

Reagenz zur quantitativen In-vitro-Bestimmung von CK im Blut

Best. Nr. CK 321
Inhalt: 20 Tests
 20 Pipettenspitzen, 500µL

Methode
 IFCC 37°C^{1,2)} / DGKC modifiziert

Probenmaterial
 Kapillarblut, venöses Blut
 Kapillarblut sofort in das Reaktionsgefäß „R“ geben.
 Haltbarkeit der Probe im Reaktionsgefäß „R“:
 6 Stunden (+15°C bis +25°C)

Reagenz
 Inhalt / Konzentrationen:
 1. Startreagenz (Kappen in der PE-Flasche)
 ADP 2 mmol/L, G6-PDH > 2 kU/L
 2. Pufferlösung (vorportioniert in Rundküvetten)
 Imidazol-Puffer 100 mmol/L, pH = 6,00 (37°C), Glucose
 20 mmol/L, Magnesiumacetat 10 mmol/L, EDTA 2 mmol/L,
 AMP 5 mmol/L, NADP 2 mmol/L, N-Acetylcystein 20 mmol/L,
 Diadenosinpentaphosphat 10 µmol/L, HK > 4,0 kU/L,
 Natriumazid < 0,1 %
 3. Blutverdünnungslösung (Reaktionsgefäße „R“)
 Creatinphosphat 30 mmol/L, Natriumchlorid 3 g/L,
 Natriumazid < 0,1 %

Sicherheitshinweise
 Gefahrenhinweise
 H360D: Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
 EUH208: Enthält Imidazolidinylharnstoff. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
 Vorsichtsmaßnahmen
 P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
 P202: Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
 P263: Berührung während Schwangerschaft und Stillzeit vermeiden.
 P280: Schutzhandschuhe/ Schutzbekleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
 P308+P313: BEI Exposition oder falls betroffen:
 Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
 P405: Unter Verschluss aufbewahren.

Ein Sicherheitsdatenblatt wird auf Anforderung zur Verfügung gestellt.³⁾

Lagerung und Haltbarkeit
 Die Reagenzien sind bei +2°C bis +8°C bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfalldatum haltbar.

Messbedingungen
 Messgerät: Vario Photometer II Diaglobal
 Messwellenlänge: 365 nm
 Temperatur: 37°C
 Zusätzlich erforderlich: Minizentrifuge, 37°C-Thermostat

Messbereich
 Bis 1000 U/L
 Werden höhere Werte erhalten oder erwartet, empfiehlt es sich, die Bestimmung mit 20 µL (statt 60 µL) Probe durchzuführen. Ergebnis x 3

Referenzwerte
 Männer < 170 U/L
 Frauen < 145 U/L

Vorbereitung
 Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.
 Der 37°C-Thermostat muss mindestens 20 Minuten vor der Messung eingeschaltet werden.

Arbeitsanleitung
 Es können gleichzeitig bis zu 6 Proben gemessen werden.
 • 60µL Kapillarblut mit end-to-end-Kapillare aus der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen entnehmen und diese in das Reaktionsgefäß „R“ Lösung stellen
 • Durch kräftiges Schütteln das Blut aus der Kapillare in die Lösung überführen
 • Reaktionsgefäß „R“ in die Minizentrifuge einsetzen und eine Minute zentrifugieren
 • 500µL Überstand mit Pipette entnehmen, in Rundküvetten pipettieren (Leerwerte)
 • Test <CK 321> anwählen
 • Kappen aus der PE-Flasche auf die vorbehandelten Küvetten aufschrauben und Startreagenz durch kräftiges Schütteln lösen
 • Küvetten in den 37°C-Thermostaten stellen und gleichzeitig Messung starten
 • Der Bedienerführung im Display folgen
 • Nach Beendigung der Messung: HCT-Werte mit Pfeiltasten einstellen und mit <ENTER> bestätigen *)
 • Nach Beendigung der Messungen Ergebnisse in U/L mit Pfeiltaste abfragen
 • Messküvette entfernen

*) Ein HCT-Wert von 40 % ist als Standardwert vorgegeben.
 Bitte beachten: Da Kontrollproben nur aus Serum gemessen werden können, muss in diesem Fall für den HCT-Wert 0% eingegeben werden.

Berechnung
 Es wird die Aktivität (U/L) der Creatinkinase im Plasma berechnet. Da die Bestimmung aus Blut erfolgt, muss für eine genaue Ergebnismessung der Hämatokritwert der Probe berücksichtigt werden.

$$CK (U/L) = F \times \Delta E / (1 - 0,01 \times HCT)$$

F = Kalibrationskonstante, HCT = Hämatokrit in %
 Die Berechnungsformel ist im Vario Photometer II gespeichert.

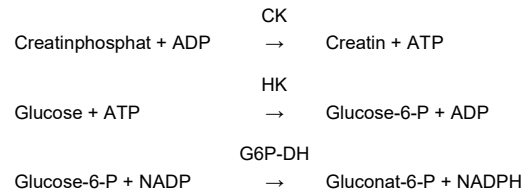
$$Umrechnung: \mu kat/L \times 60 = U/L$$

Qualitätssicherung
 Für die Qualitätssicherung empfehlen wir die Universal Kontrollserien der Firma Roche, www.roche.de:
 PreciControl ClinChem Multi 1 / Multi 2 (4 x 5 mL)
 Order-No.: 05 947 626 190 / 05 947 774 190
 Ref.: Roche / Hitachi analyzers, Method: IFCC liquid

Zusammenfassung
Biochemische Grundlagen
 Die Creatinkinase nimmt im Energiestoffwechsel der Muskelzelle eine Schlüsselrolle ein und ist für die Rückführung des ADP zu ATP verantwortlich. Die im Serum messbare Gesamtaktivität der CK setzt sich aus den Aktivitäten der Isoenzyme CK-MB, CK-MM und CK-BB zusammen. Im Blutplasma des Gesunden ist die CK normalerweise nur in sehr geringer Konzentration zu finden. Bei Muskelzerstörung tritt CK ins Blut über, so dass der Blut-CK-Spiegel ansteigt. Da der Abtransport aus der Zelle über die Lymphbahn erfolgt, wird der Konzentrationsgipfel zumeist erst nach 6 - 8 Stunden erreicht.

Trainingssteuerung und Wettkampfkontrolle
 Erhöhte CK-Spiegel bei körperlicher Aktivität sind Ausdruck einer Überforderung bzw. ungewohnten Belastung einzelner Muskelgruppen.
 Steigt der CK-Wert im Training über 900 U/L (15 µkat/L) an, ist eine Reduzierung der Trainingsbelastung zu empfehlen, da sonst die Gefahr eines Übertrainings besteht.⁴⁾
 Nach extremen Langzeitbelastungen (Marathon, Triathlon) kann die CK bis auf Werte über 4000 U/L (70 µkat/L) ansteigen.⁴⁾

Messprinzip
 Mit dem Diaglobal-Test CK 321 wird die Gesamt-CK im Blut gemessen.
 Die Bestimmung basiert auf der 37°C-Standardmethode der IFCC⁵⁾ (International Federation of Clinical Chemistry).



HK = Hexokinase, G6P-DH = Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase,
 ADP = Adenosin-diphosphat, ATP = Adenosin-triphosphat

Die NADPH-Zunahme ist der CK-Aktivität direkt proportional und wird bei 365 nm gemessen.

Anmerkung: In der älteren Fachliteratur finden sich häufig Werte, die nach der älteren 25°C-Methode bestimmt wurden. Die nach der neuen IFCC-Methode gemessenen Werte fallen im Schnitt um den Faktor 1,6 höher aus.

Leistungsmerkmale
Spezifität / Interferenzen⁶⁾
 Falsch erhöhte Werte durch starke Hämolyse (Hb>2,0 g/L), keine wesentliche Beeinflussung durch Bilirubin (bis 15 mg/dL).
 Stark lipämische Proben können aufgrund zu hoher Extinktionen Probleme bereiten.

Unpräzision
 Die Reproduzierbarkeit wurde mit Kontrollproben überprüft.

In der Serie [n = 20]	Mittelwert [U/L]	Standard- Abweichung [U/L]	VK [%]
Probe 1 Probe 2	150 503	4,96 12,3	3,3 2,4
Von Tag zu Tag [n = 20]	Mittelwert [U/L]	Standard- Abweichung [U/L]	VK [%]
Probe 1 Probe 2	148 508	5,48 14,2	3,7 2,8

Analytische Sensitivität
 Untere Nachweisgrenze: 20 U/L (0,33 µkat/L)

Methodenvergleich
 Ein Vergleich des Diaglobal-Tests CK 321 (y) mit einem anderen, kommerziell erhältlichen Test (x) ergab nach dem Verfahren der linearen Regression die Korrelation:
 $y = 0,984x - 3,65$
 $r = 0,996$
 $n = 45$
 Konzentrationsbereich: 40 - 2600 U/L

Literatur
 1. Thomas L. Labor und Diagnose. 4.Aufl. Marburg: Die Medizinische Verlagsgesellschaft 1995: 89
 2. Schumann G et al. Clin Chem Lab Med 2002; 40: 635-642
 3. www.diaglobal.de
 4. Neumann G., Pfützner A., Hottenrott K. Alles unter Kontrolle. 6.Aufl. Aachen: Meyer und Meyer 2000: 151
 5. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Eur J Clin Chem Clin Biochem 1991; 29:435-456
 6. Sonntag O. Arzneimittelinterferenzen. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, 1985:47



Reagent for quantitative In-vitro-determination of CK in blood

CK 321

Order no. CK 321
Contents: 20 tests
20 pipette tips, 500µL

Method
IFCC 37°C^{1,2)} / DGKC modified

Sample material
Capillary or EDTA blood.
Set capillary blood immediately in reaction tube "R".
Stability of the sample in reaction tube "R":
6 hours (+15°C to +25°C)

Reagents
Contents / concentrations:
1. Starter reagent (caps in PE-bottle)
ADP 2 mmol/L, G6-PDH >2 kU/L
2. Buffer solution (pre-portioned in round cuvettes)
Imidazole buffer 100 mmol/L, pH = 6.00 (37°C), Glucose 20 mmol/L,
Magnesium acetate 10 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, AMP 5 mmol/L,
NADP 2 mmol/L, N-Acetyl-cysteine 20 mmol/L, Diadenosin-penta-
phosphate 10 µmol/L, HK > 4.0 kU/L; Sodium azide < 0.1 %
3. Solution for dilution of blood (reaction tubes "R")
Creatine phosphate 30 mmol/L, Sodium chloride 3 g/L,
Sodium azide < 0.1 %

Safety information
Hazard statements
H360D: May damage the unborn child
EUH208: Contains Imidazolidinyl urea. May produce an allergic reaction.
Precautionary statements
P201: Obtain special instructions before use.
P202: Do not handle until all safety precautions have been read and understood.
P263: Avoid contact during pregnancy and while nursing.
P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P308+P313: IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.
P405: Store locked up.

A safety data sheet is available on request.³⁾

Storage and shelf life
The reagent have to be kept in a dark place at a temperature between + 2°C to + 8°C until the expiry date indicated on the packaging.

Measurement conditions
Measurement device: Vario Photometer II Diaglobal
Meas. wavelength: 365 nm
Temperature: 37°C
Additionally required:
Mini centrifuge, Dry block heater (37°C)

Measurement range
Up to 1000 U/L
In case of exceeding these value, repeat determination with sample volume of 20 µL (instead of 60 µL). Multiply the result by 3

Reference values
Male < 170 U/L
Female < 145 U/L

Preparation
Reagents are ready to use.
The dry block heater should be activated at least 20 min. before measurement.

Working instructions
Up to six samples can be measured at the same time.

- Withdraw 60µL capillary blood from finger pad or earlobe with end-to-end capillary and insert into reaction tube "R"
- Transfer blood into solution by mixing strongly
- Insert reaction tube "R" into Minicentrifuge and centrifuge for 1 minute
- Pipette 500µL supernatant into round cuvettes (blanks)
- Select <CK 321>
- Screw caps from PE-bottle onto prepared round cuvettes and mix very strongly to solve the starter reagent
- Insert cuvettes into 37°C dry block heater and start measurement at the same time
- Follow the operator guidance showing on display
- Upon completion of measurement: Adjust HCT value with arrow keys and confirm with <ENTER> *)
- After finishing the measurements, read results in U/L with arrow keys
- Remove cuvette

**) HCT value of 40 % is set as standard value.
Please note that in case of measuring CK 321 with control serum the HCT-value has to be keyed in as 0%.*

Calculation
Activity (U/L) of Creatine kinase in plasma will be calculated. For exact measurement results the haematocrit values has to be considered.

$$CK (U/L) = F \times \Delta E / (1 - 0.01 \times HCT)$$

F = calibration constant, HCT = Haematocrit in %
The algorithm for calculating the results is stored in the Vario Photometer II.

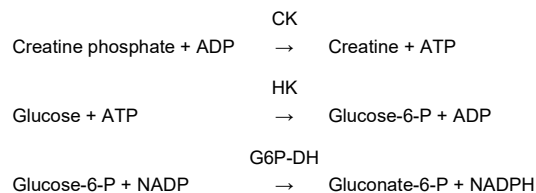
Conversion: µkat/L x 60 = U/L

Quality assurance
For quality assurance we recommend universal control sera from company Roche, www.roche.de:
PreciControl ClinChem Multi 1 / Multi 2 (4 x 5 mL)
Order-No.: 05 947 626 190 / 05 947 774 190
Ref.: Roche / Hitachi analyzers, Method: IFCC liquid

Summary
Biochemical fundamentals
Creatine Kinase has a key role in the catabolism of muscle cells and is responsible for reduction of ADP to ATP. Measurable total activity of CK in serum consists of activity of iso enzyme CK-MB, CK-MM and CK-BB. In blood plasma of a healthy person a very low concentration of CK is normally found. At muscle deterioration CK transgresses into blood and blood CK level increases. Since evacuation from cell occur by lymph channel the concentration climax will be reached mostly after 6 - 8 hours.

Training and competition control
Increased CK level due to physical activity is an expression of overstraining or unaccustomed strain of individual muscle groups.
If the CK value increases to 900 U/L (15 µmol/Ls) during training, a decrease of training exercise is recommended or else overtraining is risked.⁴⁾
After extreme physical stress (marathon, triathlon) CK value can increase beyond 4000 U/L (70 µmol/Ls).⁴⁾

Measurement principle
With Diaglobal test CK 321 total CK is measured.
Determination is based on a 37°C standard method of IFCC⁵⁾ (International Federation of Clinical Chemistry).



HK = Hexokinase, G6P-DH = Glucose-6-Phosphate-dehydrogenase,
ADP = Adenosine-diphosphate, ATP = Adenosine-triphosphate

The increase of NADPH is directly proportional to the CK activity and is measured at 365 nm.

Note: Earlier technical literature often gives values that were determined with the help of the 25°C method. Values, measured with the new IFCC method, average higher about a factor of 1.6.

Performance parameters
Specificity / interferences⁶⁾
Falsely increased values due to strong haemolysate (Hb>2.0 g/L), no significant interferences due to bilirubin (up to 15 mg/dL).
Strong lipemic samples can cause problems due to high absorptions.

Inaccuracy
The reproducibility was checked using human and control samples.

In series [n = 20]	Average [U/L]	Standard deviation [U/L]	CV [%]
Sample 1	150	4.96	3.3
Sample 2	503	12.3	2.4
From day to day [n = 20]	Average [U/L]	Standard deviation [U/L]	CV [%]
Sample 1	148	5.48	3.7
Sample 2	508	14.2	2.8

Analytic sensitiveness
Lower detection limit: 20 U/L (0.33 µkat/L)

Comparison of methods
A comparison of the Diaglobal test CK 321 (y) and another commercial available test (x) resulted in the following correlation according to the linear regression:
 $y = 0.984x - 3.65$
 $r = 0.996$
 $n = 45$
Concentration range: 40 - 2600 U/L

Bibliography
1. Thomas L. Labor und Diagnose. 4.Aufl. Marburg: Die Medizinische Verlagsgesellschaft 1995: 89
2. Schumann G et al. Clin Chem Lab Med 2002; 40: 635-642
3. www.diaglobal.de
4. Neumann G., Pfützner A., Hottenrott K. Alles unter Kontrolle. 6. Aufl. Aachen: Meyer und Meyer 2000: 151
5. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Eur J Clin Chem Clin Biochem 1991; 29:435-456
6. Sonntag O. Arzneimittelinterferenzen. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, 1985:47