MEDICHEM
MIDDLE EAST
Clinical Chemistry Reagents
Liquid Stable Reagents

الإجراء اليدوي

كرياتين كيناز MB CK-MB

Cat. No. 17791
من اجل 30 تحليل

R1	1 x	24 ml
R2	1 x	6 ml

طريقة حركية غير لونية, تعتمد على فعالية NAC .

كاشف سائل

مبدأ الاختبار:

تتمثل فعالية الكرياتين كيناز CK في المصل و البلازما بفعالية CK-MB و CK-MM أما K-BB فغير قابل للكشف. يحتوي هذا الكاشف على مضادات حيوية موجهة مباشرةً للوحدة الثانوية CK-B لتعطي حجب كلي لـ CK-MM وحجب جزئي لـ CK-MB (حجب جزئ CK-M بدون أي تأثير على جزئ CK-B) . حساب جزئ CK-B يعادل نصف فعالية CK-MB. التحديد الحركي للكرياتينين كيناز CK-B يعتمد على سلسلة التفاعلات التالية:

$$\text{Creatine phosphate + ADP} \xrightarrow{\text{CK}} \text{Creatine + ATP}$$

$$\text{ATP+ D-Glucose} \xrightarrow{\text{HK}} \text{ADP + D-Glucose-6-phosphate}$$

$$\text{D-Glucose-6-phosphate + NADP}^{+} \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{D-Gluconat-6-phosphate + NADPH + H}^{+}$$

يقوم CK-B المتبقي كوسيط في تفاعل فسفرة بتحويل كرياتين فوسفات و أدينوزين ثنائي الفوسفات (ADP) إلى كرياتين و أدينوزين ثلاثي الفوسفات (ATP), و إضافة أنزيم الهكسوكيناز كوسيط لتفاعل ATP الناتجة مع الغلوكوز لإعطاء ADP و غلوكز-6-فوسفات (G6P). يتأكسد (G6P) بوجود NADP إلى غلوكونات-6-فوسفات مع إرجاع NADP إلى NADPH , و الذي يقاس عند طول موجة 340 نانومتر. معدل الازدياد في الامتصاصية اللونية تتناسب مع فعالية CK-B في العينة.

تركيب الكاشف:

Reagent R1		
N-Acetylcystein(NAC)	30	mmol/L
ADP	5.88	mmol/L
NADP	3	mmol/L
AMP	7.2	mmol/L
Diadenosine (5´) pentaphosphate	10	µmol/L
G-6-PDH (Glucose-6-phosphate-dehydrogenase)	≥ 2800	U/L
Hexokinase	≥ 4000	U/L
Anti-human polyclonal CK-MB antibody	Sufficient to inhibit up to 1500 U/L CK-MM	
Stabilizer, preservative		
Reagent R2		
D-Glucose	40	mmol/L
Magnesium acetate	15.3	mmol/L
Creatine phosphate	150	mmol/L
EDTA	2.6	mmol/L
Stabilizer, preservative		

ثباتية الكاشف و تحضير محلول العمل:

كاشف R1: سائل.
كاشف R2: سائل.
كل الكواشف ثابتة خلال فترة الصلاحية المثبتة على اللصاقة عند التخزين في الدرجة 2– 8 مْ.

محلول العمل: (1+4)
نضيف 4 أحجام من كاشف R1 إلى حجم واحد من كاشف R2. نمزج بلطف.
محلول العمل ثابت لمدة 14 يوم في الدرجة 2- 8 مْ.
ملاحظة: لا تستخدم المحاليل إذا كانت عكرة أو ظهر أثر نمو بكتيري .
إذا كنت امتصاصية محلول العمل بدون عينة عند طول موجة 340 نانومتر ضد الماء المقطر أكثر من 0.700 فيجب استبعاد الكاشف.

جمع العينة و حفظها:

1 - عينة مصل أو بلازما جمعت على مانع تخثر هيبارين, أو EDTA دون أي انحلال. ه ي الاقتراح الأمثل
2 - الكرياتين كيناز (MB) في المصل ثابت لمدة: 7 أيام في الدرجة 2-8 مْ. و تجميد العينات في -20 مْ يؤدّي إلى أقل خسارة ممكنة من النشاط.
3 - تجنب تعرض العينة للضوء القوي.

ضبط الجودة:

مصل شاهد طبيعي Meditrol N Cat .No 15171
مصل شاهد مرضي Meditrol P Cat .No 15181

الإجراء:

طول الموجة (فوتومتر)	Hg 340nm (334, 365nm)
طول الموجة (سبكتروفوتومتر)	340nm
المسار الضوئي	1 cm
درجة الحرارة	37 °C
القياس	مقابل الماء المقطر
التفاعل	حركي - متزايد

التحليل:

أحضن محلول العمل في الدرجة 37 م قبل الاستعمال

العينة	50 µl
محلول العمل	1000 µl
امزج بشكل جيد و احضن مدة 5 دقيقة في الدرجة 37 مْ. أقرأ التغير في الامتصاصية الضوئية كل دقيقة خلال 3 دقائق, احسب تغير الامتصاصية الوسطي (ΔA/min).	

الحساب:

لحساب فعالية **CK-MB**::

فعالية CK-MB (U/L) = ΔA/min X Factor (F)

عامل المعايرة (F):37°C

طول الموجة	334 nm	340 nm	365 nm
Factor (F)	6796	6666	12000

النسبة المئوية لفعالية CK-MB:

$$\% \text{ CK-MB activity} = \frac{\text{CK-MB}_{\text{activity}}}{\text{Total CK}_{\text{activity}}} \times 100$$

ملاحظة: من المقترح لكل مخبر (بحسب كفاءة الجهاز المستخدم) أن يستخرج عامل المعايرة (F) الخاص به باستخدام محلول معايرة حسب العلاقة التالية:

$$F = \frac{Conc_{calibrator}}{\Delta A/\min_{\text{Calibrator}}}$$

الخطية:

حتى: 1000 U/L
العينة ذات النتيجة أعلى من 1000 U/L يجب أن تمدد بمحلول كلور الصوديوم 0.9% (محلول فيزيولوجي) بنسبة (1+2) و بإعادة التحليل نضرب النتيجة بـ 3.

Creatine Kinase (CK-MB)

UV kinetic method. Activated NAC

كرياتين كيناز MB

طريقة حركية غير لونية, تعتمد على فعالية NAC .

التداخلات:

1 - العينة المنحلة يجب أن لا تستخدم بسبب الكريات الحمر التي تحوي على ملوثات والأنزيمات اللذان سيؤثران على التحليل.

2 - البيليروبين حتى التركيز 20 mg/dl و الخضاب حتى 500 mg/dl تؤثر بقيم مهملة على التحليل.

3 - الطريقة تحدد CK-BB isoenzyme الموجود في المصل أيضا. إنّ نشاط هذا isoenzyme مهمل عادةً، على أية حال، إذا كانت الكمية هامّة من فعالية CK-BB سنزيد في تقدير الفعالية الموجودة من CK-MB.

4 - الكمية الكبيرة من BB (معقد immunoglobulin) لوحظ أن ذلك سيكون محدد في هذه التجربة على شكل B. إذا كانت فعالية CK-B المحددة أكبر بـ 20 % من الفعالية الكليّة لـ CK , فيجب أن يتوقع كمية كبيرة من BB.

5 - انظر في كتاب Young *et. al.* من اجل جداول إضافية لتداخل المواد.

التحذيرات:

1 - يمكن للمحلول أن يؤثر على الجاد, تجنب أي تماس مباشر, في حال حدوث ذلك اغسل بكمية وافرة من الماء المقطر.

2 - يحتوي الكاشف على أزيد الصوديوم كمادة حافظة. و من المحتمل أن يرتبط مع أملاح النحاس أو الرصاص ليشكل أزيدات المعادن المتفجرة, لذلك بعد طرح الكاشف المستخدم اغسل بكمية كبيرة من الماء لمنع ارتباط الأزيد.

المجال الطبيعي:

فعالية CK-MB حتى 25U/L (في الدرجة 37 °C)

إذا كانت النسبة بين CK-MB و فعالية الـ CK الكلي أكبر من 4% فيجب أن تؤخذ هذه النتيجة بنظرة مريبة ذات اعتبار، بالرغم من أنه يمكن أن يكون سببه جرح العضلة الهيكلي الشامل. أيّ نسبة بين 5.0 - 20 % متوافقة مع إنتهاك العضلة القلبية الحادّ. و يوصي إلى حد كبير بأنّ كلّ مختبر يحدد المجال المتوقع الخاص به.

المراجع:

1. German clinical chemistry society, J. Clin.Chem. Clin. Biochem. 15, 255 (1977).
2. G. Chemnitz, E. Schmidt, P. U. Koller und E. W. Busch, Dtsch. med. Wschr. 104, 257 (1979).
3. Anon. (1979) j. clin. Chem.. clin. Biochem. 15:249.
4. Suazs, G., et. al. (1976). Clin. Chem.. 22:650.
5. Gruber, W. (1978) Inhibition of creatine kinase activity by Ca^{2+} and reversing effect of EDTA (letter to the editor). Clin. Chem.. 24:177.
6. Rosalki, S.B., J. Lab. Clin. Med. 69:696 (1967).
7. Young, DS., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, fifth edition 2000, AACC Press, Washington, D.C.
8. German Society for Clinical Chemistry. Recommendations for carrying out ECCLS procedures (1988) for the catalytic concentrations of creatine kinase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and gammaglutamyltransferase at 37 0C. J Clin Chem Clin Biochem .1993:31:901-9.
9. Reference procedures for the determination of creatine kinase activity. Clin Chem Clin Biochem 1977: 15:249-54.