-MI patients exhibit a more rapid decrease in CK-MB post-operative^{2,26}. Elevation in diseases other than MI: Severe coronary insufficiency, Duchenne's muscular dystrophy, Rocky Mountain Spotted Fever, Rhabdomyolysis, Dermatomyositis, Myoglobinuria, Polymyositis, Reye's Syndrome.

CK-BB

Often seen in the serum of patients with prostatic carcinoma and occasionally in the serum of patients with other carcinomas and malignant tumours¹ (See LIMITATIONS). Rarely seen in the serum of patients with brain injury due to damage to the blood-brain barrier^{1,27}. Occasionally seen in the serum of patients with severe shock syndrome (probably due to lung or small bowel involvement). Occasionally seen in the serum of patients with chronic renal failure, women in labour¹.

A number of atypical CK bands have been reported. Atypical bands migrating between CK-MB and CK-MM have been attributed to CK-BB complexed to IgG^{28,29} and CK-MM complexed to lipoprotein³⁰, as well as others without positive identification³¹⁻³³. Mitochondrial CK migrates cathodal to CK-MM³⁴, and a band designated 'macro' CK, isolated from a cancer patient also migrated cathodal to CK-MM³⁵.

QUALITY CONTROL

The CK/LD Control (Cat.No.5134) can be used to verify all phases of the procedure and should be used on each plate run. Refer to the package insert provided for acceptable assay values.

LIMITATIONS

The SAS-MX CK Isoenzyme procedure is not designed to identify tumour markers.

REFERENCE VALUES

Normal range studies performed using apparently healthy male and female volunteers gave the following results:

CK-MM = 100%

CK-MB = 0%

CK-BB = 0%

PERFORMANCE CHARACTERISTICS**Linearity**

The method gives a linear response to CK activities up to 1300 IU/L per band.

Sensitivity

The method is sensitive to 8 IU/L per band.

Reproducibility

	Within Gel (n=8)		Between Gel (n=4)	
	Mean (%)	CV (%)	Mean (%)	CV (%)
CK-MM	76.5	0.5	76.4	0.8
CK-MB	11.1	1.8	11.2	4.5
CB-BB	12.5	2.7	12.5	2.5

BIBLIOGRAPHY

1. Brish, L.K., 'CK & LD Isoenzyme. A Self-Instructional Text', Am. Soc. Of Clin. Path. Press, Chicago, 1984 : 30-47.
2. Wolf, P.L., Griffiths, J.C and Koett, J.W., 'Interpretation of Electrophoretic Patterns of Proteins and Isoenzymes', Mason Publishers, New York, 1981 : 60.
3. Tietz, N.W., Ed. 'Textbook of Clinical Chemistry', W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1986 : 678-700.
4. Galen, R.S., 'The Enzyme Diagnosis of Myocardial Infarction', Human Path., 1975; 6(2): 141-155.
5. Wagner, G.S., Roe, C.R., Limbird, L.E., Rosati, R.A. and Wallace, A.G., 'The Importance of Identification of the Myocardial-Specific Isoenzyme of Creatine Phosphokinase (MB Form) in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', Circulation, 1973; 47: 263-269.
6. Marmor, A. and Alpan, G., 'Specificity of Creatine Kinase MB Isoenzyme for Myocardial Injury', Clin. Chem., 1978; 24(12): 2206.
7. Galen, R.S., Reiffel, J.A. and Gambino, S.R., 'Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', J. Am. Med. Assoc., 1975; 232(2): 145-147.
8. Frolich, J., Brosseuk, A., Grant, A. and McLennan, M., 'Study of the Value of CPK and LDH Isoenzyme Determinations in the Differential Diagnosis of Ischemic Chest Pain', Clin. Biochem., 1978; 11(6): 232-234.
9. Yasmineh, W.G., Pyle, R.B, Cohn, J.N., Nicoloff, D.M., Hanson, N.Q. and Steele, B.W., 'Serial Serum Creatine Phosphokinase MB Isoenzyme Activity After Myocardial Infarction', Circulation, 1977; 55(5): 733-737.
10. D'Souza, J.P., Sine, H.E., Horvitz, R.A., Kubasik, N.P., Brody, B.B. and Barold, S.S., 'The Significance of the MB Isoenzyme in Patients with Acute Cardiovascular Disease with a Normal or Borderline Total CPK Activity', Clin. Biochem., 1978; 11(5): 204-209.
11. Mercer, D.W., 'Separation of Tissue and Serum Creatine Kinase Isoenzymes by Ion-Exchange Column Chromatography', Clin. Chem., 1974; 20(1): 36-40.
12. Rao, P.S., Lukes, J.J., Ayres, S.M. and Mueller, H., 'New manual and Automated Method for Determining Activity of Creatine Kinase Isoenzyme MB, by Use of Dithiothreitol: Clinical Applications', Clin. Chem., 1975; 21(11): 1612-1618.
13. Jockers-Wretou, E. and Pfeleiderer, G., 'Quantitation of Creatine Kinase Isoenzymes in Human Tissues and Sera by an Immunological Method', Clin. Chim. Acta, 1975; 58: 223-232.
14. Roberts, R., Sobel, B.E. and Parker, C.W., 'Radioimmunoassay for Creatine Kinase Isoenzymes', Science, 1976; 194: 855-857.
15. Van Der Veen, K.J. and Willebrands, A.F., 'Isoenzymes of Creatine Phosphokinase in Tissue Extracts and in Normal and Pathological Sera', Clin. Chim. Acta, 1966; 13: 312-316.
16. Wong, R. and Swallen, T.O., 'Cellulose Acetate Electrophoresis of Creatine Phosphokinase Isoenzymes in the Diagnosis of Myocardial Infarction', Am. J. Clin. Pathol., 1975; 64: 209-216.
17. Burger, A., Richterich, R. und Aebi, H., 'Die Heterogenitat der Kreatin-Kinase', Biochemische Zeitschrift, 1964; 339: 305-314.
18. Deul, D.H. and van Breeman, J.F.L., 'Electrophoresis of Creatine Phosphokinase from Various Organs', Clin. Chim. Acta, 1964; 10: 276-283.
19. Rosalki, S.B., 'Creatine Phosphokinase Isoenzymes', Nature, 1965; 207: 414.
20. Trainer, T.D. and Gruenig, D., 'A Rapid Method for the Analysis of Creatine Phosphokinase Isoenzymes', Clin. Chim. Acta, 1968; 21: 151-154.
21. Henry, R.J. and Cannon, D.C., Ed's, 'Clinical Chemistry Principles and Techniques', 2nd Edition, Harper and Row, New York, 1974: 901-903.

22. Young, D.S. , 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3rd Edition, AACC Press, Washington D.C., 1990.
23. Cho, H.W. and Meltzer, H.Y., 'Factors Affecting Stability of Isoenzymes of Creatine Phosphokinase', *Am. J. Clin. Pathol.*, 1979; 71(1): 75-82.
24. Marmor, A., Alpan, G., Keidar, S., Grenadier, E. and Palant, A., 'The MB Isoenzyme of Creatine Kinase as an Indicator of Severity of Myocardial Ischaemia', *Lancet*, 1978; Oct 14: 812-814.
25. Galen, R.S., Personal Communication, June 1980.
26. Galen, R.S., 'Diagnostic Tests in Cardiac and Non-Cardiac Disorders' *Diag. Med.*, 1978 Feb., 74-87.
27. Bayer, P.M., Gabl, F., Granditsch, G., Widhalm, K., Zyman, H. and Deutsch, E., 'Creatine Kinase Isoenzymes in Cerebral Fluid in a Case of Brain Damage', *Clin. Chem.*, 1976; 22(8): 1405-1407.
28. Stein, W. and Bohner, 'Immunoglobulin-Bound Creatine Kinase BB ("Macro CK") in Three Patients with Different Diseases', *Clin. Chem.*, 1979; 25(8): 1513-1514.
29. Pudek, M.R., Jacobson, B.E., Urquhart, N. and Rabkin, S.W., 'Effect of Macro Creatine Kinase BB on Results of Different Creatine Kinase Isoenzyme Methods', *Clin. Chem.*, 1982; 28(6): 1400.
30. Velletri, K., Griffiths, W.C. and Diamond, I., 'Abnormal Electrophoretic Mobility of a Creatine Kinase MM Isoenzyme', *Clin. Chem.*, 1975; 21(12): 1837-1838.
31. Sax, S.M., Moore, J.J., Giegel, J.L. and Welsh, M., 'Atypical Increase in Serum Creatine Kinase Activity in Hospital Patients', *Clin. Chem.*, 1976; 22(1): 87-91.
32. Ljungdahl, L. and Gerhardt, W., 'Creatine Kinase Isoenzyme Variants in Human Serum', *Clin. Chem.*, 1978; 24(5): 832-834.
33. Lott, J.A. and Heinz, J.W., 'A Stable, Unusual Isoenzyme of Creatine Kinase Observed in a Case of Acute Anoxia', *Clin. Chem.*, 1978; 24(6): 1047.
34. James, G.P. and Harrison, R.L., 'Creatine Kinase Isoenzymes of Mitochondrial Origin in Human Serum', *Clin. Chem.*, 1979; 25(6): 943-947.
35. Yuu, Hoyuo, et al., *Clin. Chem.*, 1978; 24(11): 2054-2057.

UTILISATION

Le kit SAS-MX Isoenzyme CK Vis-10 est destiné à la séparation et la quantification des isoenzymes de la créatine kinase du sérum ou du plasma par électrophorèse en gel d'agarose. La créatine phosphokinase (CK) (EC 2.7.3.2.) est une enzyme de transfert d'énergie qui catalyse la réaction réversible suivante:



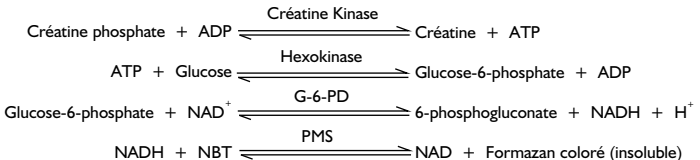
La CK se trouve principalement dans les muscles squelettiques, les muscles cardiaques et le cerveau, et, en moindre quantité, dans plusieurs autres tissus¹. Certaines situations cliniques, comme les opérations chirurgicales, les injections intramusculaires et un infarctus du myocarde, entraînent une augmentation de l'activité CK dans le sérum^{2,3}. Il est possible de préciser la source de l'activité CK élevée grâce à une détermination des isoenzymes. La CK contient deux sous-unités moléculaires, appelées M et B, dont la combinaison donne lieu à trois isoenzymes: CK-MM (présente principalement dans les muscles squelettiques), CK-MB (myocarde) et CK-BB (principalement dans le cerveau)³.

L'analyse des isoenzymes de la CK est l'une des démarches les plus importantes utilisées dans la détection précoce des lésions du myocarde⁴. Suite à un infarctus aigu du myocarde (IDM), la CK-MB apparaît dans le sérum entre 4 et 6 heures après, atteint son activité maximale 18-24 heures après et peut disparaître complètement dans les 72 heures. Dans les 48 heures suivant un IDM, la CK-MB est présente chez 100% des patients ayant un IDM ainsi que dans certains cas d'insuffisance coronarienne sévère^{1,3,5}.

L'étude conjointe des isoenzymes de la créatine kinase (CK) et de celles de la lactate déshydrogénase (LDH) constitue l'analyse de référence pour le diagnostic d'IDM^{3,5,8}. La spécificité et la sensibilité offertes par ces deux dosages ont rendu inutile toute analyse d'autres enzymes pour obtenir un diagnostic d'IDM exact⁷. L'essentiel est d'analyser l'évolution dans le temps des types d'isoenzymes de la CK et de la LDH présentes (apparition et disparition relativement rapide de la CK-MB et existence d'un taux de LDH-I supérieur à celui de LDH-2)^{1,3,9}. Une élévation continue de la CK-MB n'indique pas un infarctus du myocarde. La CK-MB est utile pour diagnostiquer un petit infarctus dans lequel la CK totale ne dépasse jamais la limite supérieure de la normale¹⁰.

La CK produite par le myocarde est à 25-40% de la CK-MB, le reste étant de la CK-MM. Par conséquent, une élévation de la CK due à un infarctus du myocarde se traduit par une augmentation non seulement de la CK-MB et mais aussi de la CK-MM. Plusieurs méthodes permettent de doser les isoenzymes de la CK^{11,20}. L'électrophorèse a l'avantage d'offrir une séparation complète des isoenzymes sans aucun risque de contamination³.

Les isoenzymes de la CK sont séparées suivant leur mobilité électrophorétique sur un gel d'agarose et sont ensuite incubées avec un réactif qui les met en évidence conformément à la série de réactions suivante:



Il est alors possible de réaliser une évaluation qualitative et quantitative (par densitométrie) des types d'isoenzymes.

PRÉCAUTIONS

Tous les réactifs sont à usage diagnostique in-vitro uniquement. Ne pas ingérer ou pipeter à la bouche aucun composant. Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination.

COMPOSITION

1. Plaque SAS-MX Isoenzyme CK (x10)

Contient de l'agarose dans un tampon AMP additionné d'azide de sodium comme conservateur. Le gel est prêt à l'emploi.

2. Tampon SAS-MX Isoenzyme CK (1x 100ml)

Contient un tampon MOPSO, pH 7,6 – 8,0. Diluer le contenu du flacon dans 1 litre d'eau distillée.

3. Réactif Isoenzyme CK (10x 1ml)

Contient les composants nécessaires pour identifier les isoenzymes de la créatine kinase conformément à la série de réactions indiquée auparavant. La section MÉTHODOLOGIE fournit les instructions nécessaires à la reconstitution.

4. Diluant Isoenzyme CK (1x 10.5ml)

Contient du MES, du saccharose et de l'azide de sodium comme conservateur. Le diluant est prêt à l'emploi.

5. Chromogène Isoenzyme CK (1x 1ml)

Contient du nitrobleu de tétrazolium (NBT) et du diméthylformamide (DMF). La chromogène est prêt à l'emploi.

6. Activateur Isoenzyme CK (1x 1ml)

Contient du 2-mercaptoéthanol en solution. L'activateur est prêt à l'emploi.

7. Autres composants du kit

Chaque kit contient également une fiche technique, des masques applicateurs échantillons (Template 2 = 10 X 8 échantillons, Template 4 = 10 x 10 échantillons) et des buvards A et D pour 10 gels.

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. Plaque SAS-MX Isoenzyme CK

Les gels doivent être conservés entre 15...30°C; ils sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. **NE PAS RÉFRIGÉRER OU CONGELER.** Les conditions suivantes indiquent une détérioration du gel: 1) des cristaux visibles indiquant que le gel a été congelé, 2) des craquelures indiquant une déshydratation du gel, 3) une contamination visible, bactérienne ou fongique.

2. Tampon SAS-MX Isoenzyme CK

Le tampon concentré doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après reconstitution, le tampon est stable 2 mois entre 15...30°C.

3. Réactif Isoenzyme CK

Les flacons de réactif doivent être conservés entre 2...6°C; ils sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

4. Diluant Isoenzyme CK

Le diluant doit être conservé entre 2...6°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

5. Chromogène Isoenzyme CK

Le chromogène doit être conservé entre 2...6°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

6. Activateur Isoenzyme CK

L'activateur doit être conservé entre 2...6°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Éviter toute contamination.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 4063 Chambre de migration SAS-MX

Réf. 1525 Générateur EPS600

Réf. 4062 Chambre d'incubation

Étuve de séchage à convection forcée offrant une température entre 60...70°C

Incubateur offrant une température de 45°C

Plaqué de verre

Solution décolorante : Mélanger 100ml d'acide acétique glacial avec 900ml d'eau distillée. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

Eau distillée

PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS

L'utilisation de sérums fraîchement prélevés est fortement recommandée. Les échantillons doivent être analysés le plus rapidement possible après le prélèvement. En cas de besoin, il est possible de conserver les échantillons 48 heures entre 2...6°C²³ ou de les congeler 2 semaines maximum à -20°C²³. Décongeler à température ambiante.

Prélèvement de l'échantillon: il est essentiel que le prélèvement des échantillons soit correctement planifié afin de bien interpréter les types d'isoenzymes de la CK lors du diagnostic d'IDM. Au moins 4 échantillons doivent être prélevés: le premier à l'admission, ensuite un prélèvement toutes les 8-12 heures pendant au moins 36 heures.

Facteurs interférents:

- 1) Bien que les hématies ne contiennent pas d'activité CK, les produits de l'hémolyse peuvent interférer avec les réactions ayant lieu avec l'enzyme, si bien qu'il est recommandé de ne pas utiliser d'échantillons hémolysés²¹.
- 2) Les cycles répétés de congélation et de décongélation des échantillons détruisent l'activité CK.
- 3) Certains médicaments peuvent altérer l'activité des isoenzymes de la CK²¹.
- 4) La CK est inactivée par la chaleur²¹.
- 5) Il est possible que l'albumine laisse une bande visible entre les zones MB et BB sur certains échantillons.

MÉTHODOLOGIE

1. Pour 100 μ l d'échantillon patient ou de contrôle, ajouter 1 μ l d'activateur Isoenzyme CK et incuber 10 minutes entre 15...30°C avant utilisation.
2. Sortir le gel de son emballage et le déposer sur un papier absorbant. Sécher la surface du gel au niveau du point de dépôt (entre les repères latéraux '-' du gel) à l'aide d'un buvard A, jeter le buvard. **REMARQUE:** Il ne doit pas s'écouler plus de 5-7 minutes entre le moment où le gel est enlevé de son emballage en plastique et le démarrage de l'électrophorèse.
3. Disposer le masque applicateur échantillon (masque pour 8 ou 10 échantillons au choix) en faisant correspondre les repères '-' avec les deux fentes latérales. Placer un buvard A sur le masque et passer délicatement le doigt sur les fentes afin d'assurer un contact optimal. Retirer le buvard A et le conserver pour l'étape 6.
4. Déposer 1 μ l d'échantillon sur chaque fente et laisser absorber 4 minutes.
5. Pendant ce temps, verser 45ml de tampon dans chaque compartiment intérieur de la chambre de migration SAS-MX.
6. Une fois l'absorption de l'échantillon terminée, sécher le masque applicateur avec le buvard A conservé à l'étape 3 puis enlever le buvard et le masque applicateur.
7. Placer le gel, agarose vers le bas, dans la chambre de migration, en respectant les polarités.
8. Faire migrer à 100 volts pendant 20 minutes.
9. Pendant que la migration a lieu, placer un buvard D humidifié avec de l'eau dans la chambre d'incubation et la régler à 45°C pour qu'elle s'équilibre.
10. Environ 3-4 minutes avant la fin de l'électrophorèse, reconstituer 1 flacon de réactif Isoenzyme CK en ajoutant 1 ml de diluant Isoenzyme CK et 70 μ l de chromogène Isoenzyme CK et bien mélanger. Ne pas vortexer.
11. Une fois l'électrophorèse terminée, placer le gel, agarose vers le haut, sur la plaque de verre. Verser le contenu du flacon de réactif Isoenzyme CK du côté anodique (+) du gel.
12. À l'aide d'une pipette sérologique, étaler le réactif depuis le côté anodique jusqu'au côté cathodique (-) du gel. Attendre 15 secondes puis étaler le réactif de la cathode vers l'anode. Attendre 15 secondes puis enlever l'excès.
13. Retirer le gel de la plaque de verre et le placer dans la chambre d'incubation. Incuber le gel pendant 30 minutes à 45°C.
14. Plonger le gel dans la solution décolorante pendant 10 minutes.
15. Rincer le gel avec de l'eau distillée et sécher entre 60...70°C.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Il est recommandé de réaliser chaque évaluation en comparant les gels à un modèle normal obtenu dans les mêmes conditions pour chaque laboratoire. Les gels terminés doivent toujours être conservés à l'abri de la lumière.

Évaluation qualitative: Une inspection visuelle du gel SAS-MX Isoenzyme CK permet de déterminer si les bandes des isoenzymes sont présentes ou non.

Évaluation quantitative: Lire le gel à 590 nm dans l'heure suivant la fin du processus.

La CK-BB migre le plus rapidement (zone anodique) et la CK-MM le plus lentement (zone cathodique). La CK-MB migre entre la CK-MM et la CK-BB^{1,3}. Diverses bandes de CK atypique ont été signalées. Les bandes atypiques migrant entre la CK-MB et la CK-MM sont attribuées à de la CK-BB complexée à de l'IgG, de la CK-MM complexée à des lipoprotéines et à d'autres non identifiées. La CK mitochondriale migre du côté cathodique dans la zone CK-MM et la bande appelée macro-CK, isolée chez les patients atteints de cancer, migre aussi du côté cathodique dans la zone CK-MM.

CK-MM

Il s'agit souvent de la seule isoenzyme de la CK trouvée dans le sérum normal¹. Élevée en cas de lésion des muscles squelettiques, du myocarde ou du cerveau^{1,3}.

CK-MB

La quantité présente dans le sérum des sujets normaux est de 0-4%²⁴. De petites quantités d'activité CK-MB sont interprétées comme un signe d'un infarctus du myocarde potentiel et doivent être suivies d'autres analyses des isoenzymes de la CK et de la LDH.

Voici les critères vous indiquant que vous êtes face à un infarctus du myocarde: tableau clinique correspondant², activité CK-MB >5% de l'activité CK totale et un minimum de 10 UI/L^{1,15,25}, variation caractéristique de la CK-MB (apparition et disparition relativement rapides)^{1,3,9}.

Identification formelle d'un deuxième infarctus du myocarde : suite au premier IDM, la CK-MB augmente après avoir commencé à diminuer. La CK peut ne présenter aucune augmentation après avoir commencé à diminuer.

Valeurs obtenues après une opération à cœur ouvert³ : les isoenzymes de la CK et de la LDH sont moins spécifiques suite à une opération à cœur ouvert que dans la plupart des situations diagnostiques. La CK-MB est élevée en raison des lésions du myocarde issue de l'opération et du trauma lié à la manipulation et à la canulation du cœur. Le rapport des LDH est inversé suite à l'hémolyse due à la circulation extracorporelle. Les patients souffrant d'un infarctus ont des taux d'activité CK-MB plus élevés, mais la large plage d'activité des isoenzymes trouvée chez les patients n'ayant pas d'IDM chevauche celle des patients ayant un IDM, ce qui fait qu'il est impossible d'avoir une différenciation totale. Malgré cette difficulté, il est possible d'augmenter la précision du diagnostic d'IDM en réalisant une série de dosages de la CK-MB en période post-opératoire et en surveillant les tendances. Les patients souffrant d'un infarctus péri-opératoire montrent une augmentation progressive du taux de CK-MB alors que celui des patients sans IDM diminue plus rapidement en phase post-opératoire^{2,26}.

Augmentation en cas de maladies autres qu'un IDM: insuffisance coronarienne sévère, dystrophie musculaire de Duchenne, fièvre pourprée des montagnes Rocheuses, rhabdomyolyse, dermatomyosite, myoglobulinurie, polymyosite, syndrome de Reye.

CK-BB

Souvent trouvée dans le sérum des patients souffrant de cancer de la prostate et parfois dans le sérum des patients ayant d'autres types de cancers ou des tumeurs malignes¹ (cf. LIMITES).

Rarement trouvée dans le sérum des patients souffrant de traumatisme cérébral en raison des lésions de la barrière hémato-encéphalique^{1,27}.

Très rarement trouvée dans le sérum des patients en état de choc grave (probablement à cause des poumons ou de l'intestin grêle).

Très rarement trouvée dans le sérum de patients souffrant d'insuffisance rénale chronique, chez les femmes actives¹.

Diverses bandes de CK atypique ont été signalées. Les bandes atypiques migrant entre la CK-MB et la CK-MM sont attribuées à de la CK-BB complexée à de l'IgG^{28,29}, de la CK-MM complexée à des lipoprotéines³⁰ et à d'autres non identifiées³¹⁻³³. La CK mitochondriale migre du côté cathodique dans la zone CK-MM³⁴ et la bande appelée macro-CK, isolée chez les patients atteints de cancer, migre aussi du côté cathodique dans la zone CK-MM³⁵.

CONTRÔLE QUALITÉ

Le contrôle CK/LDH (Réf. 5134) peut être utilisé afin de vérifier toutes les phases de la méthode et doit être déposé sur chaque plaque. La notice jointe indique les valeurs acceptables du dosage.

LIMITES

La méthode SAS-MX Isoenzyme CK n'est pas conçue pour identifier des marqueurs tumoraux.

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Des analyses réalisées sur des volontaires apparemment sains, hommes et femmes, ont donné les résultats suivants :

CK-MM = 100%

CK-MB = 0%

CK-BB = 0%

PERFORMANCES

Linéarité

La méthode offre une réponse linéaire pour l'activité CK jusqu'à 1300 UI/L par bande.

Sensibilité

La méthode est sensible à partir de 8 UI/L par bande.

Reproductibilité

	Intra-plaque (n=8)		Inter-plaque (n=4)	
	Moyenne (%)	CV(%)	Moyenne(%)	CV(%)
CK-MM	76,5	0,5	76,4	0,8
CK-MB	11,1	1,8	11,2	4,5
CB-BB	12,5	2,7	12,5	2,5

BIBLIOGRAPHIE

1. Brish, L. K., 'CK & LD Isoenzyme. A Self-Instructional Text', Am. Soc. Of Clin. Path. Press, Chicago, 1984 : 30-47.
2. Wolf, P. L., Griffiths, J. C et Koett, J. W., 'Interpretation of Electrophoretic Patterns of Proteins and Isoenzymes', Mason Publishers, New York, 1981 : 60.
3. Tietz, N.W. (éd.), Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphie, 1986 : 678-700.
4. Galen, R. S., 'The Enzyme Diagnosis of Myocardial Infarction', Human Path., 1975 ; 6(2) : 141-155.
5. Wagner, G. S., Roe, C. R., Limbird, L. E., Rosati, R. A. et Wallace, A. G., 'The Importance of Identification of the Myocardial-Specific Isoenzyme of Creatine Phosphokinase (MB Form) in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', Circulation, 1973 ; 47 : 263-269.

6. Marmor, A. et Alpan, G., 'Specificity of Creatine Kinase MB Isoenzyme for Myocardial Injury', *Clin. Chem.*, 1978 ; 24(12) : 2206.
7. Galen, R. S., Reiffel, J. A. et Gambino, S. R., 'Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', *J. Am. Med. Assoc.*, 1975 ; 232(2) : 145-147.
8. Frolich, J., Brosseuk, A., Grant, A. et McLennan, M., 'Study of the Value of CPK and LDH Isoenzyme Determinations in the Differential Diagnosis of Ischemic Chest Pain', *Clin. Biochem.*, 1978 ; 11(6) : 232-234.
9. Yasmineh, W. G., Pyle, R. B., Cohn, J. N., Nicoloff, D. M., Hanson, N. Q. et Steele, B. W., 'Serial Serum Creatine Phosphokinase MB Isoenzyme Activity After Myocardial Infarction', *Circulation*, 1977 ; 55(5) : 733-737.
10. D'Souza, J. P., Sine, H. E., Horvitz, R. A., Kubasik, N. P., Brody, B. B. et Barold, S. S., 'The Significance of the MB Isoenzyme in Patients with Acute Cardiovascular Disease with a Normal or Borderline Total CPK Activity', *Clin. Biochem.*, 1978 ; 11(5) : 204-209.
11. Mercer, D. W., 'Separation of Tissue and Serum Creatine Kinase Isoenzymes by Ion-Exchange Column Chromatography', *Clin. Chem.*, 1974 ; 20(1) : 36-40.
12. Rao, P. S., Lukes, J. J., Ayres, S. M. et Mueller, H., 'New manual and Automated Method for Determining Activity of Creatine Kinase Isoenzyme MB, by Use of Dithiothreitol: Clinical Applications', *Clin. Chem.*, 1975 ; 21(11) : 1612-1618.
13. Jockers-Wretou, E. et Pfeleiderer, G., 'Quantitation of Creatine Kinase Isoenzymes in Human Tissues and Sera by an Immunological Method', *Clin. Chim. Acta*, 1975 ; 58 : 223-232.
14. Roberts, R., Sobel, B. E. et Parker, C. W., 'Radioimmunoassay for Creatine Kinase Isoenzymes', *Science*, 1976 ; 194 : 855-857.
15. Van Der Veen, K. J. et Willebrands, A. F., 'Isoenzymes of Creatine Phosphokinase in Tissue Extracts and in Normal and Pathological Sera', *Clin. Chim. Acta*, 1966 ; 13 : 312-316.
16. Wong, R. et Swallen, T. O., 'Cellulose Acetate Electrophoresis of Creatine Phosphokinase Isoenzymes in the Diagnosis of Myocardial Infarction', *Am. J. Clin. Pathol.*, 1975 ; 64 : 209-216.
17. Burger, A., Richterich, R. et Aebi, H., 'Die Heterogenität der Kreatin-Kinase', *Biochemische Zeitschrift*, 1964 ; 339 : 305-314.
18. Deul, D. H. et van Breeman, J. F. L., 'Electrophoresis of Creatine Phosphokinase from Various Organs', *Clin. Chim. Acta*, 1964 ; 10 : 276-283.
19. Rosalki, S. B., 'Creatine Phosphokinase Isoenzymes', *Nature*, 1965 ; 207 : 414.
20. Trainer, T. D. et Gruenig, D., 'A Rapid Method for the Analysis of Creatine Phosphokinase Isoenzymes', *Clin. Chim. Acta*, 1968 ; 21 : 151-154.
21. Henry, R. J. et Cannon, D. C., éditeurs, 'Clinical Chemistry Principles and Techniques', 2^e édition, Harper and Row, New York, 1974 : 901-903.
22. Young, D. S., 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3^e édition, AACC Press, Washington D.C., 1990.
23. Cho, H. W. et Meltzer, H. Y., 'Factors Affecting Stability of Isoenzymes of Creatine Phosphokinase', *Am. J. Clin. Pathol.*, 1979 ; 71(1) : 75-82.
24. Marmor, A., Alpan, G., Keidar, S., Grenadier, E. et Palant, A., 'The MB Isoenzyme of Creatine Kinase as an Indicator of Severity of Myocardial Ischaemia', *Lancet*, 1978; oct 14 : 812-814.
25. Galen, R. S., Personal Communication, juin 1980.
26. Galen, R. S., 'Diagnostic Tests in Cardiac and Non-Cardiac Disorders', *Diag. Med.*, fév. 1978, 74-87.
27. Bayer, P. M., Gabl, F., Granditsch, G., Widhalm, K., Zyman, H. et Deutsch, E., 'Creatine Kinase Isoenzymes in Cerebral Fluid in a Case of Brain Damage', *Clin. Chem.*, 1976 ; 22(8) : 1405-1407.

28. Stein, W. et Bohner, 'Immunoglobulin-Bound Creatine Kinase BB ("Macro CK") in Three Patients with Different Diseases', Clin. Chem., 1979 ; 25(8) : 1513-1514.
29. Pudek, M. R., Jacobson, B. E., Urquhart, N. et Rabkin, S. W., 'Effect of Macro Creatine Kinase BB on Results of Different Creatine Kinase Isoenzyme Methods', Clin. Chem., 1982 ; 28(6) : 1400.
30. Velletri, K., Griffiths, W. C. et Diamond, I., 'Abnormal Electrophoretic Mobility of a Creatine Kinase MM Isoenzyme', Clin. Chem., 1975 ; 21(12) : 1837-1838.
31. Sax, S. M., Moore, J. J., Giegel, J. L. et Welsh, M., 'Atypical Increase in Serum Creatine Kinase Activity in Hospital Patients', Clin. Chem., 1976 ; 22(1) : 87-91.
32. Ljungdahl, L. et Gerhardt, W., 'Creatine Kinase Isoenzyme Variants in Human Serum', Clin. Chem., 1978 ; 24(5) : 832-834.
33. Lott, J. A. et Heinz, J. W., 'A Stable, Unusual Isoenzyme of Creatine Kinase Observed in a Case of Acute Anoxia', Clin. Chem., 1978 ; 24(6) : 1047.
34. James, G. P. et Harrison, R. L., 'Creatine Kinase Isoenzymes of Mitochondrial Origin in Human Serum', Clin. Chem., 1979 ; 25(6) : 943-947.
35. Yuu, Hoyuo et al., Clin. Chem., 1978 ; 24(11) : 2054-2057.

ANWENDUNGSBEREICH

Das SAS-MX CK Vis-10 Isoenzym Kit dient der Trennung und Quantifizierung von Kreatinkinase-Isoenzymen im Serum oder Plasma durch Elektrophorese im Agarose-Gel.

Kreatinphosphokinase (CK) (EC 2.7.3.2.) ist ein Enzym für den Energietransfer, das folgende Reaktion reversible katalysiert:



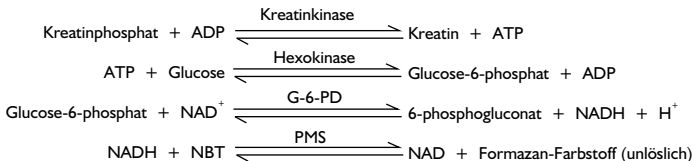
CK kommt in erster Linie in der Skelettmuskulatur, im Herzmuskel und Gehirn vor, in geringen Mengen auch in mehreren anderen Geweben¹. Etliche verschiedene klinische Episoden wie chirurgische Eingriffe, intramuskuläre Injektionen und der Myokardinfarkt führen zu einer verstärkten CK-Aktivität im Serum^{2,3}. Die Ursache der erhöhten CK-Aktivität kann durch eine Bestimmung der Isoenzyme eingengt werden. Es gibt zwei M und B genannte molekulare CK-Untereinheiten, deren Kombination drei Isoenzyme produzieren. CK-MM (in erster Linie aus dem Skelettmuskel isoliert), CK-MB (Herzmuskel) und CK-BB (vorwiegend aus dem Gehirn)³.

Die Bestimmung der CK-Isoenzyme ist eine der wichtigsten Untersuchungen in der Früherkennung einer Herzmuskelschädigung⁴. Nach einem akuten Myokardinfarkt (MI) ist CK-MB nach ungefähr 4 bis 6 Stunden im Serum nachzuweisen, erreicht höchste Aktivität nach 18-24 Stunden und kann innerhalb 72 Stunden wieder vollständig verschwinden. Innerhalb der ersten 48 Stunden nach einem MI ist in 100% der MI-Patienten CK-MB nachzuweisen, sowie in einigen Fällen von schwerer Herzinsuffizienz^{1,3,5}.

Die definitiv beste Diagnose des MI wird durch die Bestimmung der CK-Isoenzyme in Verbindung mit den Lactat-Dehydrogenase (LD) Isoenzymen erzielt^{3,5-8}. Die mit diesen zwei Tests erreichte Spezifität und Sensitivität hat zusätzliche Enzymtests zur genauen MI-Diagnose unnötig gemacht⁷. Die wichtigste Überlegung in der Interpretation der CK- und LD-Isoenzym-Muster ist bei wiederholten Untersuchungen ein Erkennen charakteristischer Veränderungen der Muster (das relativ rasche Erscheinen und Verschwinden von CK-MB und das Kippen von LD1 in LD2)^{1,3,9}. Anhaltende Erhöhung des CK-MB ist keine Indikation für einen Myokardinfarkt. CK-MB kann bei der Diagnose eines schwachen Infarkts nützlich sein, bei dem das Gesamt-CK nie die obere Grenze des Normalwerts überschreitet¹⁰.

Das durch den Herzmuskel produzierte CK ist nur zu 25-40% CK-MB, der Rest besteht aus CK-MM. Deswegen verursacht eine Erhöhung der CK aufgrund eines Myokardinfarkts nicht nur einen Anstieg in CK-MB, sondern auch in CK-MM. Die CK-Isoenzyme sind schon mit verschiedenen Methoden bestimmt worden¹¹⁻²⁰. Die Elektrophorese bietet den eindeutigen Vorteil einer vollständigen Auftrennung der Isoenzyme ohne Risiko einer Verschleppung³.

Die CK-Isoenzyme werden gemäß ihrer elektrophoretischen Mobilität auf Agarose-Gel aufgetrennt, anschließend durch Inkubation mit einem Reagenz, das die CK-Isoenzyme unter ultraviolettem Licht entsprechend des folgenden Reaktionsablaufs sichtbar macht:



Die Bandenmuster könne qualitativ oder quantitativ durch Densitometrie untersucht werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien sind nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. Nicht einnehmen oder mit dem Mund pipettieren. Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie die Informationen zur Entsorgung.

INHALT

- SAS-MX CK-Isoenzym-Gel (x10)**
Enthält Agarose in einem AMP-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.
- SAS-MX CK-Isoenzym-Puffer (1x 100ml)**
Enthält MOPSO-Puffer, pH 7,6-8,0. Den Inhalt der Flasche auf 1 Liter mit dest. Wasser verdünnen.
- CK-Isoenzym-Reagenz (10x 1ml)**
Enthält die wie im obigen Reaktionsablauf gezeigten und zur Identifikation von Kreatinkinase-Isoenzymen benötigten Bestandteile. Siehe SCHRITT-FÜR-SCHRITT Methode für die Rekonstitutionsanleitung.
- CK-Isoenzym-Verdünnungslösung (1x 10.5ml)**
Enthält MES, Sucrose, und Natriumazid als Konservierungsmittel. Der Verdünnungspuffer ist gebrauchsfertig verpackt.
- CK-Isoenzym-Chromogen (1x 1ml)**
Enthält Tetranitroblautetrazol (TNBT) und Dimethylformamid (DMF). Das Chromogen ist gebrauchsfertig verpackt.
- CK-Isoenzym-Aktivator (1x 1ml)**
Enthält 2-Mercaptoethanol in Wasser. Der Aktivator ist gebrauchsfertig verpackt.
- Weitere Kit-Komponenten**
Jedes Kit enthält eine Gebrauchsanweisung und ausreichend Probenauftragschablone (Schablone 2 = 10 x 8 Proben, Schablone 4 = 10 x 10 Proben), und Blotter A und D für 10 Gele.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. SAS-MX CK-Isoenzym-Gel

Gele sollten bei 15...30°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. NICHT IM KÜHLSCHRANK ODER TIEFKÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN! Der Zustand des Gels kann sich verschlechtern. Dafür gibt es folgende Merkmale: 1) Kristallisation weist auf vorangegangenes Einfrieren hin, 2) Risse und Ablösen weisen auf ein Austrocknen des Gels hin, und 3) sichtbare Kontamination der Agarose durch Bakterien oder Pilze.

2. SAS-MX CK-Isoenzym-Puffer

Das Pufferkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Verdünnter Puffer ist bei 15...30°C für 2 Monate stabil.

3. CK-Isoenzym-Reagenz

Die Reagenzfläschchen sollten bei 2...6°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

4. CK-Isoenzym-Verdünnungslösung

Der Verdünnungspuffer sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

5. CK-Isoenzym-Chromogen

Das Chromogen sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

6. CK-Isoenzym-Aktivator

Der Aktivator sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Kontamination vermeiden.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 4063 SAS-MX Kammer

Kat. Nr. 1525 EPS600 Netzteil

Kat. Nr. 4062 Inkubationskammer

Trockenschrank mit Umluft und einer Temperaturleistung von 60...70°C.

Inkubator mit einer Temperaturleistung von 45°C.

Glasplatte

Entfärbelösung: 100ml Eisessig mit 900ml dest. Wasser mischen. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

Dest. Wasser

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Frisches Serum ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Die Proben sollten nach Entnahme so schnell wie möglich verarbeitet werden. Bei Bedarf können Proben im Kühlschrank bei 2...6°C bis zu 48 Stunden oder bei -20°C bis zu 2 Wochen gelagert werden²³. Bei Raumtemperatur auftauen lassen.

Probenentnahme: Der richtige Zeitpunkt zur Probenentnahme ist für die genaue Interpretation des CK-Isoenzym-Musters in der Befundung eines Myokardinfarkts (MI) entscheidend. Es sollten mindestens 4 Proben entnommen werden - eine Probe bei der Einweisung und anschließend alle 8-12 Stunden für mindestens 36 Stunden.

Störfaktoren:

- 1) Während rote Blutkörperchen keine CK-Aktivität enthalten, können Hämolyseprodukte den Enzym-Reaktionsablauf beeinträchtigen. Daher für die Bestimmung keine hämolytische Proben verwenden²¹.
- 2) Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben zerstört CK-Aktivität.
- 3) Bestimmte Medikamente können die Aktivität der CK-Isoenzyme beeinflussen²².
- 4) CK wird durch Hitze inaktiviert²¹.
- 5) Bei einigen Proben kann Albumin eine sichtbare Bande im Bereich zwischen den MB- und BB-Banden bilden.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

1. Zu je 100 μ l Patientenprobe oder Kontrolle 1 μ l CK-Isoenzym-Aktivator geben und vor Gebrauch bei 15...30°C 10 Minuten inkubieren.
2. Das Gel aus der Verpackung nehmen und auf ein Papiertuch legen. Geloberfläche an der Applikationsstelle (zwischen den '-' Markierungen an den Kanten des Gels) mit Blotter A blotten. Blotter verwerfen. **BITTE BEACHTEN:** Das Gel sollte nicht früher als 5-7 Minuten vor Start der Elektrophorese aus der Plastikhülle genommen werden.
3. Die Probenauftragsschablone (entweder 8 oder 10 Proben je nach Bedarf) so auf das Gel legen, dass die '-' Markierungen am Rand des Gels liegen. Blotter A auf die Schablone legen und mit einem Finger über die Schlitz der Schablone streichen, um eine gute Haftung zu gewährleisten. Blotter A entfernen und ihn bis zur Verwendung in Schritt 6 beiseite legen.
4. 1 μ l Probe in die jeweiligen Schablonenschlitze pipettieren. Probe für 4 Minuten ins Gel diffundieren lassen.
5. Während die Probe einwirkt, 45ml Puffer in die inneren Bereiche der SAS-MX-Kammer füllen.
6. Nach Absorption der Probe den Blotter A aus Schritt 3 auf die Schablone drücken. Anschließend Schablone und Blotter entfernen.
7. Das Gel in die Kammer spannen, Agarose nach unten, und auf übereinstimmende Polarisierung achten (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer).
8. Gel-Elektrophorese durchführen: 100 Volt, 20 Minuten.
9. Während die Elektrophorese läuft, einen mit Wasser angefeuchteten Blotter D in die Inkubationskammer legen und zum Anwärmen in den 45°C warmen Inkubator legen.
10. Ungefähr 3-4 Minuten vor Elektrophorese-Ende 1 Fläschchen CK-Isoenzym-Reagenz durch Zugabe von 1ml CK-Isoenzym-Verdünnungspuffer und 70 μ l CK-Isoenzym-Chromogen rekonstituieren und gut mischen. Nicht mit einem Vortex-Mischer mischen.
11. Nach der Elektrophorese das Gel mit der Agarose-Seite nach oben auf die Glasplatte legen. Den Inhalt des Fläschchens mit CK-Isoenzym-Reagenz entlang der Anodenseite (+) des Gels gießen.
12. Mit einer Pasteurpipette das Reagenz von der Anodenseite zur Kathodenseite (-) des Gels verteilen. 15 Sekunden warten und das Reagenz von der Kathode zurück auf die Anodenseite verteilen. 15 Sekunden warten und überschüssiges Reagenz von Gel abrollen.
13. Das Gel von der Glasplatte entfernen und in die Inkubationskammer geben. Gel inkubieren: 30 Minuten, 45°C.
14. Das Gel 10 Minuten in die Entfärbelösung tauchen.
15. Das Gel mit dest. Wasser abspülen und bei 60...70°C trocknen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Es wird empfohlen, die Auswertung der Gele gegen Normalwerte vorzunehmen, die für diesen Test in jedem einzelnen Labor ermittelt worden sind. Fertige Gels sollten immer dunkel aufbewahrt werden.

Qualitative Auswertung: Das SAS-MX CK-Isoenzym-Gel kann optisch auf das Vorhandensein oder Fehlen von Banden untersucht werden.

Quantitative Auswertung: Gele bei 590 nm innerhalb 1 Stunde nach Fertigstellung scannen.

CK-BB ist die Bande, die am schnellsten in Richtung Anode wandert. Die CK-MM-Bande wandert nur sehr langsam und ist in der Nähe der Kathode zu finden. CK-MB wandert zwischen CK-MM und CK-BB^{1,3}. Es sind von einer Anzahl an atypischen CK-Banden berichtet worden. Atypische Banden, die zwischen CK-MB wandern, sind dem CK-BB als Komplex mit IgG und CK-MM als Komplex mit Lipoprotein zugeschrieben worden, sowie weiteren, nicht identifizierten Banden. Mitochondriale CK wandert kathodisch in Richtung CK-MM und eine von einem Tumorpatienten isolierte Bande, die als -Makro- CK bezeichnet wurde, wanderte auch kathodisch in Richtung CK-MM.

CK-MM

Oft das einzige CK-Isoenzym, das man in einem normalen Serum findet¹.
Ist erhöht bei Verletzungen der Skelettmuskulatur, des Myokards oder Hirns^{1,3}.

CK-MB

Kann im Serum von gesunden Probanden in der Größenordnung von 0-4% vorkommen²⁴. Kleine Mengen von CK-MB-Aktivität gelten als ein erste Anzeichen für einen möglichen Myokardinfarkt und sollte durch eine Reihe von Untersuchungen auf CK und LDH abgeklärt werden.

Die folgenden Kriterien gelten als seine positive Indikation für einen Myokardinfarkt: Das entsprechende klinische Bild², CK-MB Aktivität von > 5% der Gesamt-CK Aktivität und mindestens IOIU/l^{15,25}, CK-MB zeigt in ihrem Erscheinungsbild die charakteristische Veränderung (relativ rasches Auftreten und Verschwinden)^{1,3,9}.

Positive Identifikation des zweiten Myokardinfarkts: Nach dem ersten MI steigt das CK-MB, nachdem es beginnt zurück zu gehen, an. Das Gesamt-CK kann, nachdem es beginnt zurück zu gehen, einen Anstieg zeigen.

Werte nach einem kardiochirurgischen Eingriff³ – CK und LDH-Isoenzyme sind nach kardiochirurgischen Eingriffen weniger spezifisch als in den meisten diagnostischen Situationen. Das CK-MB ist wegen der Verletzung des Myokards durch die Operation als auch durch die Manipulation und Punktion des Herzens erhöht. Die LD ist durch die sekundäre Hämolyse aus dem extrakorporalen Kreislauf umgekehrt. Infarktpatienten haben eine höhere CK-MB Aktivität, doch der große Bereich der Isoenzym-Aktivität, den man bei Patienten ohne MI sieht, überschneidet sich mit der von Patienten mit MI. Daher ist eine genaue Unterscheidung nicht möglich. Trotz dieser Schwierigkeit kann eine exakte MI-Diagnose durch in regelmäßigen Abständen als Verlaufskontrolle durchgeführte CK-MB Bestimmungen während der post-operativen Phase erhöht werden. Perioperative Infarktpatienten haben für gewöhnlich einen progressiven Anstieg der CK-MB Werte, wohingegen Patienten ohne MI postoperativ einen rascheren Abfall der CK-MB zeigen^{2,26}.

Erhöhung bei Erkrankungen außer MI: Schwere koronare Herzinsuffizienz, Duchenne'sche Muskelatrophie, Rocky Mountain Spotted Fever, Rhabdomyolyse, Dermatomyositis, Myoglobinurie, Polymyositis, Reye-Syndrom.

CK-BB

Oft im Serum von Patienten mit Prostatakarzinom zu finden und gelegentlich bei Patienten mit anderen Karzinomen und malignen Tumoren¹. (Siehe EINSCHRÄNKUNGEN).

Selten im Serum von Patienten mit Hirnverletzungen aufgrund einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke^{1,27}. Gelegentlich im Serum von Patienten in schwerem Schockzustand nachzuweisen (möglicherweise wegen einer Beteiligung von Lunge und Intestinum). Gelegentlich im Serum von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und bei Wöchnerinnen zu finden.

Es ist von einer Reihe atypischer CK-Banden berichtet worden. Atypische Banden, die zwischen CK-MB und CK-MM wandern, sind dem CK-BB als Komplex mit IgG^{28,29} zugeschrieben worden und CK-MM als Lipoprotein-Komplex³⁰, sowie weiteren ohne positive Identifikation³¹⁻³³. Mitochondriale CK wandert kathodisch in Richtung CK-MM³⁴, und eine von einem Krebspatienten isolierte Bande, die als „Macro“-CK bezeichnet wurde, wanderte auch kathodisch in Richtung CK-MM³⁵.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die CK/LD-Kontrolle (Kat. Nr. 5134) überprüft alle Phasen der Methode und sollte bei jedem Lauf mitgeführt werden. Zulässige Assay-Werte sind der Packungsbeilage zu entnehmen.

EINSCHRÄNKUNGEN

Die Methode des SAS-MX CK-Isoenzymys ist nicht zur Identifikation von Tumor-Markern geeignet.

REFERENZWERTE

Studien zum Normalbereich, ermittelt an scheinbar gesunden männlichen und weiblichen Freiwilligen, ergaben folgende Werte:

CK-MM = 100%

CK-MB = 0%

CK-BB = 0%

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN**Linearität**

Die Methode ergibt lineare Werte für CK-Aktivitäten bis zu 1300 IU/l pro Bande.

Empfindlichkeit

Die Methode hat eine Empfindlichkeit von bis zu 8 IU/l pro Bande.

Reproduzierbarkeit

	Im Gel (n=8)		Zwischen Gelen (n=4)	
	Mittelwert (%)	CV (%)	Mittelwert (%)	CV (%)
CK-MM	76,5	0,5	76,4	0,8
CK-MB	11,1	1,8	11,2	4,5
CB-BB	12,5	2,7	12,5	2,5

LITERATUR

1. Brish, L. K., 'CK & LD Isoenzyme. A Self-Instructional Text', Am. Soc. Of Clin. Path. Press, Chicago, 1984 : 30-47.
2. Wolf, P.L., Griffiths, J.C and Koett, J.W., 'Interpretation of Electrophoretic Patterns of Proteins and Isoenzymes', Mason Publishers, New York, 1981 : 60.
3. Tietz, N.W., Ed. 'Textbook of Clinical Chemistry', W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1986 : 678-700.
4. Galen, R. S., 'The Enzyme Diagnosis of Myocardial Infarction', Human Path., 1975; 6(2): 141-155.
5. Wagner, G.S., Roe, C.R., Limbird, L.E., Rosati, R.A. and Wallace, A.G., 'The Importance of Identification of the Myocardial-Specific Isoenzyme of Creatine Phosphokinase (MB Form) in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', Circulation, 1973; 47: 263-269.
6. Marmor, A. and Alpan, G., 'Specificity of Creatine Kinase MB Isoenzyme for Myocardial Injury', Clin. Chem., 1978; 24(12) : 2206.
7. Galen, R.S., Reiffel, J.A. and Gambino, S.R., 'Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', J. Am. Med. Assoc., 1975; 232(2): 145-147.
8. Frolich, J., Brosseuk, A., Grant, A. and McLennan, M., 'Study of the Value of CPK and LDH Isoenzyme Determinations in the Differential Diagnosis of Ischemic Chest Pain', Clin. Biochem., 1978; 11(6): 232-234.
9. Yasmineh, W.G., Pyle, R.B, Cohn, J.N., Nicoloff, D.M., Hanson, N.Q. and Steele, B.W., 'Serial Serum Creatine Phosphokinase MB Isoenzyme Activity After Myocardial Infarction', Circulation, 1977; 55(5): 733-737.
10. D'Souza, J.P., Sine, H.E., Horvitz, R.A., Kubasik, N.P., Brody, B.B. and Barold, S.S., 'The Significance of the MB Isoenzyme in Patients with Acute Cardiovascular Disease with a Normal or Borderline Total CPK Activity', Clin. Biochem., 1978; 11(5): 204-209.
11. Mercer, D.W., 'Separation of Tissue and Serum Creatine Kinase Isoenzymes by Ion-Exchange Column Chromatography', Clin. Chem., 1974; 20(1) : 36-40.
12. Rao, P.S., Lukes, J.J., Ayres, S.M. and Mueller, H., 'New manual and Automated Method for Determining Activity of Creatine Kinase Isoenzyme MB, by Use of Dithiothreitol: Clinical Applications', Clin. Chem., 1975; 21(11) : 1612-1618.
13. Jockers-Wretou, E. and Pfeleiderer, G., 'Quantitation of Creatine Kinase Isoenzymes in Human Tissues and Sera by an Immunological Method', Clin. Chim. Acta, 1975; 58: 223-232.
14. Roberts, R., Sobel, B.E. and Parker, C.W., 'Radioimmunoassay for Creatine Kinase Isoenzymes', Science, 1976; 194: 855-857.
15. Van Der Veen, K.J. and Willebrands, A.F., 'Isoenzymes of Creatine Phosphokinase in Tissue Extracts and in Normal and Pathological Sera', Clin. Chim. Acta, 1966; 13: 312-316.
16. Wong, R. and Swallen, T.O., 'Cellulose Acetate Electrophoresis of Creatine Phosphokinase Isoenzymes in the Diagnosis of Myocardial Infarction', Am. J. Clin. Pathol., 1975; 64: 209-216.
17. Burger, A., Richterich, R. und Aebi, H., 'Die Heterogenitat der Kreatin-Kinase', Biochemische Zeitschrift, 1964; 339: 305-314.
18. Deul, D.H. and van Breeman, J.F.L., 'Electrophoresis of Creatine Phosphokinase from Various Organs', Clin. Chim. Acta, 1964; 10: 276-283.
19. Rosalki, S.B., 'Creatine Phosphokinase Isoenzymes', Nature, 1965; 207: 414.
20. Trainer, T.D. and Gruenig, D., 'A Rapid Method for the Analysis of Creatine Phosphokinase Isoenzymes', Clin. Chim. Acta, 1968; 21: 151-154.
21. Henry, R.J. and Cannon, D.C., Ed's, 'Clinical Chemistry Principles and Techniques', 2nd Edition, Harper and Row, New York, 1974: 901-903.

22. Young, D.S. , 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3rd Edition, AACC Press, Washington D.C., 1990.
23. Cho, H.W. and Meltzer, H.Y., 'Factors Affecting Stability of Isoenzymes of Creatine Phosphokinase', *Am. J. Clin. Pathol.*, 1979; 71(1): 75-82.
24. Marmor, A., Alpan, G., Keidar, S., Grenadier, E. and Palant, A., 'The MB Isoenzyme of Creatine Kinase as an Indicator of Severity of Myocardial Ischaemia', *Lancet*, 1978; Oct 14: 812-814.
25. Galen, R.S., Personal Communication, June 1980.
26. Galen, R.S., 'Diagnostic Tests in Cardiac and Non-Cardiac Disorders' *Diag. Med.*, 1978 Feb., 74-87.
27. Bayer, P.M., Gabl, F., Granditsch, G., Widhalm, K., Zyman, H. and Deutsch, E., 'Creatine Kinase Isoenzymes in Cerebral Fluid in a Case of Brain Damage', *Clin. Chem.*, 1976; 22(8) : 1405-1407.
28. Stein, W. and Bohner, 'Immunoglobulin-Bound Creatine Kinase BB ("Macro CK") in Three Patients with Different Diseases', *Clin. Chem.*, 1979; 25(8) : 1513-1514.
29. Pudek, M.R., Jacobson, B.E., Urquhart, N. and Rabkin, S.W., 'Effect of Macro Creatine Kinase BB on Results of Different Creatine Kinase Isoenzyme Methods', *Clin. Chem.*, 1982; 28(6) : 1400.
30. Velletri, K., Griffiths, W.C. and Diamond, I., 'Abnormal Electrophoretic Mobility of a Creatine Kinase MM Isoenzyme', *Clin. Chem.*, 1975; 21(12) : 1837-1838.
31. Sax, S.M., Moore, J.J., Giegel, J.L. and Welsh, M., 'Atypical Increase in Serum Creatine Kinase Activity in Hospital Patients', *Clin. Chem.*, 1976; 22(1) : 87-91.
32. Ljungdahl, L. and Gerhardt, W., 'Creatine Kinase Isoenzyme Variants in Human Serum', *Clin. Chem.*, 1978; 24(5) : 832-834.
33. Lott, J.A. and Heinz, J.W., 'A Stable, Unusual Isoenzyme of Creatine Kinase Observed in a Case of Acute Anoxia', *Clin. Chem.*, 1978; 24(6) : 1047.
34. James, G.P. and Harrison, R.L., 'Creatine Kinase Isoenzymes of Mitochondrial Origin in Human Serum', *Clin. Chem.*, 1979; 25(6) : 943-947.
35. Yuo, Hoyuo, et al., *Clin. Chem.*, 1978; 24(11) : 2054-2057.

PRINCIPIO

Il kit per isoenzimi CK Vis-10 SAS-MX è stato formulato per separare e quantificare gli isoenzimi della creatininchinasi nel siero o nel plasma mediante elettroforesi in gel di agarosio.

La creatinfosfochinasi (CK) (EC 2.7.3.2.) è un enzima di trasferimento dell'energia, che catalizza la reazione reversibile



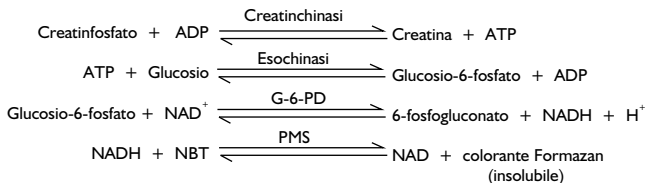
La CK è presente principalmente nel muscolo scheletrico, nel muscolo cardiaco e nel cervello, mentre la si riscontra in piccole quantità in molti altri tessuti¹. Innumerevoli episodi clinici di diversa natura, come le procedure chirurgiche, le iniezioni intramuscolari e l'infarto del miocardio, inducono una maggiore attività della CK nel siero^{2,3}. L'origine dell'incremento di attività della CK può essere delimitata mediante la valutazione degli isoenzimi. Esistono due subunità CK molecolari, denominate M e B, le cui combinazioni producono tre isoenzimi: CK-MM (isolato principalmente dal muscolo scheletrico), CK-MB (nel miocardio) e CK-BB (isolato principalmente dal cervello)³.

L'analisi degli isoenzimi della CK è una delle procedure più importanti utilizzate nel rilevamento precoce dei danni al miocardio⁴. In seguito ad infarto miocardico acuto (IMA), l'isoenzima CK-MB compare nel siero nell'arco di circa 4-6 ore, raggiunge l'attività di picco in corrispondenza delle 18-24 ore e può scomparire completamente entro 72 ore. Entro le prime 48 ore dall'infarto miocardico, il CK-MB è presente nel 100% dei pazienti colpiti da tale evento e in alcuni casi di insufficienza coronarica grave^{1,3,5}.

I test di laboratorio maggiormente precisi nella diagnosi dell'infarto miocardico vengono compiuti studiando l'isoenzima della CK unitamente agli isoenzimi della lattato deidrogenasi (LDH)^{3,5,8}. La specificità e la sensibilità raggiunte con questi due test hanno eliminato la necessità di effettuare ulteriori studi sugli enzimi per giungere ad una diagnosi accurata dell'infarto miocardico⁷. La considerazione più importante nell'interpretazione dei pattern degli isoenzimi CK e LDH è il rilevamento del caratteristico cambiamento di pattern degli esami multipli (la comparsa e la scomparsa relativamente rapide del CK-MB e il flip della LDH1 rispetto alla LDH2)^{1,3,9}. L'aumento persistente del CK-MB non è indicativo di infarto miocardico. Il CK-MB può rivelarsi utile nel diagnosticare un piccolo infarto in cui la CK totale non supera mai il limite superiore del range normale¹⁰.

La CK prodotta dal miocardio è costituita da appena il 25-40% di CK-MB, mentre la percentuale rimanente è formata dal CK-MM. Pertanto, un incremento della CK dovuto ad infarto miocardico comporta un aumento non soltanto del CK-MB ma anche del CK-MM. Gli isoenzimi della CK sono stati valutati con svariati metodi^{11,20}. L'elettroforesi offre un vantaggio evidente, che consiste nell'ottenere la completa separazione degli isoenzimi senza rischio di carryover³.

Gli isoenzimi della CK vengono separati in base alla loro mobilità elettroforetica su un gel di agarosio, seguito da incubazione con un reagente che visualizza gli isoenzimi della CK secondo la sequenza di reazioni sotto riportata:



I pattern possono essere esaminati qualitativamente oppure possono essere quantificati per densitometria.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti devono essere utilizzati esclusivamente per diagnostica in vitro. Non ingerire né pipettare con la bocca i componenti del kit. Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Per le indicazioni relative ai rischi e alla sicurezza e le informazioni sullo smaltimento, fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti.

COMPOSIZIONE

1. SAS-MX Gel per isoenzimi CK (x10)

Contiene agarosio in un tampone AMP con sodio azide come conservante. Il gel è pronto all'uso così come viene fornito.

2. SAS-MX Tampone per isoenzimi CK (1x 100ml)

Contiene tampone MOPSO con pH 7.6 - 8.0. Diluire il contenuto del flacone ad 1 litro con acqua distillata.

3. Reagente per isoenzimi CK (10x 1ml)

Contiene i componenti necessari all'identificazione degli isoenzimi della creatinchinasi secondo la sequenza di reazioni sopra illustrata. Ved. il paragrafo PROCEDURA DETTAGLIATA per le istruzioni di ricostituzione.

4. Diluente per isoenzimi CK (1x 10.5ml)

Contiene MES, saccarosio e sodio azide come conservante. Il diluente è pronto all'uso così come viene fornito.

5. Cromogeno per isoenzimi CK (1x 1ml)

Contiene tetranitro blu di tetrazolio (TNBT) e dimetilformammide (DMF). Il cromogeno è pronto all'uso così come viene fornito.

6. Attivatore degli isoenzimi CK (1x 1ml)

Contiene 2-mercaptoetanolo in acqua. L'attivatore è pronto all'uso così come viene fornito.

7. Altri componenti del kit

Ogni kit contiene un foglio procedurale, mascherine per l'applicazione del campione (Mascherina 2 = 10 x 8 campioni, Mascherina 4 = 10 x 10 campioni) e blotter A e D, in quantità sufficiente per completare 10 gel.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

1. Gel SAS-MX CK per isoenzima

I gel devono essere conservati a 15...30°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. **NON REFRIGERARE NÉ CONGELARE.** Il deterioramento del gel può essere indicato da 1) formazioni cristalline per effetto di congelamento, 2) screpolature e fessurazione per effetto di essiccamento oppure, 3) contaminazione visibile dell'agarosio causata da batteri o funghi.

2. SAS-MX Tampone per isoenzimi CK

Il tampone concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 15...30°C.

3. Reagente per isoenzimi CK

I flaconi di reagente devono essere conservati a 2...6°C e sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

4. Diluente per isoenzimi CK

Il diluente deve essere conservato a 2...6°C ed è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta.

5. Cromogeno per isoenzimi CK

Il cromogeno deve essere conservato a 2...6°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.

6. Attivatore degli isoenzimi CK

L'attivatore deve essere conservato a 2...6°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare la contaminazione.

MATERIALI NECESSARI, MA NON IN DOTAZIONE

Cod. N. 4063 Camera SAS-MX

Cod. N. 1525 Alimentatore EPS600

Cod. N. 4062 Camera d'incubazione

Forno di essiccazione ad aria forzata con temperature di 60...70°C

Incubatrice prevista per 45°C.

Piastra in vetro

Soluzione decolorante: Mescolare 100ml di acido acetico glaciale e 900ml di acqua distillata. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

Acqua distillata

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Il campione ideale è costituito da siero fresco. I campioni devono essere testati il più presto possibile dopo il prelievo. Se necessario, i campioni possono essere conservati in frigorifero ad una temperatura compresa tra 2...6°C per un massimo di 48 ore²³ o congelati fino a 2 settimane a -20°C²³. Lasciare scongelare a temperatura ambiente.

Raccolta dei campioni: Un'adeguata tempestività nella raccolta dei campioni è di cruciale importanza per l'esatta interpretazione dei pattern degli isoenzimi della CK nella valutazione dell'infarto del miocardio (IM). Devono essere raccolti almeno 4 campioni, di cui uno al momento del ricovero, seguito da prelievi eseguiti ogni 8-12 ore per almeno 36 ore.

Fattori d'interferenza:

- 1) Mentre gli eritrociti non contengono alcuna attività CK, i prodotti dell'emolisi possono interferire con la sequenza di reazioni per l'enzima, cosicché si sconsiglia l'utilizzo di campioni emolizzati²¹.
- 2) Il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni distrugge l'attività CK.
- 3) Alcuni farmaci possono influire sull'attività degli isoenzimi della CK²².
- 4) La CK viene inattivata dal calore²¹.
- 5) In alcuni campioni l'albumina può generare una banda visibile tra le regioni delle bande MB e BB.

PROCEDURA

1. Ad ogni 100 μ l di campione o controllo del paziente aggiungere 1 μ l di attivatore per isoenzimi CK ed incubare a 15...30°C per 10 minuti prima dell'uso.
2. Rimuovere il gel dalla confezione e collocarlo su una bibula. Asciugare leggermente la superficie del gel nel punto di applicazione (tra i segni "-" sui bordi del gel) con un blotter A, quindi gettare il blotter. **NOTA:** Dal momento in cui il gel viene estratto dalla confezione in plastica non devono trascorrere più di 5-7 minuti prima dell'inizio dell'elettroforesi.
3. Allineare la mascherina per l'applicazione del campione (per 8 o 10 campioni a seconda delle preferenze) rispetto ai segni "+" presenti sul bordo del gel. Porre un blotter A sopra alla mascherina ed effettuare una leggera pressione con le dita sulle fessure per verificare il corretto contatto. Rimuovere il blotter e conservarlo per il passaggio 6.
4. Applicare 1 μ l di campione in ogni fessura di semina e lasciare assorbire per 4 minuti.
5. Durante l'assorbimento dei campioni, collocare 45ml di tampone in ogni compartimento interno della camera SAS-MX.
6. Dopo l'assorbimento del campione, asciugare leggermente la mascherina con il blotter A, conservato dal passaggio 3, quindi eliminare mascherina e blotter.
7. Collocare il gel nella camera, con il lato dell'agarosio rivolto verso il basso, e allineando il segno positivo (+) ed il negativo (-) con le corrispondenti posizioni nella camera.
8. Sottoporre il gel ad elettroforesi: 100 Volt per 20 minuti.
9. Mentre i campioni vengono sottoposti ad elettroforesi, collocare un blotter D inumidito con acqua nella camera d'incubazione e sistemare l'incubatrice regolata a 45°C in modo tale da consentirne il bilanciamento.
10. Circa 3-4 minuti prima della conclusione dell'elettroforesi, ricostituire un flacone di reagente per isoenzimi CK aggiungendo 1ml di diluente per isoenzimi CK e 70 μ l di cromogeno per isoenzimi CK e quindi mescolando bene. Non agitare creando vortici.
11. Al termine dell'elettroforesi, mettere il gel su una piastra di vetro con il lato dell'agarosio rivolto verso l'alto. Versare il contenuto del flacone di reagente per isoenzimi CK lungo il bordo anodico (+) del gel.
12. Utilizzando una pipetta sierologica, spargere il reagente dal bordo anodico al bordo catodico (-) del gel. Attendere 15 secondi e spargere il reagente dal bordo catodico verso il bordo anodico. Attendere ancora 15 secondi e rimuovere dal gel il reagente in eccesso.
13. Rimuovere il gel dalla piastra in vetro e collocarlo nella camera d'incubazione. Incubare il gel: 30 minuti a 45°C.
14. Immergere il gel nella soluzione decolorante per 10 minuti.
15. Sciacquare il gel con acqua distillata e asciugare a 60...70°C.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Si raccomanda di effettuare qualsiasi valutazione dei gel sulla base dei valori normali prodotti per questo esame in ogni singolo laboratorio. I gel ottenuti devono essere costantemente conservati al buio.

Valutazione qualitativa: Il gel per isoenzimi CK SAS-MX può essere ispezionato visivamente per rilevare la presenza o l'assenza di bande d'interesse.

Valutazione quantitativa: Eseguire la scansione dei gel a 590nm entro un'ora dal completamento.

L'isoenzima CK-BB è la banda più anodica in più rapido movimento, mentre l'isoenzima CK-MM è la banda più catodica con movimento più lento. L'isoenzima CK-MB migra in posizione intermedia rispetto al CK-MM e al CK-BB^{1,3}. Sono state osservate innumerevoli bande CK atipiche. Le bande atipiche che migrano tra il CK-MB sono state attribuite al CK-BB legato alle IgG e al CK-MM legato alle lipoproteine, nonché ad altri elementi senza identificazione certa. La CK mitocondriale migra catodicamente rispetto al CK-MM; anche una banda denominata CK "macro", isolata da un paziente affetto da cancro, è apparsa migrare catodicamente rispetto al CK-MM.

CK-MM

Si tratta spesso dell'unico isoenzima della CK riscontrato nel siero normale¹.

È presente in quantità elevate nelle lesioni del muscolo scheletrico, del miocardio o del cervello^{1,3}.

CK-MB

Può essere presente nel siero di soggetti normali in quantità pari a 0-4%²⁴. Una presenza limitata dell'attività CK-MB è stata interpretata come segnale di allarme di un possibile infarto miocardico e deve essere seguita da studi periodici sugli isoenzimi della CK e della LDH.

L'indicazione certa dell'infarto miocardico si ha qualora vengano soddisfatti i seguenti criteri: quadro clinico pertinente², attività CK-MB >5% dell'attività CK totale e almeno 10IU/L^{1,15,25}, CK-MB con caratteristica variazione del pattern (comparsa e scomparsa relativamente rapide)^{1,3,9}.

Identificazione certa di un secondo infarto miocardico: in seguito al primo infarto miocardico, il CK-MB aumenta dopo avere iniziato a ridursi. La CK totale potrebbe non mostrare un incremento dopo avere iniziato a ridursi.

Valori in seguito ad intervento a cuore aperto³: gli isoenzimi della CK e della LDH sono meno specifici in seguito ad un intervento a cuore aperto rispetto a quanto lo siano nella maggior parte delle situazioni diagnostiche. Il CK-MB aumenterà a causa del danno miocardico dovuto alla procedura di intervento e del trauma subito dal cuore per effetto della manipolazione e dell'incannulamento. La LDH assume un ruolo secondario all'emolisi dovuta alla circolazione extracorporea. I pazienti infartuati presentano livelli maggiori di attività CK-MB, ma il vasto range di attività isoenzimatica osservata in pazienti non colpiti da infarto miocardico si sovrappone a quello osservato in pazienti con infarto miocardico, rendendo impossibile una discriminazione completa. Malgrado tale difficoltà, la precisione nel diagnosticare l'infarto miocardico può essere incrementata effettuando determinazioni periodiche del CK-MB nel periodo postoperatorio e monitorando i trend. I pazienti con infarto perioperatorio presenteranno solitamente un aumento progressivo dei livelli di CK-MB, mentre i pazienti non colpiti da infarto miocardico mostrano una riduzione più rapida del CK-MB postoperatorio^{2,26}.

Aumento in patologie diverse dall'infarto miocardico: insufficienza coronarica grave, distrofia muscolare di Duchenne, febbre maculosa delle Montagne Rocciose, rabdomiolisi, dermatomiosite, mioglobinuria, polmiosite, sindrome di Reye.

CK-BB

È spesso osservato nel siero di pazienti con carcinoma prostatico e talvolta nel siero di pazienti con altri carcinomi e tumori maligni (ved. LIMITAZIONI).

Lo si osserva raramente nel siero di pazienti con lesioni cerebrali dovute a danni alla barriera sangue-cervello^{1,27}.

Viene talvolta osservato nel siero di pazienti con sindrome da shock severo (probabilmente in seguito a coinvolgimento dei polmoni o dell'intestino tenue).

Viene talvolta osservato nel siero di pazienti con insufficienza renale cronica e donne in travaglio¹.

Sono state osservate innumerevoli bande CK atipiche. Le bande atipiche che migrano tra il CK-MB e il CK-MM sono state attribuite al CK-BB legato alle IgG^{28,29} e al CK-MM legato alle lipoproteine³⁰, nonché ad altri elementi senza identificazione certa³¹⁻³³. La CK mitocondriale migra catodicamente rispetto al CK-MM³⁴; anche una banda denominata CK "macro", isolata da un paziente affetto da cancro, è apparsa migrare catodicamente rispetto al CK-MM³⁵.

CONTROLLO QUALITÀ

Il controllo CK/LDH (Cod. N. 5134) può essere utilizzato per verificare tutte le fasi della procedura e deve essere impiegato su ogni piastra. Fare riferimento alle schede all'interno della confezione per i valori di dosaggio accettabili.

LIMITAZIONI

La procedura di identificazione degli isoenzimi CK SAS-MX non è destinata ad identificare i marker tumorali.

VALORI DI RIFERIMENTO

Gli studi dei range normali eseguiti ricorrendo a volontari apparentemente sani di sesso maschile e femminile hanno fornito i seguenti risultati:

CK-MM = 100%

CK-MB = 0%

CK-BB = 0%

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI**Linearità**

Il metodo fornisce una risposta lineare alle attività CK fino a 1300 IU/L per banda.

Sensibilità

Il metodo è sensibile a 8 IU/L per banda.

Riproducibilità

	Entro il gel (n=8)		Tra il gel (n=4)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
CK-MM	76,5	0,5	76,4	0,8
CK-MB	11,1	1,8	11,2	4,5
CB-BB	12,5	2,7	12,5	2,5

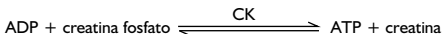
BIBLIOGRAFIA

1. Brish, L.K., 'CK & LD Isoenzyme. A Self-Instructional Text', Am. Soc. Of Clin. Path. Press, Chicago, 1984 : 30-47.
2. Wolf, P.L., Griffiths, J.C and Koett, J.W., 'Interpretation of Electrophoretic Patterns of Proteins and Isoenzymes', Mason Publishers, New York, 1981 : 60.
3. Tietz, N.W., Ed. 'Textbook of Clinical Chemistry', W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1986. 678-700.
4. Galen, R.S. 'The Enzyme Diagnosis of Myocardial Infarction', Human Path., 1975; 6(2): 141-155.
5. Wagner, G.S., Roe, C.R., Limbird, L.E., Rosati, R.A. and Wallace, A.G., 'The Importance of Identification of the Myocardial-Specific Isoenzyme of Creatine Phosphokinase (MB Form) in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', Circulation, 1973; 47: 263-269.
6. Marmor, A. and Alpan, G., 'Specificity of Creatine Kinase MB Isoenzyme for Myocardial Injury', Clin. Chem., 1978; 24(12): 2206.
7. Galen, R.S. Reiffel, J.A. and Gambino, S.R., 'Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', J. Am. Med. Assoc., 1975; 232(2): 145-147.
8. Frolich, J., Brosseuk, A., Grant, A. and McLennan, M., 'Study of the Value of CPK and LDH Isoenzyme Determinations in the Differential Diagnosis of Ischemic Chest Pain', Clin. Biochem., 1978; 11(6): 232-234.
9. Yasmineh, W.G., Pyle, R.B, Cohn, J.N., Nicoloff, D.M., Hanson, N.Q. and Steele, B.W., 'Serial Serum Creatine Phosphokinase MB Isoenzyme Activity After Myocardial Infarction', Circulation, 1977; 55(5): 733-737.
10. D'Souza, J.P., Sine, H.E., Horvitz, R.A., Kubasik, N.P., Brody, B.B. and Barold, S.S., 'The Significance of the MB Isoenzyme in Patients with Acute Cardiovascular Disease with a Normal or Borderline Total CPK Activity', Clin. Biochem., 1978; 11(5): 204-209.
11. Mercer, D.W., 'Separation of Tissue and Serum Creatine Kinase Isoenzymes by Ion-Exchange Column Chromatography', Clin. Chem., 1974; 20(1): 36-40.
12. Rao, P.S., Lukes, J.J., Ayres, S.M. and Mueller, H., 'New manual and Automated Method for Determining Activity of Creatine Kinase Isoenzyme MB, by Use of Dithiothreitol: Clinical Applications', Clin. Chem., 1975; 21(11): 1612-1618.
13. Jockers-Wretou, E. and Pfeleiderer, G., 'Quantitation of Creatine Kinase Isoenzymes in Human Tissues and Sera by an Immunological Method', Clin. Chim. Acta, 1975; 58: 223-232.
14. Roberts, R., Sobel, B.E. and Parker, C.W., 'Radioimmunoassay for Creatine Kinase Isoenzymes', Science, 1976; 194: 855-857.
15. Van Der Veen, K.J. and Willebrands, A.F., 'Isoenzymes of Creatine Phosphokinase in Tissue Extracts and in Normal and Pathological Sera', Clin. Chim. Acta, 1966; 13: 312-316.
16. Wong, R. and Swallen, T.O., 'Cellulose Acetate Electrophoresis of Creatine Phosphokinase Isoenzymes in the Diagnosis of Myocardial Infarction', Am. J. Clin. Pathol., 1975; 64: 209-216.
17. Burger, A., Richerich, R. und Aebi, H., 'Die Heterogenitat der Kreatin-Kinase', Biochemische Zeitschrift, 1964; 339: 305-314.
18. Deul, D.H. and van Breeman, J.F.L., 'Electrophoresis of Creatine Phosphokinase from Various Organs', Clin. Chim. Acta, 1964; 10: 276-283.
19. Rosalki, S.B., 'Creatine Phosphokinase Isoenzymes', Nature, 1965; 207: 414.
20. Trainer, T.D. and Gruenig, D., 'A Rapid Method for the Analysis of Creatine Phosphokinase Isoenzymes', Clin. Chim. Acta, 1968; 21: 151-154.
21. Henry, R.J. and Cannon, D.C., Ed's, 'Clinical Chemistry Principles and Techniques', 2nd Edition, Harper and Row, New York, 1974: 901-903.

22. Young, D.S. , 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3rd Edition, AACC Press, Washington D.C., 1990.
23. Cho, H.W. and Meltzer, H.Y., 'Factors Affecting Stability of Isoenzymes of Creatine Phosphokinase', *Am. J. Clin. Pathol.*, 1979; 71(1): 75-82.
24. Marmor, A., Alpan, G., Keidar, S., Grenadier, E. and Palant, A., 'The MB Isoenzyme of Creatine Kinase as an Indicator of Severity of Myocardial Ischaemia', *Lancet*, 1978; Oct 14: 812-814.
25. Galen, R.S. Personal Communication, June 1980.
26. Galen, R.S. 'Diagnostic Tests in Cardiac and Non-Cardiac Disorders' *Diag. Med.*, 1978 Feb., 74-87.
27. Bayer, P.M., Gabl, F., Granditsch, G., Widhalm, K., Zyman, H. and Deutsch, E., 'Creatine Kinase Isoenzymes in Cerebral Fluid in a Case of Brain Damage', *Clin. Chem.*, 1976; 22(8): 1405-1407.
28. Stein, W. and Bohner, 'Immunoglobulin-Bound Creatine Kinase BB ("Macro CK") in Three Patients with Different Diseases', *Clin. Chem.*, 1979; 25(8): 1513-1514.
29. Pudek, M.R., Jacobson, B.E., Urquhart, N. and Rabkin, S.W., 'Effect of Macro Creatine Kinase BB on Results of Different Creatine Kinase Isoenzyme Methods', *Clin. Chem.*, 1982; 28(6): 1400.
30. Velletri, K., Griffiths, W.C. and Diamond, I., 'Abnormal Electrophoretic Mobility of a Creatine Kinase MM Isoenzyme', *Clin. Chem.*, 1975; 21(12): 1837-1838.
31. Sax, S.M., Moore, J.J., Giegel, J.L. and Welsh, M., 'Atypical Increase in Serum Creatine Kinase Activity in Hospital Patients', *Clin. Chem.*, 1976; 22(1): 87-91.
32. Ljungdahl, L. and Gerhardt, W., 'Creatine Kinase Isoenzyme Variants in Human Serum', *Clin. Chem.*, 1978; 24(5): 832-834.
33. Lott, J.A. and Heinz, J.W., 'A Stable, Unusual Isoenzyme of Creatine Kinase Observed in a Case of Acute Anoxia', *Clin. Chem.*, 1978; 24(6): 1047.
34. James, G.P. and Harrison, R.L., 'Creatine Kinase Isoenzymes of Mitochondrial Origin in Human Serum', *Clin. Chem.*, 1979; 25(6): 943-947.
35. Yuu, Hoyuo, et al., *Clin. Chem.*, 1978; 24(11): 2054-2057.

USO PREVISTO

El kit de isoenzimas de la CK, *SAS-MX CK Vis-10 Isoenzyme*, está diseñado para la separación y cuantificación de las isoenzimas de la creatina cinasa en el suero o el plasma mediante electroforesis con gel de agarosa. La creatina fosfoquinas (CK) (EC 2.7.3.2.) es una enzima de transferencia de energía, que cataliza la reacción reversible



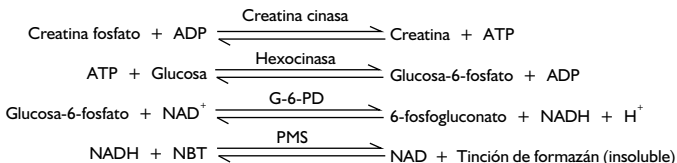
La CK existe fundamentalmente en el músculo esquelético, el músculo cardíaco y el cerebro, con pequeñas cantidades en diversos otros tejidos¹. Hay diversas otras circunstancias clínicas, como los procedimientos quirúrgicos, las inyecciones intramusculares y el infarto de miocardio que inducen aumento de la actividad de CK en el suero^{2,3}. Las posibilidades sobre el origen de la actividad elevada de CK pueden limitarse mediante la valoración de las isoenzimas. Hay dos subunidades moleculares de la CK, denominadas M y B, cuyas combinaciones producen tres isoenzimas. CK-MM (aislada fundamentalmente de músculo esquelético), CK-MB (miocardio) y CK-BB (fundamentalmente del cerebro)³.

El análisis de las isoenzimas de CK es uno de los procedimientos más importantes usados en la detección precoz de un daño miocárdico⁴. Después de un infarto agudo de miocardio (IAM), la CK-MB aparece en el suero en aproximadamente 4 a 6 horas, alcanza su actividad en 18-24 horas y puede desaparecer completamente en 72 horas. En las primeras 48 horas después de un IAM, la CK-MB está presente en el 100% de los pacientes con IAM, así como en algunos casos de insuficiencia coronaria grave^{1,3,5}.

La prueba de laboratorio más definitiva en el diagnóstico de IM se consigue mediante estudios de la isoenzima CK conjuntamente con las isoenzimas de la lactato deshidrogenasa (LDH)^{3,5,8}. La especificidad y sensibilidad conseguidas con estas dos pruebas ha eliminado la necesidad de estudios enzimáticos adicionales para diagnosticar con precisión el IM⁷. La consideración más importante en la interpretación de los patrones de las isoenzimas CK y LDH es la detección del cambio característico del patrón de exámenes múltiples (la aparición y desaparición relativamente rápida de CK-MB y el vuelco de LDH1 sobre LDH2)^{1,3,9}. La elevación persistente de la CK-MB no es indicativa de infarto de miocardio. La CK-MB puede ser útil para diagnosticar un infarto pequeño en el que la CK total nunca supera el límite superior de la normalidad¹⁰.

La CK producida por el miocardio es sólo en un 25-40% CK-MB, y el resto es CK-MM. Por tanto, una elevación de la CK debida a infarto de miocardio produce un aumento no sólo de la CK-MB, sino también de la CK-MM. Se han valorado las isoenzimas de CK mediante diversos métodos¹¹⁻²⁰. La electroforesis ofrece la ventaja distintiva de la separación completa de las isoenzimas sin riesgo de contaminación³.

Las isoenzimas de CK se separan de acuerdo con su movilidad electroforética sobre un gel de agarosa, seguida por la incubación con un reactivo, que permite visualizar las isoenzimas de la CK de acuerdo con la siguiente secuencia de reacción:



Los patrones pueden examinarse cualitativamente o pueden cuantificarse mediante densitometría.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todos los reactivos son exclusivamente para uso diagnóstico in-vitro. No ingerir ni chupar con la boca ningún componente del kit. Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos de los componentes, avisos de seguridad y consejos para su eliminación.

COMPOSICIÓN

1. Gel del SAS-MX CK Isoenzyme (x10)

Contiene agarosa en un tampón de AMP con azida de sodio como conservante. El gel viene envasado listo para usar.

2. Tampón del SAS-MX CK Isoenzyme (1x 100ml)

Contiene tampón MOPSO a pH 7,6 – 8,0. Diluir el contenido del frasco en 1 litro de agua destilada.

3. Reactivo del CK Isoenzyme (10x 1ml)

Contiene los compuestos necesarios para identificar las isoenzimas de la creatina cinasa de acuerdo con la secuencia de reacción que ya hemos mostrado anteriormente. Véase el procedimiento PASO A PASO para las instrucciones de reconstitución.

4. Diluyente del CK Isoenzyme (1x 10.5ml)

Contiene MES, sacarosa y azida sódica como conservante. El diluyente viene envasado listo para usar.

5. Cromógeno del CK Isoenzyme (1x 1ml)

Contiene tetranitro azul tetrazolio (TNBT) y dimetilformamida (DMF). El cromógeno viene envasado listo para usar.

6. Activador del CK Isoenzyme (1x 1ml)

Contiene 2-mercaptoetanol en agua. El activador viene envasado listo para usar.

7. Otros componentes del kit

Cada kit contiene un Manual del Usuario y suficientes plantillas de aplicación de la muestra (Plantilla 2 = 10 x 8 muestras, Plantilla 4 = 10 x 10 muestras) y secantes A y D para completar 10 geles.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

1. Gel del SAS-MX CK Isoenzyme

Los geles han de almacenarse a una temperatura entre 15...30°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. NO REFRIGERAR NI CONGELAR. El deterioro del gel puede ser indicado por: 1) apariencia cristalina, indicativo de que el gel ha sido congelado, 2) agrietamiento y descamación, indicativo del resecamiento del gel, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

2. Tampón del SAS-MX CK Isoenzyme

El concentrado tampón debe almacenarse a una temperatura entre 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. El tampón diluido permanece estable durante 2 meses a una temperatura entre 15...30°C.

3. Reactivo del CK Isoenzyme

Los viales de reactivos deben guardarse a una temperatura entre 2...6°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

4. Diluyente del CK Isoenzyme

El diluyente debe guardarse a una temperatura entre 2...6°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

5. Cromógeno del CK Isoenzyme

El cromógeno debe guardarse a una temperatura entre 2...6°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

6. Activador del CK Isoenzyme

El activador debe guardarse a una temperatura entre 2...6°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Evite la contaminación.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Nº de catálogo 4063 Cámara SAS-MX

Nº de catálogo 1525 Fuente de alimentación EPS600

Nº de catálogo 4062 Cámara de Incubación

Horno de secado con ventilación forzada con capacidad de 60...70°C

Incubador con capacidad de 45°C

Plato de vidrio

Solución decolorante: Mezclar 100ml de ácido acético cristalizado con 900ml de agua destilada.

Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

Agua purificada.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La muestra elegida es suero recién recogido. Las muestras deben estudiarse cuanto antes después de su recogida. Si es necesario, las muestras pueden guardarse refrigeradas a temperatura de 2...6°C durante hasta 48 horas²³ o congelarse a -20°C durante hasta 2 semanas²³. Deje que se descongele a temperatura ambiente.

Recogida de muestras: La elección del momento adecuado de la recogida de muestras es fundamental para la interpretación exacta de los patrones de isoenzimas CK en la valoración del infarto de miocardio (MI). Debe recogerse un mínimo de 4 muestras – una al ingreso, seguidas por muestras cada 8-12 horas durante un mínimo de 36 horas.

Factores que interfieren:

- 1) Aunque los eritrocitos no contienen actividad de CK, los productos de la hemólisis pueden interferir en la secuencia de reacción para la enzima, por lo que no se recomienda el uso de muestras hemolizadas²¹.
- 2) La congelación y descongelación repetidas de las muestras destruye la actividad de CK.
- 3) Determinados fármacos pueden afectar a la actividad de las isoenzimas de CK²².
- 4) La CK se inactiva por calor²¹.
- 5) En algunas muestras, la albúmina puede producir una banda visible entre las regiones de las bandas de MB y BB.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Para cada 100ml de muestra del paciente o control, añadir 1µl de activador de las isoenzimas CK e incubar a una temperatura de 15...30°C durante 10 minutos antes de su uso.
2. Sacar el gel del envase y colocarlo sobre una toallita de papel. Secar la superficie del gel en el punto de aplicación, (entre las marcas '-' en los extremos del gel) con un secante A, desechar el secante.
NOTA: Desde el momento en el que se coge el gel del envase de plástico, no deben pasar más de 5-7 minutos antes de que comience la electroforesis.
3. Alinear la plantilla de aplicación de la muestra (de 8 muestras o de 10 muestras según la preferencia) con las marcas '-' en el borde del gel. Aplicar un secante A sobre la parte superior de la plantilla y frotar con un dedo a lo largo de las rejillas para asegurar un buen contacto. Retirar el secante y conservarlo para utilizarlo luego en el paso 6.
4. Aplicar 1µl de muestra en cada ranura y dejar que absorba durante 4 minutos.
5. Mientras la muestra es absorbida, verter aproximadamente 45ml del concentrado tampón en cada hueco interior de la cámara SAS-MX.
6. Finalizada la absorción de la muestra, secar la plantilla con el secante A que se ha conservado del paso 3, retirar el secante y la plantilla.
7. Colocar el gel en la cámara con la agarosa hacia abajo, alineando los lados positivo (+) y negativo (-) con las posiciones correspondientes en la cámara.
8. Someter a electroforesis el gel: 100 voltios, 20 minutos.
9. Mientras se está haciendo la electroforesis de las muestras, colocar un secante D humedecido con agua en la cámara de incubación y colocar en el incubador a 45°C para equilibrar.
10. Aproximadamente 3-4 minutos antes del final de la electroforesis, reconstituir 1 vial de reactivo de isoenzimas de CK añadiendo 1ml de diluyente de isoenzimas CK y 70µl de cromógeno de isoenzimas CK y mezclar bien. No someter a agitadora vortical.
11. Después de la electroforesis, colocar el gel con el lado de la agarosa hacia arriba sobre el plato de vidrio. Verter el contenido del vial de Reactivos CK Isoenzyme a lo largo del lado del ánodo (+) del gel.
12. Usando una pipeta serológica, extender el reactivo desde el extremo anódico al catódico (-) del gel. Esperar 15 segundos y extender el reactivo desde el extremo catódico al anódico. Esperar 15 segundos y retirar el exceso de gel.
13. Retirar el gel de la placa de vidrio y colocarlo en la cámara de incubación. Incubar el gel: 30 minutos, 45°C.
14. Sumergir el gel en la solución decolorante durante 10 minutos.
15. Lavar el gel en agua purificado y secar a 60...70°C.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se recomienda realizar cualquier evaluación de los geles con respecto a valores normales obtenidos para este test en cada laboratorio individual. Los geles terminados deben conservarse en la oscuridad en todo momento.

Evaluación cualitativa: El gel del SAS-MX CK Isoenzyme puede inspeccionarse visualmente en cuanto a la presencia o ausencia de bandas de interés.

Evaluación cuantitativa. Estudiar los geles a 590nm en la hora siguiente a la terminación.

La CK-BB es la banda de movimiento más rápido, más anódica y CK-MM es la banda de movimiento más lento, más catódica. La CK-MB migra en una medida intermedia entre CK-MM y CK-BB^{1,3}. Se han comunicado varias bandas de CK atípicas. Las bandas atípicas que migran entre la CK-MB se han atribuido a CK-BB que forma complejos con IgG y CK-MM que forma complejos con lipoproteínas así como otros sin identificación positiva. La CK mitocondrial migra catódicamente respecto a CK-MM y una banda denominada macro-CK aislada de un paciente con cáncer también migró catódicamente respecto a CK-MM.

CK-MM

A menudo, es la única isoenzima de CK que se encuentra en el suero normal¹.

Elevada en las lesiones del músculo esquelético, las lesiones miocárdicas o las lesiones cerebrales^{1,3}.

CK-MB

Puede estar presente en el suero de sujetos normales en una cantidad del 0-4%²⁴. Las cantidades pequeñas de actividad de CK-MB se han interpretado como una alerta ante un posible infarto de miocardio y deben seguirse mediante estudios seriados de isoenzimas de CK y LDH.

Indicación positiva de infarto de miocardio cuando se cumplen los siguientes criterios: El contexto clínico adecuado², la actividad de CK-MB >5% de la actividad total de CK y un mínimo de 10U/l^{1,15,25}, la CK-MB muestra el cambio característico de patrón (aparición y desaparición relativamente rápidas)^{1,3,9}.

Identificación positiva de un segundo infarto de miocardio: después del primer IM, la CK-MB aumenta tras comenzar a disminuir. La CK total puede no mostrar un aumento después de comenzar a disminuir.

Valores después de la cirugía a corazón abierto³ – las isoenzimas de CK y LDH son menos específicas después de la cirugía a corazón abierto que en la mayoría de las situaciones diagnósticas. La CK-MB se elevará debido a la lesión miocárdica por el procedimiento quirúrgico así como el traumatismo al corazón por la manipulación y canulación. La LDH se invierte de forma secundaria a la hemólisis por la circulación extracorpórea. Los pacientes con infarto tienen niveles más altos de actividad de CK-MB, pero la amplia variedad de actividad isoenzimática observada en los pacientes sin IM se solapa con la observada en pacientes con IM, lo que imposibilita la discriminación completa. A pesar de esta dificultad, la exactitud en el diagnóstico de IM puede aumentarse haciendo determinaciones seriadas de la CK-MB en el período postoperatorio y siguiendo las tendencias. Los pacientes con infarto preoperatorio habitualmente tienen un aumento progresivo de los niveles de CK-MB, mientras que los pacientes sin IM muestran una disminución más rápida de la CK-MB posoperatoria^{2,26}.

Elevación en enfermedades distintas del IM: insuficiencia coronaria grave, distrofia muscular de Duchenne, fiebre manchada de las Montañas Rocosas, rabdomiólisis, dermatomiositis, mioglobulinuria, polimiositis, síndrome de Reye.

CK-BB

Se observa a menudo en el suero de pacientes con carcinoma prostático y ocasionalmente en el suero de pacientes con otros carcinomas y tumores malignos¹ (Véase LIMITACIONES). Se observa raramente en el suero de pacientes con lesiones cerebrales debido a daños en la barrera hematoencefálica^{1,27}. Se observa ocasionalmente en el suero de pacientes con síndrome de shock grave (probablemente debido a afectación del pulmón o del intestino delgado). Se observa ocasionalmente en el suero de pacientes con insuficiencia renal crónica, mujeres en el parto.

Se han comunicado algunas bandas atípicas de CK. Las bandas atípicas que migran entre la CK-MB y la CK-MM se han atribuido a CK-BB formando complejos con IgG^{28,29} y a CK-MM formando complejos con lipoproteínas³⁰, así como otros compuestos sin identificación positiva³¹⁻³³. La CK mitocondrial migra a una posición catódica respecto a la CK-MM³⁴ y una banda denominada 'macro' CK, aislada de un paciente de cáncer también migró catódica respecto a la CK-MM³⁵.

CONTROL DE CALIDAD

El Control de Nivel de CK/LDH (Nº de catálogo 5134) puede usarse para verificar todas las fases del procedimiento y debe usarse en cada prueba. Para obtener los valores apropiados de los ensayos, consultar el folleto adjunto en el envase.

LIMITACIONES

El procedimiento del CK SAS-MX CK Isoenzyme no está diseñado para identificar marcadores tumorales.

VALORES DE REFERENCIA

Los estudios del intervalo normal realizados a partir de voluntarios varones y mujeres aparentemente sanos dieron los siguientes resultados:

CK-MM = 100%

CK-MB = 0%

CK-BB = 0%

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES**Linealidad**

El método da una respuesta lineal a las actividades de CK de hasta 1.300 UI/l por banda.

Sensibilidad

El método es sensible hasta 8 UI/l por banda.

Reproductibilidad

	Dentro del Gel (n=8)		Entre distintos geles (n=4)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
CK-MM	76,5	0,5	76,4	0,8
CK-MB	11,1	1,8	11,2	4,5
CB-BB	12,5	2,7	12,5	2,5

BIBLIOGRAFÍA

1. Brish, L.K., 'CK & LD Isoenzyme. A Self-Instructional Text', Am. Soc. Of Clin. Path. Press, Chicago, 1984 : 30-47.
2. Wolf, P.L., Griffiths, J.C and Koett, J.W., 'Interpretation of Electrophoretic Patterns of Proteins and Isoenzymes', Mason Publishers, New York, 1981 : 60.
3. Tietz, N.W. (Ed.), Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1986. 678-700.
4. Galen, R.S., 'The Enzyme Diagnosis of Myocardial Infarction', Human Path., 1975; 6(2): 141-155.
5. Wagner, G.S., Roe, C.R., Limbird, L.E., Rosati, R.A. and Wallace, A.G., 'The Importance of Identification of the Myocardial-Specific Isoenzyme of Creatine Phosphokinase (MB Form) in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', Circulation, 1973; 47: 263-269.
6. Marmor, A. and Alpan, G., 'Specificity of Creatine Kinase MB Isoenzyme for Myocardial Injury', Clin. Chem., 1978; 24(12) : 2206.
7. Galen, R.S., Reiffel, J.A. and Gambino, S.R., 'Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', J. Am. Med. Assoc., 1975; 232(2): 145-147.
8. Frolich, J., Brosseuk, A., Grant, A. and McLennan, M., 'Study of the Value of CPK and LDH Isoenzyme Determinations in the Differential Diagnosis of Ischemic Chest Pain', Clin. Biochem., 1978, 11 (6): 232-234.
9. Yasmineh, W.G., Pyle, R.B, Cohn, J.N., Nicoloff, D.M., Hanson, N.Q. and Steele, B.W., 'Serial Serum Creatine Phosphokinase MB Isoenzyme Activity After Myocardial Infarction', Circulation, 1977; 55(5): 733-737.
10. D'Souza, J.P., Sine, H.E., Horvitz, R.A., Kubasik, N.P., Brody, B.B. and Barold, S.S., 'The Significance of the MB Isoenzyme in Patients with Acute Cardiovascular Disease with a Normal or Borderline Total CPK Activity', Clin. Biochem., 1978, 11 (5): 204-209.
11. Mercer, D.W., 'Separation of Tissue and Serum Creatine Kinase Isoenzymes by Ion-Exchange Column Chromatography', Clin. Chem., 1974; 20(1) : 36-40.
12. Rao, P.S., Lukes, J.J., Ayres, S.M. and Mueller, H., 'New manual and Automated Method for Determining Activity of Creatine Kinase Isoenzyme MB, by Use of Dithiothreitol: Clinical Applications', Clin. Chem., 1975; 21(11) : 1612-1618.
13. Jockers-Wretou, E. and Pfeleiderer, G., 'Quantitation of Creatine Kinase Isoenzymes in Human Tissues and Sera by an Immunological Method', Clin. Chim. Acta, 1975; 58: 223-232.
14. Roberts, R., Sobel, B.E. and Parker, C.W., 'Radioimmunoassay for Creatine Kinase Isoenzymes', Science, 1976; 194: 855-857.
15. Van Der Veen, K.J. and Willebrands, A.F., 'Isoenzymes of Creatine Phosphokinase in Tissue Extracts and in Normal and Pathological Sera', Clin. Chim. Acta, 1966; 13: 312-316.
16. Wong, R. and Swallen, T.O., 'Cellulose Acetate Electrophoresis of Creatine Phosphokinase Isoenzymes in the Diagnosis of Myocardial Infarction', Am. J. Clin. Pathol., 1975; 64: 209-216.
17. Burger, A., Richterich, R. und Aebi, H., 'Die Heterogenitat der Kreatin-Kinase', Biochemische Zeitschrift, 1964; 339: 305-314.
18. Deul, D.H. and van Breeman, J.F.L., 'Electrophoresis of Creatine Phosphokinase from Various Organs', Clin. Chim. Acta, 1964; 10: 276-283.
19. Rosalki, S.B., 'Creatine Phosphokinase Isoenzymes', Nature, 1965; 207: 414.
20. Trainer, T.D. and Gruenig, D., 'A Rapid Method for the Analysis of Creatine Phosphokinase Isoenzymes', Clin. Chim. Acta, 1968; 21: 151-154.
21. Henry, R.J. and Cannon, D.C., Ed's, 'Clinical Chemistry Principles and Techniques', 2nd Edition, Harper and Row, New York, 1974: 901-903.

22. Young, D.S. , 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3rd Edition, AACC Press, Washington D.C., 1990.
23. Cho, H.W. and Meltzer, H.Y., 'Factors Affecting Stability of Isoenzymes of Creatine Phosphokinase', *Am. J. Clin. Pathol.*, 1979; 71(1): 75-82.
24. Marmor, A., Alpan, G., Keidar, S., Grenadier, E. and Palant, A., 'The MB Isoenzyme of Creatine Kinase as an Indicator of Severity of Myocardial Ischaemia', *Lancet*, 1978; Oct 14: 812-814.
25. Galen, R.S., Personal Communication, June 1980.
26. Galen, R.S., 'Diagnostic Tests in Cardiac and Non-Cardiac Disorders' *Diag. Med.*, 1978 Feb., 74-87.
27. Bayer, P.M., Gabl, F., Granditsch, G., Widhalm, K., Zyman, H. and Deutsch, E., 'Creatine Kinase Isoenzymes in Cerebral Fluid in a Case of Brain Damage', *Clin. Chem.*, 1976; 22(8) : 1405-1407.
28. Stein, W. and Bohner, 'Immunoglobulin-Bound Creatine Kinase BB ("Macro CK") in Three Patients with Different Diseases', *Clin. Chem.*, 1979; 25(8) : 1513-1514.
29. Pudek, M.R., Jacobson, B.E., Urquhart, N. and Rabkin, S.W., 'Effect of Macro Creatine Kinase BB on Results of Different Creatine Kinase Isoenzyme Methods', *Clin. Chem.*, 1982; 28(6) : 1400.
30. Velletri, K., Griffiths, W.C. and Diamond, I., 'Abnormal Electrophoretic Mobility of a Creatine Kinase MM Isoenzyme', *Clin. Chem.*, 1975; 21(12) : 1837-1838.
31. Sax, S.M., Moore, J.J., Giegel, J.L. and Welsh, M., 'Atypical Increase in Serum Creatine Kinase Activity in Hospital Patients', *Clin. Chem.*, 1976; 22(1) : 87-91.
32. Ljungdahl, L. and Gerhardt, W., 'Creatine Kinase Isoenzyme Variants in Human Serum', *Clin. Chem.*, 1978; 24(5) : 832-834.
33. Lott, J.A. and Heinz, J.W., 'A Stable, Unusual Isoenzyme of Creatine Kinase Observed in a Case of Acute Anoxia', *Clin. Chem.*, 1978; 24(6) : 1047.
34. James, G.P. and Harrison, R.L., 'Creatine Kinase Isoenzymes of Mitochondrial Origin in Human Serum', *Clin. Chem.*, 1979; 25(6) : 943-947.
35. Yuo, Hoyuo, et al., *Clin. Chem.*, 1978; 24(11) : 2054-2057.

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440
Fax: +44 (0) 191 482 8442
Email: info@helena-biosciences.com
www.helena-biosciences.com

HL-2-1304P 2008/01 (8)